



PRÄKLINISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR GENTHERAPIE DER HIV-INFEKTION MIT DEM RETROVIRALEN VEKTOR M870

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



Von
Holger O. Martinius
(Birkenfeld/Nahe)

Frankfurt am Main, 2007
(D 30)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: PROF. DR. R. WITTIG

Erstgutachter: PROF. DR. A. STARZINSKI-POWITZ

Zweitgutachter: PROF. DR. M. D. VON LAER

Datum der Disputation: 04. Mai 2007

Meinen Eltern, meiner Familie.

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	HIV und das „Erworbene Immundefizienzsyndrom“ AIDS	3
2.2	HIV-1: Aufbau und Replikationszyklus	4
2.3	Fusion von Virus- und Zellmembran	8
2.4	Verlauf der HIV-Infektion	10
2.5	Aktuelle Therapie der HIV-Infektion - State of the HAART	11
2.5.1	Reverse Transkriptaseinhibitoren – RTI	11
2.5.1.1	Nucleosidische RTI (NRTI)	11
2.5.1.2	Nicht-nucleosidische RTI	12
2.5.2	Proteaseinhibitoren – PI	12
2.5.3	Integraseinhibitoren	13
2.5.4	Eintrittsinhibitoren („entry inhibitors“)	13
2.5.4.1	Attachment-Inhibitoren	13
2.5.4.2	Co-Rezeptor-Antagonisten	14
2.5.4.3	Fusionsinhibitoren	14
2.6	Gentherapie der HIV-Infektion	16
2.6.1	Therapeutische Gene	16
2.6.2	M87o – Ein neuer Vektor für die Gentherapie der HIV-Infektion exprimiert ein Klasse I Gen und inhibiert den Eintritt des Virus in die Zelle	18
2.6.3	Vektoren in der Gentherapie	19
2.6.3.1	Retrovirale Vektoren	19
2.6.3.2	Lentivirale Vektoren	20
2.7	Zielsetzung der Arbeit	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Zellkulturmedien, -Zusätze, Puffer, Cytokine, antiretrovirale Therapeutika und Chemikalien	23
3.1.2	Antikörper und immunomagnetische Beads	24
3.1.3	Plasmide und Vektoren	25
3.1.4	Zelllinien	25
3.1.5	HIV-Stämme	25
3.1.6	Geräte und Materialien	26
3.1.7	Verwendete Testkits	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Standardzellkultur	27
3.2.1.1	Suspensionszellen	27
3.2.1.2	Adhärentwachsende Zellen	27
3.2.1.3	Primäre Blutzellen	27
3.2.2	Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschluß	27
3.2.3	Kryokonservierung von Zellen	28
3.2.4	Auftauen kryokonservierter Zellen	28

3.2.5	Isolierung peripherer mononukleäre Blutzellen aus Vollblut	28
3.2.6	Gewinnung von Serum aus Frischblut	28
3.2.7	Depletion CD8-positiver Zellen	29
3.2.8	Produktion retroviraler Vektorpartikel mittels transienter Transfektion	29
3.2.9	Retroviraler Gentransfer in Zelllinien	30
3.2.10	Retroviraler Gentransfer in primäre periphere Blutzellen (Basisprotokoll) .	30
3.2.11	Vorbeladen von Zellkulturgefäßen mit retroviralen Vektorpartikeln.....	31
3.2.12	Beschichten von Kulturgefäßoberflächen mit RetroNectin.....	31
3.2.13	Titration von HIV-Stocksuspensionen	32
3.2.14	HIV-Infektionsversuche mit Zelllinien	32
3.2.15	HIV-Infektionsversuche mit primären Zellen	33
3.2.16	Bestimmung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA	33
3.2.17	Erzeugung T-20-resistenter Pseudotypviren.....	34
3.2.18	„Single round“-Infektionsassay	35
3.2.19	Nachweis von anti-C46 Antikörpern in Serumproben mittels Western Blot	36
3.2.20	Durchflussszytometrie	37
3.2.21	Zellsortierung mittels FACSCalibur	38
3.2.22	Assays zur Bestimmung der Zellproliferation.....	39
3.2.22.1	³ H-Thymidin-Einbauassay	39
3.2.22.2	Bestimmung der akuten Toxizität antiretroviraler Therapeutika mittels Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega)	39
3.2.23	Bestimmung des Transformationspotentials retroviraler Vektoren und deren Genprodukte mittels Weichagar-Koloniebildungsassay.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	M87o, ein optimierter retroviraler Vektor für die Gentherapie der HIV- Infektion: Untersuchungen zur Wirksamkeit <i>in vitro</i>	41
4.1.1	M87o inhibiert die HIV-Infektion in Zelllinien	42
4.1.2	M87o hemmt T-20-resistente HIV-Stämme	43
4.1.3	M87o schützt primäre T-Zellen vor der HIV-1-Infektion	44
4.2	Präklinische <i>in vitro</i> -Untersuchungen zur Unbedenklichkeit von M87o.....	47
4.2.1	Rat-1-Zellen werden von M87o nicht transformiert	48
4.2.2	Die Expression von M87o verändert primäre Lymphozyten weder phänotypisch noch funktionell.....	49
4.2.2.1	Phänotypische Prüfung: M87o verändert die Expression charakteristischer Oberflächenmarker nicht	49
4.2.2.2	Funktionelle Prüfung: Die Stimulierbarkeit primärer T-Zellen wird durch M87o nicht verändert.....	51
4.3	Untersuchungen zur Toxizität und Immunogenität der M87o- Gentherapie im Rhesusmakakenmodell	52
4.3.1	Entwicklung des Transduktionsprotokolls für Rhesusaffenlymphozyten	52
4.3.1.1	Der anti-CD3-Antikörpern SP34 eignet sich hervorragend zur Stimulation von Rhesusaffenlymphozyten	53
4.3.1.2	Co-Stimulation: α -CD28 oder IL2?	54
4.3.1.3	FKS kann während der Kultur durch autologes Rhesusaffenserum ersetzt werden	55
4.3.1.4	Periphere mononukleäre Blutzellen von Rhesusmakaken können <i>ex vivo</i> effizient transduziert werden	56

4.3.1.5	Die Gentransferrate kann durch RetroNectin gesteigert werden	56
4.3.1.6	Das etablierte Protokoll zur Transduktion primärer Rhesusaffenlymphozyten	57
4.3.2	Das autologe Affentransplantationsmodell – Studie zur <i>in vivo</i> -Toxizität und Immunogenität	58
4.3.2.1	M87o-transduzierte Zellen können <i>in vivo</i> nachgewiesen werden.....	59
4.4	Vorbereitungen für eine klinische Studie der Phase I/II: Entwicklung eines Protokolls für die Produktion genetisch modifizierter Lymphozyten HIV-infizierter Spender	62
4.4.1	CD8 ⁺ T-Zellen können sehr effektiv depletiert werden.....	63
4.4.2	Stimulationsbedingungen - Vergleich CD3/CD28-Beads/IL-2 und OKT-3/IL-2.....	64
4.4.2.1	Durch Stimulation mit CD3/CD28-Beads/IL-2 kann die Zellausbeute gesteigert werden.....	65
4.4.2.2	CD3/CD28-Bead/IL-2-Stimulation hat keinen Einfluss auf die Expression wichtiger Oberflächenantigene	66
4.4.3	Stimulation mit CD3/CD28-Beads/IL-2 erlaubt eine effiziente retrovirale Transduktion	67
4.4.4	CD3/CD28-Beads interferieren mit dem Transduktionsprozess und müssen nach der Stimulation entfernt werden.....	68
4.4.5	Kultur und Transduktion von T-Zellen HIV-1-positiver Spender.....	69
4.4.5.1	Antiretrovirale Medikamente wurden für die Verwendung bei der Herstellung der Zellpräparate getestet.....	70
4.4.5.2	Antiretrovirale Therapeutika können mit den Prozessen des retroviralen Gentransfers interferieren.....	71
4.4.5.3	Die Replikation multiresistenter HIV wird durch Amprenavir, Nelfinavir und T-20 zuverlässig unterdrückt.....	72
4.4.6	Das optimierte Transduktionsprotokoll für die klinische Anwendung	73
4.4.7	Testung des Protokolls im Versuchsmaßstab.....	74
4.4.8	Umsetzung des Protokolls im klinisch relevanten Maßstab (large scale) ..	77
4.4.8.1	Charakterisierung des Primärmaterials	78
4.4.8.2	Die Zielzellzahl wurde im large scale-Prozess deutlich überschritten.....	79
5	Diskussion	82
5.1	Präklinische Untersuchungen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	83
5.1.1	Präklinische <i>in vitro</i> -Untersuchungen zur Wirksamkeit	83
5.1.2	Präklinische Untersuchungen zur Toxizität <i>in vitro</i>	84
5.1.2.1	Genotoxizität.....	84
5.1.2.2	Phänotoxizität	87
5.2	Präklinische <i>in vivo</i> -Untersuchungen zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie im autologen Rhesus-Affenmodell	89
5.2.1	Das Transduktionsprotokoll für Rhesusaffenlymphozyten	89
5.2.2	Das Rhesusaffenmodell zur Toxizität und Immunogenität von M87o	91
5.3	Vorbereitungen für eine klinische Studie der Phase I/II: Die Transduktion HIV ⁺ Spenderzellen kann im klinisch relevanten Maßstab durchgeführt werden.....	93
5.3.1	Das Protokoll für die retrovirale Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen HIV-infizierter Spender im Versuchsmaßstab	94
5.3.2	Das optimierte Transduktionsprotokoll wurde erfolgreich für den klinischen Einsatz adaptiert.	96

5.4	Ausblick	99
6	Danksagung	100
7	Literatur	101
8	Abbildungsverzeichnis	120
9	Tabellenverzeichnis	122
10	Anhang	123
10.1	Abkürzungsverzeichnis	123
10.2	Publikationsliste	125
10.3	Lebenslauf	128
10.4	Erklärung an Eides Statt	129

1 Zusammenfassung

Mit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1995 wandelte sich die HIV-Infektion in den Industrieländern von einer akut lebensbedrohlichen zu einer chronisch verlaufenden und scheinbar gut kontrollierbaren Erkrankung. Das Virus wird allerdings nie vollständig aus dem Körper der Patienten eliminiert, sodass die Betroffenen zeitlebens Medikamente einnehmen müssen. Die Langzeit-Medikation wird häufig von schweren Nebenwirkungen begleitet, führt zur Selektion resistenter Viren und muss deshalb häufig umgestellt werden. Gentherapeutische Verfahren, die die CD4-positiven Zielzellen durch die Expression antiviraler Gene effektiv vor der Infektion durch HIV schützen („intrazelluläre Immunisierung“), stellen viel versprechende Therapiealternativen dar.

Der in der Arbeitsgruppe VON LAER entwickelte retrovirale Vektor M87o (EGELHOFER *et al.* 2004, EGELHOFER 2004) exprimiert das 46 Aminosäuren lange membranverankerte Peptid C46, das in der Lage ist, die gp41-vermittelte Fusion von Virus- und Zellmembran zu inhibieren. In Zelllinien und primären Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass M87o die Infektion durch unterschiedliche HIV-Isolate sehr effektiv verhindert.

Im Rahmen vorklinischer Untersuchungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die retrovirale Transduktion mit M87o das Transformationsrisiko und damit das Risiko der Entstehung von Neoplasien nicht steigert. An primären peripheren T-Zellen konnte gezeigt werden, dass M87o die Zielzellen weder phänotypische noch funktionelle verändert.

Für die Untersuchung der retroviralen Gentherapie im Rhesusaffenmodell wurde zunächst ein Gentransferprotokoll für periphere Affenlymphozyten entwickelt, mit dem in Vorversuchen Gentransferraten von ca. 50% erreicht werden konnten. Das Transduktionsprotokoll wurde anschließend im Rahmen einer präklinischen Studie zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie, bei der Herstellung zweier Studientransplantate angewandt. Beide Zellpräparate wurden den Versuchstieren transplantiert. Während des Eingriffs traten keine akuttoxischen Reaktionen auf. M87o⁺-Zellen konnten bis 140 Tage nach der Transplantation mittels PCR nachgewiesen werden. Immunologische Untersuchungen (Cytokinfärbung, Proliferationsassay, ELISPOT) ergaben keine Hinweise auf zelluläre oder humorale Immunreaktionen. M87o-spezifische Antikörper waren im Serum der Versuchstiere nicht nachweisbar.

Für die Durchführung einer klinischen Studie zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II) an HIV-infizierten Probanden wurde ein Protokoll zur Produktion M87o-modifizierter T-Zellen (mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen pro Spender) entwickelt. In die klinische Prüfung wurden Patienten aufgenommen, die nach multiplem Therapieversagen durch das Auftreten multiresistenter HIV eine CD4-Zellzahl von 50 bis 200 μl^{-1} Blut, sowie eine Viruslast von >5.000 Kopien ml^{-1} Blut aufwiesen. Im Versuchsmaßstab konnte ein Transduktionsprotokoll erarbeitet

werden, mit dem im Mittel 46% der CD4⁺ T-Zellen mit M87o transduziert werden konnten. Innerhalb von 10 Tagen expandierte die Zellzahl im Mittel um den Faktor 153, wobei die HIV-Replikation vollständig inhibiert wurde. Das Protokoll wurde erfolgreich vom Versuchsmaßstab in den klinisch relevanten Produktionsmaßstab übersetzt. In drei Versuchsläufen wurde im Mittel eine Transduktionsrate von 29% erreicht und die Zellzahl um den Faktor 44 vermehrt. Der Anteil an CD3⁺/CD4⁺ Zellen an der Gesamtpopulation lag im Mittel bei 91%. Insgesamt konnten mit dem etablierten Protokoll durchschnittlich $2,3 \cdot 10^9$ CD3⁺/CD4⁺/M87o⁺ Zellen, bei gleichzeitig vollständiger Inhibition der HIV-Replikation, generiert werden.

Im Rahmen einer klinischen Studie zur Toxizität und Wirksamkeit der M87o-Gentherapie wurden 10 Studientransplantate gemäß dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll hergestellt. Alle Transplantate wurden am Universitäts-Krankenhaus Eppendorf in Hamburg transfundiert und von den Patienten sehr gut vertragen.

2 Einleitung

In den westlichen Industrieländern konnte der Verlauf der HIV-Infektion durch Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART, highly active antiretroviral therapy) drastisch verlangsamt werden. Doch auch unter HAART kann die HIV-Vermehrung nicht vollständig unterbunden werden. Aufgrund der hohen viralen Mutationsrate treten früher oder später resistente Virusvarianten auf, die einen Wechsel der Medikamente erfordern. Die unumgängliche Langzeitmedikation führt dazu, dass Nebenwirkungen häufig auftreten und ernste Probleme darstellen (D'SOUZA *et al.*, 2000; RICHMAN, 2001).

Neue therapeutische Ansätze (LETVIN und WALKER, 2003; MOORE und STEVENSON, 2000) sind notwendig um weiterhin erfolgreiche Behandlungen zu ermöglichen. Mit Hilfe gentherapeutischer Verfahren können die CD4-positiven T-Zellen (Zielzellen) gegen die HIV-Infektion immunisiert werden („intrazelluläre Immunisierung“). Vektoren, die von Retroviren abgeleitet sind, stellen hervorragende Werkzeuge für den Transfer fremder Gene dar. Klinische Studien haben deren grundsätzliche Eignung bereits demonstriert (BUNNELL *et al.*, 1995, BONINI *et al.*, 1997, BUNNELL *et al.*, 1997; WALKER *et al.*, 2000; MITSUYASU *et al.*, 2000; FISCHER *et al.* 2001, DEERKS *et al.*, 2002).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Durchführung präklinischer Untersuchungen zur Unbedenklichkeit eines neuen gentherapeutischen Verfahrens und der Entwicklung eines Gentransferprotokolls für die Testung dieses Therapieansatzes im Rahmen klinischer Studien zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II).

2.1 HIV und das „Erworbene Immundefizienzsyndrom“ AIDS

Im Jahre 1981 trat in San Francisco und New York eine bis dahin unbekannte Häufung atypischer Lungenentzündungen und seltener Hauttumoren auf. Die neue Erkrankung wurde als das „Erworbene Immundefizienzsyndrom“ (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS; „*Morbidity and Mortality Weekly Report*“ der „Centers for Disease Control“, CDC in Atlanta, Georgia, Juni 1981) bezeichnet. Es ist definiert durch eine erworbene, zelluläre Immunschwäche, deren Grundlage ein Verlust an CD4-positiven T-Lymphozyten ist. Symptomatisch wird diese Lymphopenie von Infektionen mit opportunistischen Mikroorganismen (z.B. *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus spec.*, *Asperillus spec.*) und dem sehr seltenen Kaposi-Sarkom begleitet (BARRÉ-SIMOSSI, 2003).

Aufgrund der Übertragung durch Körperflüssigkeiten, vornehmlich Blut, wurde schnell ein infektiöses Agens als Krankheitsursache vermutet. LUC MONTANGIER publizierte 1983 unter der Bezeichnung LAV-1 (Lymphadenopathie-Virus 1) ein Retrovirus, das er aus Lymphozytenkulturen von Lymphadenopathiesyndrom-Patienten isoliert hatte, als möglichen AIDS-Erreger (BARRÉ-SIMOSSI *et al.*, 1983).

ROBERT GALLO beschrieb 1984, unter der Bezeichnung HTLV III (Human T lymphotropic Virus Type III), ein aus Lymphozyten von AIDS-Patienten isoliertes Retrovirus als möglichen Erreger (POPOVIC *et al.*, 1984). Bald stellte sich heraus, dass es sich um dasselbe Virus handelte, das seit 1985 unter der Bezeichnung HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus 1) bekannt ist (FAUCI, 2003).

2.2 HIV-1: Aufbau und Replikationszyklus

HIV-1 (s. Abb. 1) gehört zur Familie der *Retroviridae* und zur Unterfamilie *Lentivirinae*. Das virale Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen in Plus-Orientierung. An der so genannten Primerbindungsstelle (primer binding site) ist je ein Molekül t-RNA^{Lys3} angelagert, das als Primer für die reverse Transkription dient. Darüber hinaus sind die Enzyme Reverse Transkriptase (p66), Integrase (p31) und Protease (p11) mit der genomischen RNA assoziiert. Die Nucleocapsidproteine (p7) komplexieren die virale RNA.

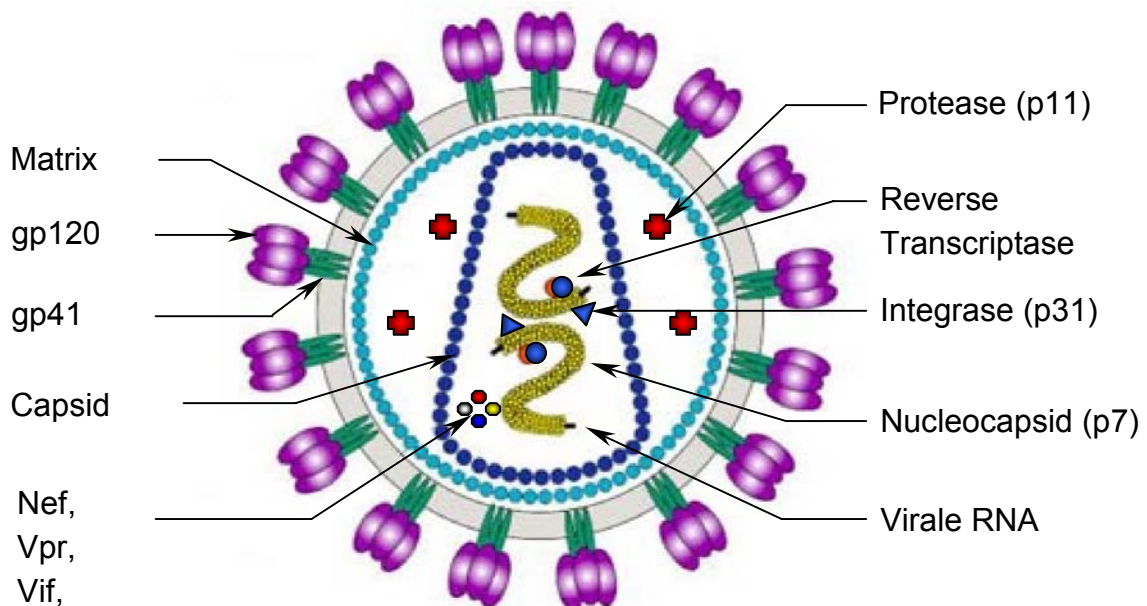


Abb. 1: Schematische Darstellung eines HIV-1-Viruspartikels. In die Hüllmembran sind die Hüllproteine als Heterotrimere eingelagert. Die zwei einzelsträngigen RNA-Genome sind im Nucleocapsid eingeschlossen.

Die Capsidproteine (p24) bilden um den Nucleoproteinkomplex eine konische Struktur, das Viruscapsid oder Core. Die Matrixproteine (p17) bilden eine netzartige Proteinschicht und gehen mit ihren Myristinsäureresten eine Verbindung mit der äußeren Hüllmembran ein. Die Hüllmembran, die sich von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet, umgibt das Viruspartikel. In diese sind die als Heterotrimere vorliegenden Hüllproteine (Glykoproteine, gp) eingebettet. Das Transmembranprotein gp41 ist über einen Bereich von circa 20 hydrophoben Aminosäuren in der Virusmembran verankert. Das Oberflächenprotein gp120 ist

nichtkovalent mit dem Transmembranprotein gp41 verbunden. Beide Glykoproteine werden durch Spaltung des Vorläuferproteins gp160 von zellulären Furinproteasen gebildet (HUNTER, <http://hiv-web.lanl.gov/HTML/reviews/gp41.html>). Die infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von 100 nm.

Die Virusreplikation (Abb. 2) wird durch die Bindung der gp120 Hüllproteinuntereinheit an den CD4-Rezeptor der Zielzelle eingeleitet. Nachfolgende Umlagerungen in der gp120-Untereinheit legen die Bindungsstelle für das Co-Rezeptorprotein frei, einem Molekül der β -Chemokin-Rezeptorfamilie CXCR4 oder CCR5 (DIMITROV *et al.*, 1998; BERGER *et al.*, 1998). Nach der Co-Rezeptorbindung wird durch erneute Umlagerungen innerhalb des gesamten Hüllproteinkomplexes das hydrophobe, N-terminale Ende der gp41-Untereinheit in die Zellmembran inseriert und die Membranen fusionieren (DIMITROV, 2000).

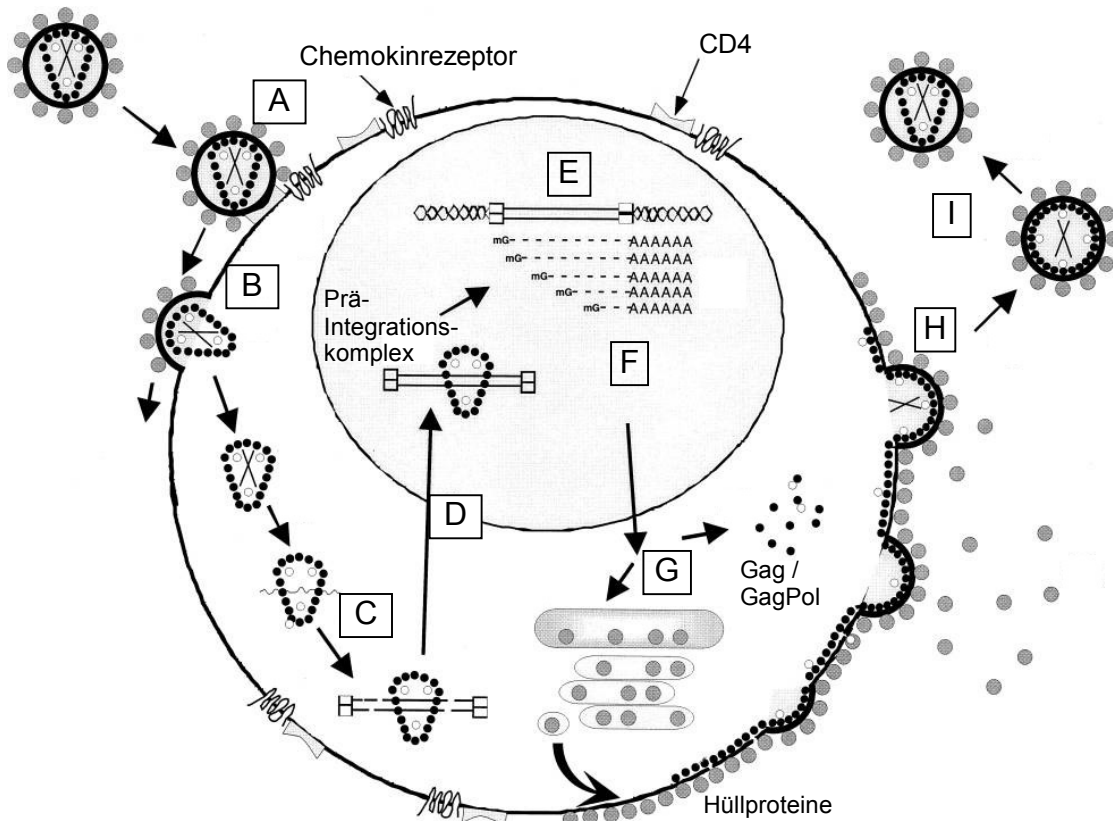


Abb. 2: Replikationszyklus des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1). Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Bindung des Virions an die Rezeptoren CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 (A). Virus- und Zellmembran verschmelzen miteinander (B) und das Capsid wird in das Cytoplasma entlassen („uncoating“). Noch im Cytoplasma wird das einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA revers transkribiert (C) und dann in den Nucleus transportiert (D). Hier findet die Integration (E) des viralen Genoms in das Zellgenom statt. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol II) nutzt die integrierte Virus-DNA (Provirus) als Template für die Transkription von mRNAs (F), die im Cytoplasma in virale Proteine übersetzt werden (G). An der Zellmembran werden die Nachkommenviren zusammgebaut und verlassen die Zelle („budding“, H). Innerhalb der abgeschnürten Partikel findet schließlich ein Reifungsprozess statt, bei dem die Protease virale Proteine spaltet (I).

Als Folge der Membranfusion wird das virale Capsid in das Cytoplasma entlassen. Die Reverse Transkriptase retrotranskribiert die Virus-RNA in komplementäre einzelsträngige DNA, und baut im Laufe dieses Prozesses die RNA-Matrize durch ihre RNase-H-Aktivität ab. Das Enzym besitzt keine Korrekturfunktion und fügt daher mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen in den neusynthetisierten Strang ein. Der gebildete DNA-Strang wird komplementär zu einem Doppelstrang ergänzt und gelangt mit Hilfe zellulärer Proteine der Karyopherin- α -Familie in den Nucleus (GALLEY *et al.*, 1996).

Das virale Enzym Integrase katalysiert die Integration des Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle. Hierfür schneidet sie die DNA der Wirtszelle, so dass überhängende 5'-Enden entstehen (BROWN *et al.*, 1999). Am viralen DNA-Genom werden von den 3'-Enden der beiden Stränge jeweils zwei Nucleotide entfernt und so ebenfalls überhängende 5'-Enden erzeugt. Die 5'-Enden der Zell-DNA werden mit den 3'-Enden des Virusgenoms verbunden und die beiden 5'-überhängenden viralen Nucleotide entfernt. Zelluläre Reparaturenzyme füllen die Lücken auf und schließen diese. Damit ist das Provirus (Abb. 3) stabil in das Wirtsgenom integriert.

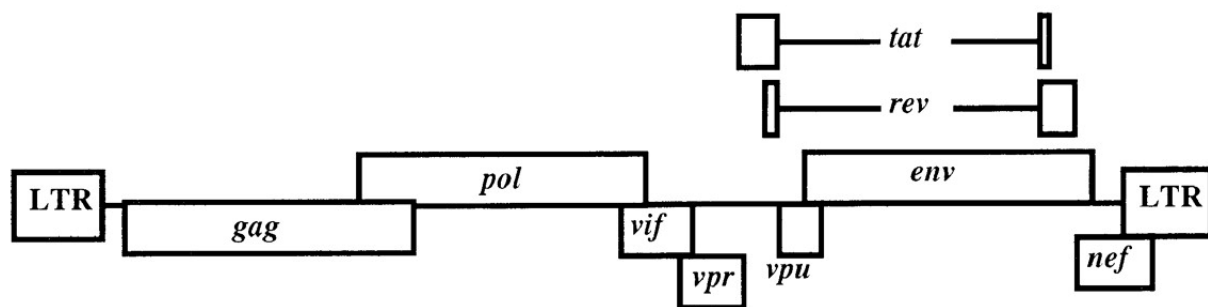


Abb. 3: Schematische Darstellung der Organisation des proviralen Genoms von HIV-1. (Orientierung von 5' nach 3')

Die Promotor-Sequenzen in der 5'-LTR steuern die Transkription der viralen Gene. Durch Bindung verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF κ B, wird die Bindung der RNA-Polymerase II ermöglicht. Die erste mRNA, die den Zellkern verlässt, ist mehrfach gespleißt und codiert für das Tat-Protein („transactivator of transcription“). Dieses bindet an die TAR-Sequenz (transactivation response element) in den LTR und erhöht die Transkription mehr als hundertfach, indem es die Transkripte stabilisiert und deren Elongation ermöglicht. In dieser frühen Phase findet man im Cytoplasma die mehrfach gespleißten mRNA-Moleküle, die für Tat, Rev und Nef codieren sowie einfach gespleißte mRNAs, die für Env, Vif, Vpu und Vpr codieren. Das Rev-Protein („regulator of expression of virion proteins“) ist verantwortlich für den Übergang von der frühen in die späte Replikationsphase. Es wandert in den Nucleus und bindet an die RRE-Sequenz („rev response element“) einfach- und ungespleißter mRNAs und ermöglicht deren Export ins Cytoplasma. Hier werden diese entweder translatiert oder als Virusgenome verpackt.

Dem Nef-Protein („negative factor“) werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. So verhindert es durch Internalisierung des CD4-Rezeptors die Überinfektion mit weiteren HIV (AIKEN *et al.*, 1994; GRZESIEK *et al.*, 1996) wodurch

die Effizienz der Virusreplikation gesteigert wird (GLUSHAKOVA *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen legen nahe, dass das Nef-Protein die Expression von MHC-Molekülen verringert und damit eine Präsentation von Viruspeptiden gegenüber Immunzellen unterbindet (SCHWARTZ *et al.*, 1996). Nef induziert allerdings auch die Synthese spezifischer Antikörper und aktiviert cytotoxische T-Zellen (HIV Molecular Immunology Database 2001, Los Alamos National Laboratory, HIV Molecular Database, <http://hiv-web.lanl.gov/immunology>).

Das env-Gen kodiert für das virale Hüllprotein. Dieses wird als Vorläuferprotein gp160 translatiert. Eine N-terminale Signalsequenz vermittelt die Translokation in das Lumen des Endoplasmatischen Reticulums. Hier aggregieren die Proteine zu Trimeren und werden im Gogi-Apparat von einer zellulären Furinprotease in die beiden Untereinheiten gp41 und gp120 gespalten (HUNTER, <http://hiv-web.lanl.gov/HTML/reviews/gp41.html>). Das Vpu-Protein verhindert während der Synthese des Hüllproteins dessen Bindung an CD4-Moleküle. Das Vif-Protein beeinflusst die Infektiosität der Nachkommenviren, die von bestimmten Zelltypen freigesetzt werden. Das Vpr-Protein scheint die Replikation und die Ausbildung des cytopathischen Effektes bei T-Zellen zu beschleunigen.

Die Gag-Proteine („group specific antigens“) werden von ungespleißten mRNAs als gemeinsames Vorläuferprotein translatiert. Das Matrixprotein bildet das N-terminale Ende des Vorläuferproteins, gefolgt von Capsid-, Nucleocapsid- und Link-Protein. Durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters während der Translation kommt es regelmäßig zur Bildung eines Gag/Pol-Fusionsproteins. Dieses enthält zusätzlich die Aminosäuresequenz der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase. Die autokatalytische Freisetzung der viralen Protease und die Spaltung in die einzelnen Enzymfunktionen erfolgt weitgehend erst während der Reifung des freigesetzten Viruspartikels.

Der Zusammenbau der Viruspartikel („virus assembly“) erfolgt an der Zellmembran, von der sich die infektiösen Virionen abschnüren („budding“). Die Nachkommenviren reifen nach der Freisetzung und leiten mit der Infektion neuer Wirtszellen einen weiteren Replikationszyklus ein.

2.3 Fusion von Virus- und Zellmembran

Die Infektion wird durch die Bindung der Hüllproteinuntereinheit gp120 an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle eingeleitet. Dies induziert konformationelle Veränderungen in der Struktur des gp120, die die Interaktion mit einem der Co-Rezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 ermöglicht (DIMITROV 1997; RIZZUTTO *et al.*, 1998, RIZUTTO *et al.*, 2000; BERGER *et al.*, 1999). Die Bindung an den Co-Rezeptor aktiviert die gp41-Untereinheit, die die Membranfusion vermittelt. Die Struktur des gp41 zeigt große Ähnlichkeit mit den Hüllproteinen anderer Viren, wie z. B. Influenzaviren, dem murinen Leukämievirus (MLV) und dem Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) (GALLAHER *et al.*, 1989; CARR *et al.*, 1997; HUGHSON, 1997; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1998, SINGH *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2000; LA VILLETTE *et al.*, 2001). Es besteht aus einem N-terminal gelegenen Fusionspeptid, dem sich zwei 4,3 hydrophobe Wiederholungen (heptad repeats, HR1 und HR2; Abb. 4 aus CHAN *et al.*, 1997) helikaler Struktur anschließen. Das carboxyterminale Ende des gp41 wird von einer Transmembrandomäne, die das Protein in der Virusmembran fest verankert, und einer cytoplasmatischen Domäne gebildet (HUNTER; <http://hiv-web.lanl.gov/HTML/reviews/gp41.html>).

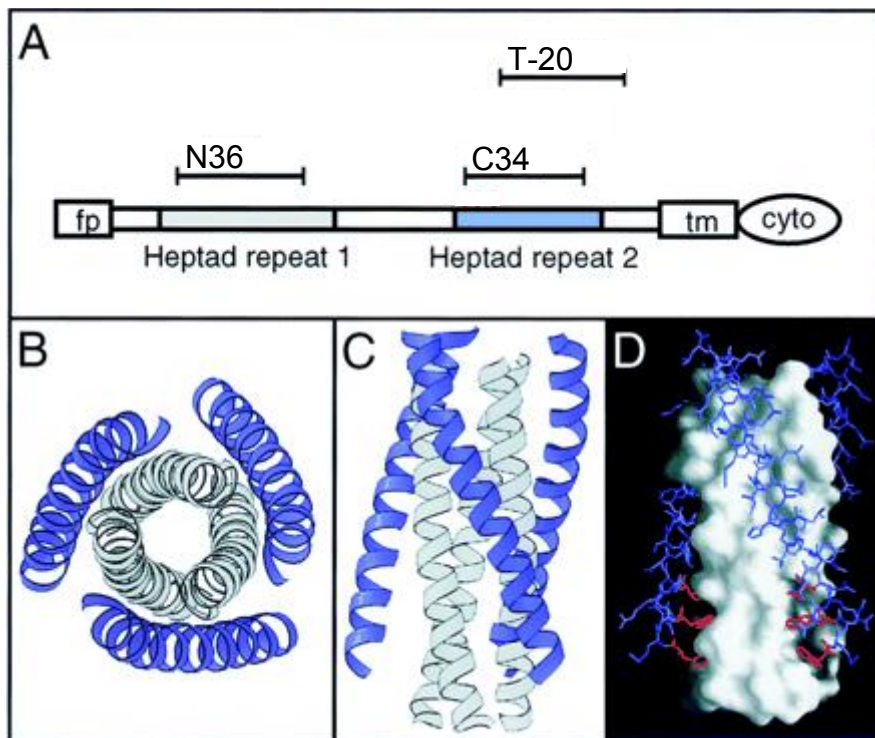


Abb. 4: Struktur des gp41-Glykoproteins und der davon abgeleiteten inhibitorischen Peptide. A) Die Transmembrandomäne (TM) und der cytoplasmatische Schwanz (cyto) verankern das gp41-Molekül in der Virusmembran. In Richtung N-Terminus schließen sich zwei Leuzin-Zipper-ähnliche Motive („heptad repeat“ 1 und 2) an, denen das hydrophobe Fusionspeptid folgt. B-D) Kristallstruktur des N36/C34-Komplexes. Die N-terminalen Helices des HR1 bilden ein inneres Trimer (hellblau), das von drei Helices des HR2 umschlossen wird (dunkelblau). Dieser Komplex bildet bei der Fusion das „Sechs-Helix-Bündel“ („coiled coil“).

Die N-terminalen Helices (HR1) von je drei gp41-Molekülen bilden ein helikales Trimer. Die C-terminalen heptad repeats (HR2) lagern sich in antiparalleler Orientierung um das zentrale Trimer und fügen sich hierbei in hydrophobe Taschen auf dessen Oberfläche ein. Nachdem gp120 an den Co-Rezeptor gebunden hat, lagert sich das gp41-Trimer in eine gestreckte Konformation (pre hairpin structure) um und inseriert das N-terminale Fusionspeptid in die Zellmembran. Anschließend falten sich die beiden helikalen Domänen in ein Sechs-Helix-Bündel und bringen damit Virus- und Zellmembran in unmittelbare Nähe zueinander (BIENIASZ *et al.*, 1997, TAN *et al.*, 1997, CHAN und KIM, 1998; GALLO *et al.*, 2003).

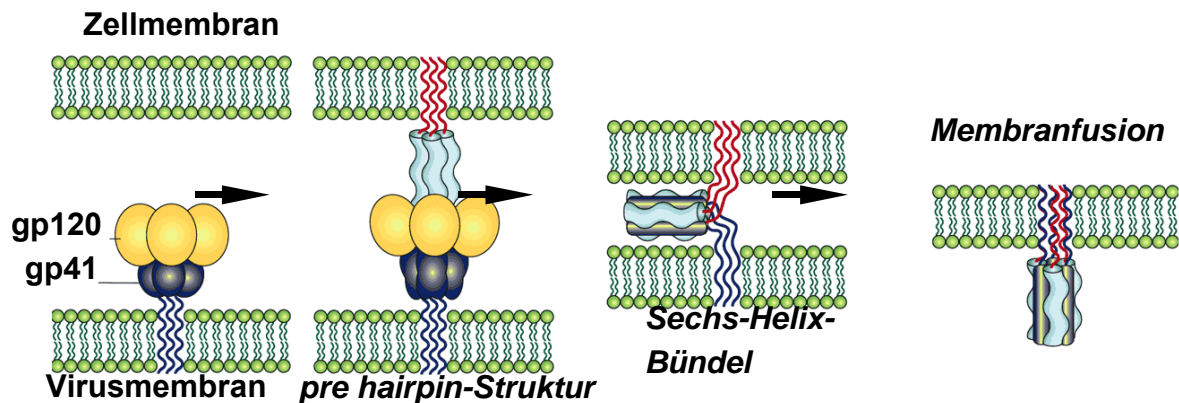


Abb. 5: Verlauf der Membranfusion. Nach der Bindung des gp120-Proteins an den CD4-Rezeptor und einen der beiden Co-Rezeptoren (CCR5 oder CXCR4) kommt es zu konformationellen Veränderungen, die dazu führen, dass gp41 die so genannte pre hairpin-Struktur ausbildet und dabei sein Fusionspeptid in die Wirtszellmembran inseriert. Anschließend falten sich die beiden helikalen Domänen in ein Sechs-Helix-Bündel („coiled coil“) und bringen damit Virus- und Zellmembran in unmittelbare Nähe zueinander, was zum Verschmelzen beider Membranen führt.

Die Bildung des Sechs-Helix-Bündels ist wahrscheinlich energetisch begünstigt und liefert damit die freie Energie für die Fusion von viraler und zellulärer Membran (LU *et al.*, 2001; MELIKYAN *et al.*, 2000). Die Membranfusion wird durch Peptide, die sich von den heptad repeats ableiten, gehemmt (vgl. Kap. 2.5.4.3).

2.4 Verlauf der HIV-Infektion

Die Primärinfektion verläuft meist inapparent, seltener mit grippe- oder mononucleoseähnlichen Symptomen. Vorübergehend sinkt die Zahl der CD4⁺ T-Zellen unter 500 μl^{-1} , wobei das Zahlenverhältnis zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten invertiert ($<0,5$). An die akute Phase schließt sich bei unbehandelten Patienten eine symptomfreie Latenzphase von 2-5 Jahren an. Dieser kann über mehrere Wochen oder Jahre das Stadium der Lymphadenopathie (LAS = Lymphadenopatisches Syndrom) folgen. Das LAS-Stadium kann in den AIDS-related complex (ARC) übergehen, der von Fieber, Gewichtsverlust und beginnenden opportunistischen Infektionen gekennzeichnet ist. Die Zahl der CD4⁺-Zellen kann unter 400 μl^{-1} absinken. Die HIV-Infektion kann in der Phase des LAS/ARC über Jahre stabil sein oder schnell in das Vollbild AIDS übergehen. Als kritische Grenze gilt eine CD4-Zellzahl von 200 μl^{-1} Blut. Zunehmende Defekte der zellvermittelten Immunantwort, die vor allem zu wiederkehrenden Infektionen und dem Auftreten maligner Tumoren führen, charakterisieren das Vollbild AIDS.

2.5 Aktuelle Therapie der HIV-Infektion - State of the HAART

Alle klassischen HAART-Regime basieren auf einem „Therapierückgrat“ aus zwei Nucleosidanaloga zur Hemmung der Reversen Transkriptase. Auf diesem aufbauend werden Proteaseinhibitoren oder nicht-nucleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren addiert.

(siehe auch: <http://www.niaid.nih.gov/publications/discovery/hiv.htm>;
http://www.fda.gov/fdac/features/1999/499_aids.html)

2.5.1 Reverse Transkriptaseinhibitoren – RTI

Die Reverse Transkriptase (RT) war das erste Ziel antiretroviraler Medikamente in der klinischen Anwendung. Die RTI stellen Substratanaloga dar und werden von der RT anstelle der natürlichen Nucleoside in die DNA eingebaut und führen zum Strangabbruch und damit zur Defektsynthese. Grundsätzlich unterscheidet man die nucleosidischen und die nicht-nucleosidischen RTI.

2.5.1.1 Nucleosidische RTI (NRTI)

Nucleosidische RTI sind künstliche Derivate natürlicher Nucleoside, denen die 3'-OH-Gruppe der Ribose fehlt (BRODER 1986, CHU *et al.*, 1988). Als Konsequenz kommt es nach Einbau eines NRTI zur Strangtermination, da die Bildung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen der DNA-Kette und dem nächsten Nucleotid nicht möglich ist. Alle nucleosidischen RTI müssen an der 5'-OH-Gruppe der Ribose von zellulären Phosphorylasen phosphoryliert und zu aktiven 5'-Triphosphaten konvertiert werden.

Eine Vielzahl an Nebenwirkungen wie z.B. Myelotoxizität, Laktatazidosen, Störungen des Fettstoffwechsels (insbesondere die Lipoatrophie) und Pankreatitiden werden den NRTI zugeschrieben. Ein großer Teil der Nebenwirkungen ist wahrscheinlich durch die mitochondriale Toxizität zu erklären (BRINKMAN *et al.*, 1999), da die NRTI auch mit der DNA-Synthese der Mitochondrien interferieren und Defektsynthesen provozieren. NRTI werden überwiegend renal eliminiert und interagieren nicht mit Medikamenten, die durch hepatische Enzymsysteme metabolisiert werden.

1987 kam AZT (Zidovudin, Retrovir®) als erstes antiretrovirales Medikament auf den Markt. AZT ist ein Thymidin-Analogon und wurde bereits 1964 als Medikament zur Krebstherapie entwickelt. Die fehlende Neurotoxizität und die gute Liquorgängigkeit sind Vorteile von AZT, das bis heute Bestandteil vieler HAART-Regime und Transmissionsprophylaxen ist. Weitere NRTI-Vertreter:

- D4T - Stavudin (Zerit®) war nach AZT das zweite Thymidin-Analogon.
- Abacavir (Ziagen®, Ziagenavir®) ist ein carbocyclisches 2'-Deoxyguanosin-Analog, das durch spezielle Enzyme phosphoryliert wird und nicht mit der Phosphorylierung anderer NRTI konkurriert.
- Didanosin (ddl, Videx®) ist ein Inosin-Analogon, das intrazellulär zum Didesoxyadenosin umgewandelt wird.

- Lamivudin (3TC, Epivir®) ist ein Cytidin-Analogon, das resistente Viren besonders schnell ausselektiert.
- Tenofovir (Viread®) enthält neben Pentose und Nukleinbase noch einen Phosphat-Rest. Das Medikament wird als Tenofovir DF (disoproxil fumarat) appliziert, das als Phosphonat durch eine Serumesterase vom Phosphonatanteil befreit und intrazellulär durch zwei Phosphorylierungsschritte aktiviert wird (ROBBINS *et al.* 1998).

2.5.1.2 Nicht-nucleosidische RTI

Die nicht-nucleosidischen RTI (NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors) sind eine Gruppe chemisch unterschiedlicher, polyzyklischer Verbindungen, die alle an die RT in der Nähe des katalytischen Zentrums binden. Durch die Bindung ändert sich die Konformation der RT, sodass diese ihr Substrat nicht mehr binden kann. NNRTI bedürfen keiner Aktivierung innerhalb der Zelle.

Die Gefahr der Entstehung von Kreuzresistenzen ist sehr hoch. Eine Punktmutation an der Position 103 (K103N) innerhalb der hydrophoben Bindungsstelle der RT genügt, und das Virus wird resistent gegen die gesamte Medikamentenklasse.

- Nevirapin (Viramune®) wurde als erster NNRTI zur HIV-Therapie zugelassen.
- Delavirdin (Rescriptor®) wird wegen der größeren Pillenzahl und einer täglich dreimaligen Einnahme kaum verschrieben, obwohl die virologische Effektivität vergleichbar zu der der übrigen NNRTIs ist (CONWAY, 2000).
- Efavirenz (Sustiva®) war der dritte NNRTI, aber der erste, bei dem nachgewiesen werden konnte, dass NNRTIs mindestens gleichwertig zu Proteaseinhibitoren sind (STASZEWSKI *et al.*, 1999). Die ausgesprochen lange Halbwertszeit ermöglicht eine tägliche Einmalgabe.

2.5.2 Proteaseinhibitoren – PI

Die HIV-Protease ist ein Homodimer aus 99 Aminosäuren. Sie spaltet das gag-pol-Polyprotein (160 kD) in die einzelnen Komponenten. Die Spaltung erfolgt bevorzugt zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten. Proteaseinhibitoren wurden als Verbindungen konstruiert, die das virale Substrat nachahmen (peptidomimetisch) und an das katalytische Zentrum binden, selbst aber keine spaltbare Peptidbindung aufweisen. Eine Langzeitbehandlung mit PIs führt oft zu Lipodystrophien und Dyslipidämien. Kreuzresistenzen treten sehr häufig auf und wurden bereits vor der Markteinführung dieser Substanzklasse beschrieben (CONDRA *et al.*, 1995). Alle PIs inhibieren hepatische Enzyme (CYP3A4-System) und interagieren mit zahlreichen Medikamenten.

PI-Vertreter sind:

- Saquinavir (Invirase® und Fortovase®) war im Dezember 1995 der erste PI, der für die HIV-Therapie zugelassen wurde.
- Ritonavir (Norvir®) war der erste Proteaseinhibitor, bei dem anhand klinischer Endpunktbestimmungen eine Wirkung nachgewiesen wurde (CAMERON *et al.*

1998). Ritonavir inhibiert das Isoenzym 3A4, eine Untereinheit des Cytochrom P450-Enzymsystems. Zugabe niedriger Dosen von Ritonavir steigern ("boostern") dadurch die Plasmaspiegel fast aller PIs (KEMPF *et al.*, 1997).

- Amprenavir (Agenerase®) wird hauptsächlich geboostert verwendet. Das Resistenzprofil von Amprenavir überlappt nur teilweise mit dem anderer PIs.
- Nelfinavir (Viracept®) war der vierte PI auf dem Markt.
- Indinavir (Crixivan®) zeichnet sich durch gute Liquorgängigkeit aus (MARTIN *et al.* 1999). Ungeboostert sinkt der Plasmaspiegel allerdings bereits nach 8 Stunden an die Grenze zur minimalen Hemmkonzentration ab.
- Lopinavir/Ritonavir (Lopinavir/r, Kaletra®) ist der jüngste Proteaseinhibitor und ist bereits geboostert. So wird eine Erhöhung der Lopinavir-Konzentration um mehr als das 100-Fache erzielt (SHAM *et al.*, 1998). Es zeigt ein günstiges Resistenzprofil, wahrscheinlich ist die Akkumulation von mindestens 6-8 PI-Resistenzen erforderlich, um zum Versagen der Therapie zu führen.

2.5.3 Integraseinhibitoren

Die Integrase wird im 3'-Bereich des *pol*-Leserahmen codiert. Sie wirkt sowohl als Endonuklease als auch als Ligase. Die Integrase bindet sich an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA übersetzten Virusgenoms und ist für dessen Integration in das Zellgenom verantwortlich.

Die Entwicklung wirksamer Integraseinhibitoren verläuft nur schleppend (DEBYSER *et al.*, 2002) und kein Integrasehemmer hat bis jetzt den Weg in die Klinik gefunden.

2.5.4 Eintrittsinhibitoren („entry inhibitors“)

Eine neue Gruppe der antiretroviralen Therapeutika sind die so genannten Eintrittsinhibitoren. Diese Verbindungen hemmen die Infektion der Zelle, indem sie die Fusion von Virus- und Zellmembran verhindern (D'SOUZA *et al.*, 2000; MOORE und STEVENSON, 2000; DOMS und MOORE, 2000). Hierbei lassen sich drei Schritte unterscheiden:

1. Die Bindung des Virus an den CD4-Rezeptor (Attachment-Inhibitoren).
2. Die Bindung an den jeweiligen Co-Rezeptor, CCR5 oder CXCR4 (Co-Rezeptor-Antagonisten).
3. Die eigentliche Fusion von Virus- und Zellemembran (Fusionsinhibitoren).

2.5.4.1 Attachment-Inhibitoren

BMS-806 bindet sehr spezifisch an gp120 und verhindert die Bindung an den CD4-Rezeptor (STEPHENSON *et al.*, 2002). Da die Interaktion über die gp120-Untereinheit des HIV-Hüllproteins erfolgt, ist die Wirkung unabhängig vom verwendeten Co-Rezeptortyp. Verschiedene HIV-Isolate sind unterschiedlich suszeptibel für diese Verbindung, was rasche Resistenzbildung wahrscheinlich macht.

Pro-542 ist ein lösliches multimeres CD4-Immunglobulin-Fusionsprotein, das ebenfalls an gp120 bindet. Es hat ein breites Wirkspektrum und neutralisiert klinische Isolate (TRKOLA *et al.*, 1995; GAUDUIN *et al.*, 1998).

2.5.4.2 Co-Rezeptor-Antagonisten

SCH-C ist ein CCR5-Rezeptor-Antagonist, der gegen zahlreiche HIV-Isolate aktiv ist (STRIZKI *et al.*, 2001). In gesunden Probanden sind bei höherer Dosierung Herzrhythmusstörungen aufgetreten. In einer Pilotstudie an 12 HIV-Patienten sank bei 10 Patienten die Viruslast um mehr als 0,5 Logstufen und bei 4 Patienten um mehr als 1,0 Logstufen (REYNES *et al.*, 2002). Für SCH-C wurden bereits resistente Mutanten beschrieben, die Kreuzresistenz gegenüber anderen CCR5-Antagonisten aufweisen (STARR-SPIRES und COLLMAN, 2002; TRKOLA *et al.*, 2002). Auch zum wirksameren SCH-D wurden Resistenzmutationen beschrieben (MAROZSAN *et al.*, 2005).

Pro-140 ist ein monoklonaler Antikörper, der als CCR5-Antagonist wirkt (TRKOLA *et al.*, 2001). Im SCID-Maus-Modell wurde eine dosisabhängige Reduktion der Viruslast beobachtet (FRANTI *et al.*, 2002). Klinische Daten fehlen allerdings zur Zeit noch.

AMD-3100 ist ein kleines Molekül aus der Bicyclam-Familie und stellt den potentesten nicht-peptidischen CXCR4-Rezeptor-Antagonist dar. Es inhibiert den Eintritt von HIV durch Bindung an anionische Reste innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife von CXCR4. AMD-3100 selektiert Viren vom R5-Typ (ESTÉ *et al.*, 1999) und verdrängt X4-Viren (SCHOLS *et al.*, 1997, VAN RIJ *et al.*, 2002). In einer Studie an 12 Patienten mit Dauerinfusion über 10 Tage, wurde kein Abfall der Viruslast nachgewiesen. Vielmehr traten Nebenwirkungen wie Thrombopenie, Orthostase und Herzrhythmusstörungen auf (HENDRIX *et al.*, 2002). Ein Patient, der ausschließlich mit R5-Viren infiziert war, zeigte nach 11 Tagen einen Abfall der Viruslast um 0,87 Logstufen, und nach 18 Tagen um 1,34 Logstufen. *In vitro* wurden bereits Resistenzmutanten vom HIV_{LAI} nachgewiesen (SCHOLS *et al.*, 1997, DONZELLA *et al.*, 1998).

2.5.4.3 Fusionsinhibitoren

T-20 (Enfuvirtide; Fuzeon®) ist ein Peptid (36 Aminosäuren, $M = 4492 \text{ g mol}^{-1}$) das sich von der HR2-Region von gp41 ableitet. Es bindet an das HR1-Trimer und verhindert damit die Bildung des Sechs-Helix-Bündels (CHAN und KIM, 1998; KLIGER und SHAI, 2000) und die Membranfusion (siehe auch Kap. 2.3). T-20 muss subkutan injiziert werden. Die Herstellung erfordert 106 chemische Reaktionen (gewöhnliche Synthesen benötigen 8-12 Reaktionen) und ist sehr teuer. *In vitro* inhibiert T-20 die gp41-vermittelte Membranfusion verschiedener HIV-Stämme mit IC_{50} -Werten in nanomolaren Konzentrationen (WILD *et al.*, 1994). Die IC_{50} -Werte für klinische Isolate liegen zwischen 0,22–220 nM. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 3,8 Stunden (ZHENG *et al.*, 2002), bei einem Plasmalevel von 0,7–1,1 μM (täglich zwei Gaben von je 90 mg). Klinische Studien haben gezeigt, dass die steady state Konzentration für ca. 12

Stunden aufrechterhalten wird (TRI-003; KILBY *et al.*, 2002). Mit täglich zweimaliger Verabreichung wurde, im Kontext einer optimalen Hintergrundtherapie, innerhalb von 16 Wochen eine Reduktion der Viruslast von 2-2,5 \log_{10} Kopien ml^{-1} erzielt (LALEZARI *et al.*, 2003). Eine Reihe von Autoren (DERDEYN *et al.*, 2000, 2001; Reeves *et al.*, 2002) publizierten Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen, wonach Stämme, die CCR5 als Co-Rezeptor verwenden weniger gehemmt werden als Stämme, die CXCR4 verwenden. In klinischen Studien der Phase II (T20-205, T20-206 und T20-208) wurden bei 78% der Patienten mit virologischem Versagen der Therapie Aminosäuresubstitutionen im gp41 nachgewiesen. Am häufigsten traten dabei Substitutionen an den Positionen 36, 38, 42 und 43 auf (SISTA *et al.*, 2002).

T-1249 ist ebenfalls ein peptidischer Fusionsinhibitor der an die pre hairpin-Struktur des gp41 bindet. Die Substanz weist eine günstige Pharmakokinetik auf, die tägliche Einmalgaben ermöglicht. T-1249 wirkt auch gegen T-20-resistente Viren (LAMBERT *et al.*, 1999). Daten von einer klinischen Studie der Phase I/II (ERON *et al.* 2001, GULICK *et al.* 2002), in der 72 intensiv vorbehandelte HIV-Patienten über 14 Tage nur mit T-1249 behandelt wurden (6,25-50 mg pro Tag, subkutan), zeigten eine dosisabhängige Reduktion der Viruslast (maximal 1,4 \log_{10} Kopien ml^{-1} bei 50 mg). 40% der Patienten zeigten Reaktionen an der Einstichstelle, bei einem Patienten wurde eine Neutropenie Grad 4 und ein Exanthem mit Fieber beobachtet. *In vitro* ist die Selektion T-1249-resistenter Virusisolate bereits gelungen.

2.6 Gentherapie der HIV-Infektion

Gen- und immuntherapeutische Verfahren bieten Alternativansätze zur konventionellen ART (BLAESE *et al.*, 1995; GOTTFREDSSON und BOHJANEN *et al.*, 1997, MANCA *et al.*, 1997; NABEL, 2001; McMICHAEL und HANKE, 2003). Durch die Expression antiviraler Gene, wie dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten M87o, wird an verschiedenen Stellen versucht den Replikationszyklus des Virus zu inhibieren und damit den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.

2.6.1 Therapeutische Gene

Zahlreiche gen- bzw. immuntherapeutische Ansätze wurden bereits vorgeschlagen (BUCHSCHACHER and WONG-STAAAL, 2001). Grundsätzlich basieren diese auf zwei unterschiedlichen Strategien:

1. Eliminierung HIV-infizierter Zellen durch HIV-abhängige Induktion von Apoptose oder durch die Verstärkung HIV-spezifischer immunologischer Reaktionen (BUCHSCHACHER and WONG-STAAAL, 2001; YANG, 2004):
 - HIV-aktivierte Caspasen (VOCERO-AKBANI *et al.*, 1999).
 - Toxine, die gegen HIV-infizierte Zellen gerichtet sind (McCOIG *et al.*, 1999; SAAVEDRA-LOZANO *et al.*, 2002).
 - CD4zeta, ein „universeller T-Zellrezeptor“, der cytotoxischen T-Zellen das MHC-unabhängige Erkennen HIV-infizierter Zellen ermöglicht (ROBERTS *et al.*, 1994; MITSUYASU *et al.*, 2000; BITTON *et al.*, 1999).
 - Genetische Vakzinierung zur Verbesserung der HIV-spezifischen Immunantwort (GALPIN *et al.*, 1994).
2. Schutz der Wirtszelle vor den cytopathischen Effekten des Virus durch die Expression antiviraler Gene, die mit dem Replikationszyklus von HIV interferieren. Derartige Ansätze werden auch als "intrazelluläre Immunisierung"¹ bezeichnet:
 - sCD4 (lösliches, soluble CD4), ein CD4-Derivat, das von den genetisch modifizierten Zellen sekretiert wird und mit zellgebundenem CD4 um Bindung an das gp120-Hüllprotein kompetitiert (MORGAN *et al.*, 1990; 1994).
 - Dominant-negative Derivate viraler Proteine wie Tat und Rev (WOFFENDIN *et al.*, 1996; BONYHADI *et al.*, 1997; PLAVEC *et al.*, 1997; RANGA *et al.*, 1998).
 - Membrangebundene C-Peptide, die die Fusion von Virus- und Zellmembran verhindern (HILDINGER *et al.*, 2001, EDELHOFER *et al.*, 2004).
 - Antivirale RNA-Moleküle wie Antisense-RNAs (VANDENDRIESSCHE *et al.*, 1995; MANCA *et al.*, 1997) und Ribozyme (KLEBBA *et al.*, 2000).
 - Abkömmlinge viraler RNA-Elemente, die um virale Proteine kompetitieren (SULLENGER *et al.*, 1990) wie z. B. das RRE-decoy (RRE-Köder). Durch

¹ Ein nicht ganz präziser Terminus, da der Wirkmechanismus keiner immunologischen Reaktion bedarf.

Expression eines 41 Basenpaar großen RRE-Fragmentes wird der Rev-vermittelte Kernexport ungespleißter viraler mRNAs gehemmt (BAHNER *et al.*, 1996).

- siRNAs (small interfering RNA, 21 - 23 Basen), hybridisieren mit der viralen mRNA und führen dadurch zu deren Spaltung (CAPODICI *et al.*, 2002).

Nur ein kleiner Teil der mehr als $1 \cdot 10^{11}$ CD4⁺ Zellen, die ein Patient mit sich trägt, kann im Rahmen eines gentherapeutischen Verfahrens *ex vivo* manipuliert werden. Daher ist für den Erfolg einer somatischen Gentherapie entscheidend, ob das eingesetzte antivirale Gen den modifizierten Zellen einen Überlebensvorteil verleiht, der eine *in vivo*-Akkumulation der „therapeutischen“ Zellen ermöglicht. VON LAER und BRANDENBURG (2001) haben die nachfolgende Klassifizierung antiviraler Gene vorgeschlagen:

- Klasse I Gene: Gene, die Replikationsschritte vor Integration der viralen DNA inhibieren und damit die Etablierung des Provirus verhindern. Vertreter dieser Klasse sind beispielsweise Einzelkettenantikörper (single-chain antibodies) gegen die Reverse Transkriptase und die Integrase, sowie membrangebundene Peptide wie das von M87o exprimierte C46-Peptid (EGELHOFER *et al.*, 2004), die den Viruseintritt in die Zelle hemmen.
- Klasse II Gene: Sie hemmen die Expression der viralen Gene und verringern die Virusproduktion. Die infizierte Zelle wird zusätzlich vor dem cytopathischen Effekt der Virusproteine geschützt. Beispiele sind das RRE-decoy (KOHN, 2000) und RevM10 (transdominantes Rev, WOFFENDIN *et al.*, 1996).
- Klasse III Gene: Sie inhibieren den Zusammenbau und die Freisetzung infektiöser Virionen. Die Zelle wird dabei weder vor cytopathischen Effekten des Virus noch vor der Zerstörung durch das Immunsystem geschützt. Zur Klasse III gehören z. B. transdominantes Gag (TRONO *et al.*, 1989) und Gag-Nuclease-Fusionsproteine (SCHUMANN *et al.*, 2001).

Bisher wurden ausschließlich Gene der Klasse II in klinischen Studien untersucht. Diese zeigten *in vitro* die größte inhibitorische Potenz. Ein entscheidender Nachteil besteht allerdings darin, dass sie lediglich die Virusproduktion reduzieren, die Integration des Provirus aber nicht verhindern. Diesen Nachteil teilen sie mit den Klasse III Genen. Die latent infizierten Zellen können sehr lange überleben und toxische Genprodukte wie z. B. das Tat-Protein produzieren (KOLSON *et al.*, 1994). Ein weiterer Nachteil der späten Interferenz ist die fehlende Hemmung der reversen Transkription. Dieser Schritt ist für die hohe Mutationsrate des Virus verantwortlich und macht Klasse II und III Gene anfällig gegenüber Resistenzmutationen. Mathematische Modellierungen ergaben, dass auf lange Sicht gesehen nur Gene, die die Etablierung des proviralen Stadiums inhibieren (Klasse I-Gene), genetisch modifizierten Zellen einen effektiven Selektionsvorteil verleihen und damit eine therapeutische Wirkung ermöglichen (VON LAER *et al.*, 2005).

2.6.2 M87o – Ein neuer Vektor für die Gentherapie der HIV-Infektion exprimiert ein Klasse I Gen und inhibiert den Eintritt des Virus in die Zelle

Der peptidische Fusionsinhibitor T-20 (36 Aminosäuren, $M = 4492 \text{ g mol}^{-1}$) leitet sich von der HR2-Region des gp41 ab und kann spezifisch an das HR1-Trimer im gp41 binden. Dadurch wird die Bildung der Sechs-Helix-Bündel-Struktur (siehe Kap. 2.3, s. 8) verhindert und die Fusion von Virus- und Zellmembran unterbleibt (WILD *et al.*, 1994; KILBY *et al.*, 1998). T-20 inhibiert folglich die Etablierung des Provirus und kann deshalb zu den antiviralen Prinzipien der Klasse I gerechnet werden. *In vitro* inhibiert T-20 die gp41-vermittelte Membranfusion verschiedener HIV-Stämme mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Konzentrationsbereich (WILD *et al.*, 1994). T-20 muss mehrfach täglich intravenös verabreicht werden, wobei die Plasmahalbwertszeit nur 3,8 Stunden beträgt (ZHANG *et al.*, 2002). Die Herstellung ist sehr teuer.

Das T-20-Peptid diente als Modell für die Entwicklung eines neuartigen antiviralen Gens. Der retrovirale Vektor M87o



Abb. 6, retrovirale Vektoren siehe Kap. 2.6.3.1, s. 19) exprimiert ein 46 Aminosäuren langes Derivat der HR2-Region von gp41 (Aminosäuren 643-678) als membranverankertes Fusionsprotein, das in analoger Weise in der Lage ist die Fusion von Virus- und Zellmembran zu unterbinden (EGELHOFER *et al.*, 2004).



Abb. 6: Der retrovirale Vektor M87o exprimiert ein antivirales Gen der Klasse I. Es besteht aus dem Signalpeptid von LNGFR (S), dem inhibitorischen C46-Peptid, der Gelenkregion des humanen IgG2- (huHIgG2) und der Transmembrandomäne des humanen tCD34 (tCD34-MSD). 3' zum Transgen befindet sich ein post-transcriptional responsive element des Woodchuck-Hepatitis B-Virus (wPRE). Als zweites inhibitorisches Prinzip ist eine RRE-decoy-Sequenz (RRE) vor der 3'-LTR inseriert. (SD = Spleiß-Donor, SA = Spleiß-Akzeptor, Ψ = Verpackungssignal psi, Abbildung nicht maßstabsgetreu)

Im Gegensatz zum T-20 wird das inhibitorische C46-Peptid einerseits direkt am eigentlichen Wirkort, der Oberfläche der T-Zelle exprimiert, andererseits schließt es eine zusätzliche Aminosäuresequenz ein, von der CHAN *et al.* (1998) zeigen konnten, dass sie mit einem konservierten Bereich im gp41 interagiert und damit das Risiko der Resistenzbildung reduziert. N-terminal ist das C46-Peptid mit dem Signalpeptid des LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor) fusioniert, das die Translokation in das Endoplasmatische Reticulum vermittelt. Als flexible Verbindung zum tCD34-Membrananker (COMOLI *et al.*, 1996), der das inhibitorische Peptid an der

extrazellulären Seite der Plasmamembran verankert, dient die Gelenkregion des humanen IgG2. Zusätzlich zum C46-Peptid enthält M87o ein zweites inhibitorisches Prinzip, ein 41 Basenpaare großes Fragment des RRE (rev response elements). Diese RNA-Struktur inhibiert den Rev-vermittelten Export einfach- und ungespleißter Virus-RNA (RRE-decoy, BAHNER *et al.*, 1996; BAUER *et al.*, 1997; BAHNER *et al.*, 1997; KOHN *et al.*, 1999; KOHN, 2000). Nachdem HIV über gp120 an CD4- und den entsprechenden Co-Rezeptor gebunden hat, bildet gp41 die gestreckte pre hairpin-Struktur aus (Kap. 2.3, s. 8). Durch Bindung an die HR1-Region von gp41 verhindert das C46-Peptid die Ausbildung der Sechs-Helix-Bündel-Struktur und damit die Fusion von Virus- und Zellmembran (Abb. 6).

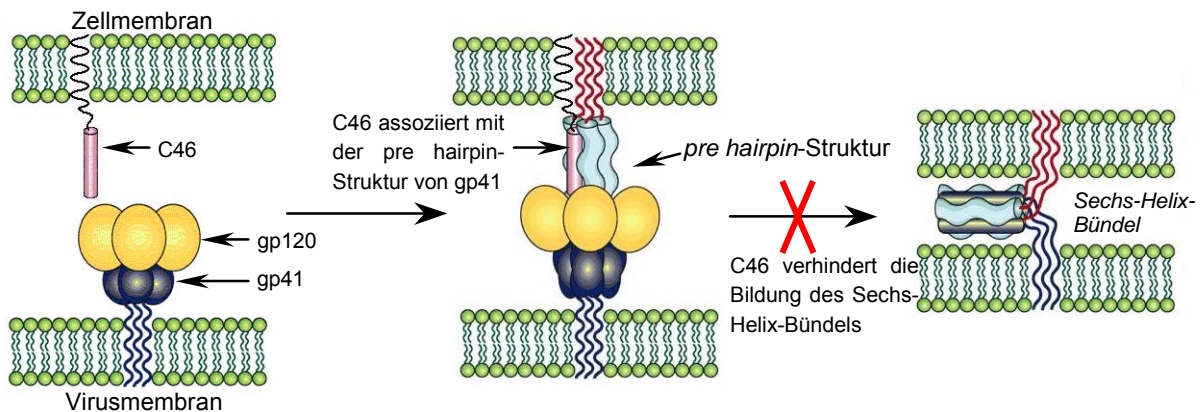


Abb. 7: Das inhibitorische C46-Peptid verhindert die Bildung der Sechs-Helix-Bündel-Struktur. Nach Bindung von HIV gp120 an den CD4-Rezeptor und den Co-Rezeptor lagert sich gp41 in die gestreckte pre hairpin-Struktur um. In dieser Konformation ist die HR1-Region von gp41 für das C46-Peptid zugänglich. Dadurch die Bildung an die HR1-Region verhindern das C46-Peptid die Bildung des Sechs-Helix-Bündels und damit die die Infektion der Zielzelle.

2.6.3 Vektoren in der Gentherapie

Der Transfer von Genen in Zielzellen erfolgt mit Hilfe von Gentransfer-Vehikeln, so genannten Vektoren. Der ideale Vektor für die Gentherapie sollte:

1. Eine hohe Gentransfereffizienz ermöglichen.
2. Eine hohe Selektivität für die Zielzellen aufweisen.
3. Ein therapeutisch wirksames Expressionsniveau erzielen und in der Regel anhaltende Expression gewährleisten.
4. Keine cytopathischen Effekte besitzen.
5. Nicht mobilisierbar sein.

Viren, von denen sich die meisten Vektoren ableiten, haben sehr effektive Strategien zur Übertragung von genetischem Material evoluiert. Die bisher am Häufigsten in klinischen Studien eingesetzten Vektoren leiten sich von Retro- und Adenoviren ab.

2.6.3.1 Retrovirale Vektoren

Die am besten erforschten Vektoren sind retroviralen Ursprungs und basieren meist auf C-Typ Mäuseleukämieviren (MLV, murine leukemia virus). Retroviren weisen ein breites Wirtszellspektrum auf und integrieren ihr genetisches Material stabil in das

Genom der Wirtszelle. Retrovirale Vektoren sind Derivate replikationskompetenter Viren, deren Strukturgene durch ein oder mehrere Transgene ersetzt wurden (Verpackungsgrenze: 10 kb). Durch den Verlust der *trans*-aktiven Strukturgene (*gag*, *pol* und *env*) sind diese Vektoren nicht mehr in der Lage in der Wirtszelle zu replizieren, sie sind replikationsinkompetent. Alle *cis*-aktiven Elemente sind jedoch in den LTRs des Provirus enthalten und gewährleisten RNA-Dimerisierung und Verpackung (ψ -Signal) in Vektorpartikel, reverse Transkription und Integration des Vektorgenoms sowie Transkription des Transgens (KAY *et al.*, 2001). Die stabile Integration erlaubt eine lang anhaltende Genexpression und führt dazu, dass die Vektorsequenz an Tochterzellen vererbt wird. Aus diesen Gründen sind retrovirale Vektoren die bis heute am häufigsten eingesetzten Gentransfervehikel (FEHSE *et al.*, 1998, FISCHER *et al.*, 2002).

Zur Gewinnung retroviraler Vektorpartikel werden so genannte Verpackungszellen eingesetzt (MILLER *et al.*, 1990). Diese exprimieren die für die Vektorverpackung notwendigen Strukturgene. Moderne Verpackungszelllinien wie z. B. PG13 (MILLER *et al.*, 1991) tragen die genetische Information des *gag/pol*- und des *env*-Gens auf getrennten Sequenzen (Verpackungskonstrukte). Diese Expressionskonstrukte weisen Deletionen im Verpackungssignal ψ und den LTR-Sequenzen auf. Dadurch wird deren Inkorporation in Vektorpartikel verhindert und die Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCR) vermieden. Die Verwendung eines separaten Konstruktes zur Kodierung des *env*-Gens erlaubt darüber hinaus den Einsatz heterologer Hüllproteine (Pseudotypisierung) und damit die gezielte Veränderung des Vektortropismus (MILLER, 1996; KAY *et al.*, 2001).

MLV-basierende retrovirale Vektoren sind allerdings nicht in der Lage ruhende Zellen zu infizieren. Nur wenn die Kernmembran der Zelle aufgelöst ist, hat das revers transkribierte Virusgenom Zugang zum Wirtsgenom (LEWIS und EMERMAN, 1994; LIEBER *et al.*, 2000). Da die Integration des Provirus in die Wirts-DNA nicht zielgerichtet ist, besteht bei der Verwendung retroviraler Vektoren immer die Gefahr der Insertionsmutagenese und einer daraus resultierenden Onkogenese (DONAHUE *et al.*, 1992; BAUM *et al.*, 2003; CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2004).

2.6.3.2 Lentivirale Vektoren

Die meisten lentiviralen Vektoren leiten sich von HIV ab. Im Gegensatz zu den MLV-basierenden onkoretroviralen Vektoren können diese auch ruhende Zellen transduzieren (NALDINI *et al.*, 1996). Sie besitzen darüber hinaus mit 18 kb eine deutlich höhere Verpackungskapazität. Die revers transkribierte Virus-DNA gelangt mit Hilfe von zellulären Kernimportproteinen in den Zellkern (GALLAY *et al.*, 1996, LEWIS und EMERMAN, 1994). Noch fehlen allerdings stabile Verpackungszelllinien für die Vektorproduktion in größerem Maßstab. Außerdem besteht das Risiko der Bildung von replikationskompetenten Lentiviren bei der Vektorproduktion. Ähnlich wie bei onkoretroviralen Vektoren besteht auch bei Lentiviren das Risiko der Insertionsmutagenese unter Aktivierung von Proto-Onkogenen. Weiterhin bestehen Bedenken hinsichtlich der Interaktion der Gene des Lentivirus mit endogenen

Retroviruselementen in den Zielzellen. Dies gilt in besonderem Maße für HIV-infizierte Patienten.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die präklinische Vorbereitung einer klinischen Studie zur Gentherapie der HIV-Infektion mit M87o (Phase I/II).

Hierbei sollte zunächst *in vitro* die inhibitorische Potenz des neuartigen retroviralen Vektors M87o überprüft werden.

Anschließend sollten, im Rahmen von Untersuchungen zur Unbedenklichkeit von M87o, das geno- und phänotoxische Potential von M87o *in vitro* untersucht werden.

Für die Durchführung einer präklinischen Studie zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie im Rhesusaffenmodell sollte ein Protokoll zur effizienten Transduktion von Rhesusaffenlymphozyten erarbeitet werden, das die geplante klinische Applikation möglichst gut simuliert.

Im Hinblick auf die spätere Anwendung in einer klinischen Studie (Phase I/II) zur Gentherapie der HIV-Infektion mit M87o sollte ein Protokoll zur Transduktion von CD4⁺ T-Zellen HIV-infizierter Spender im Versuchsmaßstab entwickelt werden. Das definierte Studienkollektiv bestand aus Patienten mit multiplem Therapieversagen, einer Viruslast von >5.000 Kopien ml⁻¹ Blut und eine CD4-Zellzahl von 50 - 200 µl⁻¹ Blut. Zum Abschluss der Arbeit sollte das Transduktionsprotokoll in den klinisch relevanten Maßstab übersetzt werden. Dabei sollte sichergestellt werden, dass pro Spender mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen geerntet werden können, gleichzeitig sollte die Virusreplikation vollständig und zuverlässig inhibiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmedien, -Zusätze, Puffer, Cytokine, antiretrovirale Therapeutika und Chemikalien

Medium / Puffer / Mediumzusatz	Hersteller/Vertrieb
DMEM	Gibco BRL/Life Technologies
Hepes-Puffer 1M	Invitrogen
PBS	Gibco BRL/Life Technologies
PBS/EDTA-Puffer	Miltenyi Biotec
PBST	PBS 0,1% Tween 20
RPMI 1640	Gibco BRL/Life Technologies
X-VIVO 10	BioWhittaker
X-VIVO 15	BioWhittaker
Agar-Agar	Sigma
Agenerase, Amprenavir	Glaxo Wellcome Operations
Chloroquine	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
DMSO	Serva
Epivir, Lamivudine (3TC)	Glaxo Wellcome Operations
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL/Life Technologies, PAN Biotech
Fuzeon, Enfuvirtide (T-20)	Hoffmann-La Roche Inc.
Gentizin (G418)	Gibco BRL/Life Technologies
Humanes AB-Serum	BioWithaker
Humanes Serumalbumin (20%)	Baxter
IL-2 (Proleukin S $1,8 \cdot 10^7$ IE)	Chiron GmbH
L-Glutamin	Gibco BRL/Life Technologies
Methyl- ³ H-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech
Natriumpyruvat	Gibco BRL/Life Technologies
Norvir, Ritonavir	Abbott
NP40	Sigma
Polybrene	Sigma
Retronectin	TaKaRa Biomedicals
Retrovir, Zidovudin (AZT)	Glaxo Wellcome Operations
Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA)	BioWithaker
Tween20	Sigma
Videx, Didanosin (ddI)	Bristol-Meyers Squibb
Viracept, Nelfinavir	Hoffmann-La Roche AG
Zerit, Stavudine (D4T)	Bristol-Meyers Squibb

3.1.2 Antikörper und immunomagnetische Beads

Antikörper	Hersteller/Vertrieb
Ziege- α -human-IgG-PE: Phycoerythrin-gekoppelter Antikörper aus Ziegen – bindet spezifisch an die F _c -Region von löslichen humanen Antikörpern	Dianova
OKT-3	Ortho Biotech
α gp41 2F5: monoklonaler humaner Antikörper, der das Epitop ELDKWA im „heptad repeat“ 2 von HIV-1 gp41 erkennt	MUSTER <i>et al.</i> , 1993; BUCHACHER <i>et al.</i> , 1994; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Katinger
Ziege- α -human- IgG-HRPO	Dianova
α human CD3	Becton Dickinson, Pharmingen
α human CD4	Becton Dickinson, Pharmingen
α human CD8	Becton Dickinson, Pharmingen
α human CD25	Becton Dickinson, Pharmingen
α human CD45RA	Becton Dickinson, Pharmingen
α human CD16	Becton Dickinson, Pharmingen
FN-18	Becton Dickinson, Pharmingen
SP34	Becton Dickinson, Pharmingen
Leu28	Becton Dickinson, Pharmingen
MACS CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Dynal CD8-Beads	Dynal
Xcyte DynaBeads (α CD3/ α CD28)	Dynal

3.1.3 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
M51	Retroviraler Vektor (MP1neo), der ausschließlich das Neomycinresistenzgen exprimiert.	VON LAER <i>et al.</i> , 1998
M56a	Retroviraler Vektor mit MP71-Leader, der das Markergen GFP exprimiert	SCHAMBACH <i>et al.</i> , 2000
M57	<i>gagpol</i> -Helferplasmid für die Produktion retroviraler Partikel	BEYER <i>et al.</i> , 2001
M130	GALVenv-Helferplasmid (<i>Gibbon ape leukemia virus</i> -Hüllprotein) für die Pseudotypisierung retroviraler Partikel.	STITZ <i>et al.</i> , 2000
M318	Retroviraler Vektor, der des großen T-Antigens des SV40-Virus (Simian Virus 40, Papovaviridae) exprimiert.	E. WILL, Heinrich-Pette-Institut Hamburg.

3.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium	Referenz / ATCC-Nr.
Anjou65	Humane Nierenepithelzellen	DMEM, 10% FKS	KINSELLA & NOLAN, 1996; CRL-11269
PM-1	Humane T-Zelllinie, exprimiert CXCR4 und CCR5	RPMI, 10% FKS	LUSSO <i>et al.</i> , 1995
Rat-1	Rattenfibroblastenzelllinie	DMEM, 10% FKS	KROSL <i>et al.</i> , 1998, SMALL <i>et al.</i> , 1987, RICKETTS <i>et al.</i> , 1988
TZM-bl	Humane Mammacarzinomlinie	DMEM, 10% FKS	KIMPTON & EMERMAN 1992

3.1.5 HIV-Stämme

HIV-Stamm	Referenz
D117II	RÜBSAMEN-WAIGMANN <i>et al.</i> , 1989
HV57	P. Schult-Dietrich, AG von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. M.
NL-4,3	ADACHI <i>et al.</i> , 1986

3.1.6 Geräte und Materialien

Gerät und Materialien	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	Kern
Auflichtmikroskop	Leica
Aussschwingzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Brutschrank Cytoperm für die Zellkultur	Heraeus
Cell Washer	Tecan
CliniMACS Zellseparator	Miltenyi Biotec Inc.
CytoMate	Baxter
Durchflusszytometer: FACSCalibur & Software CellQuestPro	Becton Dickinson
Dynal MPC-1 Separationsmagnet	Dynal
EDTA-Monovetten (9,5 ml Füllvolumen)	Sarstedt
Einfrierröhrchen	Nunc
ELISA-Reader Spectrafluorplus	Tecan
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Handzählgerät	Medica
Heizblock	Techne England
Hyperfilm EC	Pharmacia
Kova Glasstic Slide 10, Zählkammer	Hycor
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20	Beckman
Membranfilter, Porengröße 0,45µm, low protein binding	Millipore
MACSep	Miltenyi Biotec Inc.
MidiMACS, Separationsvorrichtung	Miltenyi Biotec Inc.
Mikroskop	Leica
pH-Meter Mettler Toledo	Mettler
Rührer RCT Basic	IKA
Serummonovetten	Sarstedt
Sterilbank für Zellkulturen HERAsafe HS12	Heraeus
Vortex Genie 2	Bender und Hobein
Wasserbad	GFL
Zählkammer	nach NEUBAUER

3.1.7 Verwendete Testkits

Kit	Hersteller/Vertrieb
Innotest HIV Antigen mAB Kit	Innogenetics
Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Kalziumphosphat-Transfektionskit	Sigma

3.2 Methoden

3.2.1 Standardzellkultur

Alle Zelllinien und Primärzellen wurden, soweit nicht abweichend beschrieben, bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 7 Vol.-% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

3.2.1.1 Suspensionszellen

Soweit nicht abweichend beschrieben, wurden Suspensionszellen mit RPMI 10% fötalem Kälberserum (FKS), L-Glutamin 2 mM, Streptomycin 50 µg ml⁻¹ und Penicillin 50 U ml⁻¹ kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage geteilt, wobei eine Zelldichte zwischen 1 · 10⁵ und 1 · 10⁶ Zellen ml⁻¹ aufrechterhalten wurde.

3.2.1.2 Adhärentwachsende Zellen

Soweit nicht abweichend beschrieben, wurden adhärenwachsende Zellen mit DMEM 10% fötalem Kälberserum (FKS), L-Glutamin 2 mM, Streptomycin 50 µg ml⁻¹ und Penicillin 50 U ml⁻¹ kultiviert. Die Zellen wurden je nach Teilungsrate zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Zunächst wurden die Zellen mit PBS (vorgewärmt auf 37 °C) gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA in Hanks' Balanced Salt Solution ohne Kalzium und Magnesium, Biowithaker) überschichtet und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden von der Kulturoberfläche gelöst und in Medium gewaschen (Zentrifugation: 5 min, 1.600 U min⁻¹), in frischem Medium resuspendiert und in einer geeigneten Zelldichte in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

3.2.1.3 Primäre Blutzellen

Soweit nicht abweichend beschrieben, wurden primäre Blutzellen in X-Vivo 15 mit 5% humanem, hitzinaktiviertem AB-Serum, L-Glutamin 2 mM, IL-2 100 U ml⁻¹, HEPES-Puffer 20 mM kultiviert. Alle 1-3 Tage wurde die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung ermittelt (Kap. 3.2.2) und auf eine Zelldichte von 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹ eingestellt.

3.2.2 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschluß

Die Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung beruht auf dem Ausschluss des sauren Trypanblau durch die intakte Plasmamembran lebender Zellen. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind an der Blaufärbung erkennbar. Für die Färbung wurde die Zellsuspension im Volumenverhältnis von 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,004% Trypanblau) verdünnt und nach einer Inkubationszeit von ca. 1 Minute im Auflichtmikroskop ausgezählt (Neubauer Zählkammer oder Kovar Glastic Slide 10 Zählkammer). Die Zellzahl pro Milliliter

wurde aus dem Produkt der Anzahl lebender Zellen pro Großquadrat, dem Verdünnungsfaktor und dem Volumenkorrekturfaktor $1 \cdot 10^4$ errechnet.

3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Als Vorbereitung zur Kryokonservierung wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation: 5 min, 1.600 U min^{-1}) und pro Einfrieransatz 0,5 bis $1,0 \cdot 10^7$ Zellen in einem Milliliter kaltem ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) Einfriermedium (FKS mit 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrier Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in eine Styropor-Einfrierbox gesteckt und für maximal sieben Tage bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen in die Gasphase über flüssigem Stickstoff (-178°C) transferiert.

3.2.4 Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen wurde die Zellsuspension zügig im Wasserbad ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) erwärmt und anschließend in 10-20 ml Medium überführt. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 1.200 U min^{-1}) pelletiert und in 2 ml frischem Medium aufgenommen. Schließlich wurde von den Zellen ein Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8) hergestellt und diese in einer 24-Lochplatte ausgesät und unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert.

3.2.5 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen aus Vollblut

Peripheres venöses Blut wurde mittels EDTA-Monovetten (9,5 ml Volumen, Sarstedt) gesammelt. Das EDTA-Blut wurde mit PBS/EDTA (2 mM, Miltenyi) im Verhältnis 1:2 verdünnt und 15–20 ml Ficoll ($\delta = 1,077 \text{ g ml}^{-1}$, Seromed) mit dem verdünnten Blut überschichtet. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 1500 g, ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen der Interphase geerntet und zweimal in PBS/EDTA mit 0,5% HSA gewaschen. Die Zellen wurden dann im entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen und inkubiert.

3.2.6 Gewinnung von Serum aus Frischblut

Zur Gewinnung von autologem Serum wurden entweder Serummonovetten (Sarstedt) verwendet oder das Serum wurde direkt aus Frischblut gewonnen. Hierzu wurden die Blutzellen durch Zentrifugation (2000 U min^{-1} , 15 min) sedimentiert und der klare Plasmaüberstand abgenommen. Das Plasma wurde für 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzinaktiviert und anschließend das ausgefallene Fibrin durch Zentrifugation (4000 U min^{-1} , 20 min) pelletiert. Der Serumüberstand wurde geerntet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.7 Depletion CD8-positiver Zellen

Die Depletion CD8⁺ Blutzellen (CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ Natürliche Killerzellen) erfolgte mittels MACS CD8 MicroBeads (Miltenyi), gemäß Herstellerprotokoll. Die magnetischen Beads sind an ihrer Oberfläche mit α CD8-Antikörpern konjugiert und binden an die CD8⁺ Zellen, die anschließend in einem Magnetfeld separiert werden können. Alle Lösungen und Säulen wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach der Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kap. 3.2.5) wurden $1 \cdot 10^7$ periphere mononukleäre Blutzellen in 80 μ l PBS/EDTA (2 mM) mit 0,5% humanem Serumalbumin aufgenommen, mit 20 μ l MACS CD8 MicroBeads versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS/EDTA/HSA gewaschen und in 500 μ l Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann auf eine Depletionssäule (LD depletion column, Miltenyi), die zweimal mit 2 ml Puffer vorgespült wurde, gegeben. Die Säule wurde danach zweimal mit jeweils 2 ml Puffer gespült und der Durchfluss in einem sterilen 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und auf eine zweite Depletionssäule überführt. Die nichtmarkierten Zellen wurden durch zweimaliges Spülen mit je 2 ml Puffer eluiert und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die aufgefangenen Zellen wurden schließlich zentrifugiert (1.200 U min^{-1} , 10 min) und im entsprechenden Medium in Kultur genommen.

3.2.8 Produktion retroviraler Vektorpartikel mittels transienter Transfektion

Retrovirale Vektorpartikel wurden mittels transienter Kalziumphosphattransfektion in Anjou65-Zellen produziert.

Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion $5-6 \cdot 10^6$ Anjou65-Zellen in DMEM 10% FKS in einer 10 cm-Petrischale ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch DMEM 10% FKS mit Chloroquine (25 μ M) ersetzt. Zur Herstellung des Plasmidcocktails wurden 450 μ l Wasser (Sigma) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und darin die folgenden Plasmide gelöst: GALV-env-Expressionsplasmid M130 (1 μ g), gag-pol-Expressionsplasmid M57 (12,5 μ g) und retrovirales Vektorplasmid (7,5 μ g). Anschließend wurden 50 μ l CaCl₂-Lösung (2,5 M, Sigma) zugegeben und alles stark gemischt. Diese Lösung wurde in 500 μ l HEPES-Puffer (Sigma) unter ständigem Mischen eingetropfelt. Um die Bildung von Präzipitatkristallen zu fördern wurde die Lösung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Präzipitatsuspension tropfenweise, gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach sechs bis acht h Inkubation bei 37°C wurde das Medium durch 6 ml DMEM 10% FKS ohne Chloroquine ersetzt. Nach 12, 24, 36 und 48 h wurde das vektorhaltige Medium geerntet. Eventuell enthaltene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Filtration mittels 0,45 μ m Membranfilter (Millipore) abgetrennt und die Überstände bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.9 Retroviraler Gentransfer in Zelllinien

- Zellen der Zelllinie PM-1

Pro well einer 24-Lochplatte wurden $2 \cdot 10^5$ PM-1-Zellen in 100 μl RPMI 10% FKS ausgesät und 1 ml vektorhaltiges Medium mit Protaminsulfat ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) addiert. Die Zellen wurden dann für 1 h zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 31°C) und schließlich bei 37°C inkubiert. Die Transduktion wurde nach 12 h wiederholt. Hierfür wurden die Zellen für 10 min zentrifugiert (2000 U min^{-1} , Raumtemperatur) und das Medium durch neues vektorhaltiges Medium mit Protaminsulfat ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) ersetzt. Abermals wurden die Zellen für 1 h zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 31°C). Am folgenden Tag wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät.

- Zellen der Zelllinie Rat-1

Für die Transduktion von Rat-1-Zellen wurden pro well einer 24-Lochplatte $0,5-1 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml DMEM 10% FKS ausgesät und für 12-16 h inkubiert. Nachdem die Zellen adhärirt waren wurde das Kulturmedium durch vektorhaltiges Medium ersetzt. Nach Zugabe von $1 \mu\text{l}$ Polybrene (4 mg ml^{-1}) wurden die Ansätze für 1 h zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 31°C). Die Transduktion wurde am folgenden Tag wiederholt.

3.2.10 Retroviraler Gentransfer in primäre periphere Blutzellen (Basisprotokoll)

Die Entwicklung eines Protokolls zur retroviralen Transduktion primärer peripherer Blutzellen war unter anderem Gegenstand dieser Arbeit. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle das Basisprotokoll beschrieben, von dem ausgehend die weiteren Entwicklungsarbeiten durchgeführt wurden.

- Prästimulation primärer Lymphozyten

Frischisolierte periphere Lymphozyten (siehe Kap. 3.2.5) wurden in Medium (X-Vivo 10 mit 10% FKS) auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1} eingestellt und OKT-3 ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) und IL-2 (100 U ml^{-1}) zugegeben. Die Zellen wurden dann für drei Tage unter Standardbedingungen inkubiert.

- Transduktion primärer Lymphozyten

Die vorstimulierten Zellen wurden geerntet, gezählt und mit Medium auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1} eingestellt. Je Ansatz wurden 100 μl Zellsuspension in einer 24-Lochplatte ausgesät und 1 ml vektorhaltiges Medium mit IL-2 (100 U ml^{-1}) und Protaminsulfat ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugegeben. Dann wurden die Zellen für 1 h zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 31°C) und schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transduktion wurde nach 24 h wiederholt. Hierfür wurden die Zellen erst abzentrifugiert (10 min, 2000 U min^{-1} , Raumtemperatur) und in je 1 ml vektorhaltigem Medium aufgenommen. Abermals wurden Protaminsulfat ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) und IL-2 (100 U ml^{-1}) zugegeben und die Zellen 1 h zentrifugiert (2000 U min^{-1} , 31°C). Anschließend wurden die Zellen über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der

Vektorüberstand durch frisches Medium mit IL-2 (100 U ml⁻¹) substituiert und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert.

3.2.11 Vorbeladen von Zellkulturgefäßen mit retroviralen Vektorpartikeln

KUHLCKE *et al.* (2002) publizierten ein Transduktionsverfahren, bei dem retrovirale Vektorpartikel durch Zentrifugation (2500 U min⁻¹, 30 min, 4°C) auf Kulturgefäßoberflächen angereichert werden. Die Zielzellen werden anschließend in frischem Medium in den vorbeladenen Gefäßen ausgesät. Die Autoren verwendeten für die Produktion der Vektorpartikel die etablierte Verpackungszelllinie PG13 (MILLER *et al.*, 1991, ATCC-Nr. 10686). Die Konzentrierung der Vektorpartikel auf der Kulturoberfläche soll die Kontaktwahrscheinlichkeit von Zellen und Vektorpartikel, und damit die Gentransferrate erhöhen.

Für die Etablierung des Transduktionsprotokolls wurde das publizierte Verfahren getestet. Hierbei wurde je Ansatz 1 ml vektorhaltiges Medium in eine 24-Lochplatte gefüllt und für 30 min zentrifugiert (2500 U min⁻¹, 4°C). Anschließend wurde das Medium durch 1 ml vektorhaltiges Medium ersetzt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Für die Transduktion wurden 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹ im entsprechenden Medium in der vorbeladenen Platte ausgesät.

3.2.12 Beschichten von Kulturgefäßoberflächen mit RetroNectin

RetroNectin (TaKaRa Biomedicals) ist ein recombinant hergestelltes Fibronectinfragment (KIMIZUKA *et al.*, 1991) von ~63 kDa. Es besteht aus 574 Aminosäuren, und enthält eine zentrale Zellbindungsdomäne, eine hochaffine Heparinbindungsdomäne und eine CS1-Domäne. Wie HANENBERG *et al.* (1996) zeigten, kann der retrovirale Gentransfer durch RetroNectin gesteigert werden. Wahrscheinlich vermittelt es die Co-Lokalisierung von Zelle und Vektorpartikel durch Bindung beider Partner.

Um den Einfluss von RetroNectin auf den retroviralen Gentransfer zu untersuchen, wurden Zellkulturgefäße mit RetroNectin beschichtet. Am Tag der Transduktion wurde hierfür, gemäß Herstellerprotokoll, eine RetroNectin-Lösung von 48 µg ml⁻¹ in H₂O dest. hergestellt und über ein Membranfilter (0,22 µm) filtriert. Für die Beschichtung einer 6-Lochplatte wurde 1 ml dieser Lösung je Kulturvertiefung zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz dreimal mit je 4 ml PBS gespült. Die RetroNectin-beschichteten Platten wurden unverzüglich für die Transduktion verwendet.

3.2.13 Titration von HIV-Stocksuspensionen

Für die Bestimmung der Viruskonzentration in Stocksuspensionen wurden TZM-bl-Zellen (KIMPTON und EMERMAN, 1992, DERDEYN *et al.* 2000) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein transgenes Derivat der HeLa-Zelllinie. Die Zellen exprimieren den CD4-Rezeptor, die beiden Co-Rezeptoren CXCR4 und CCR5, sind damit permissiv für HIV. Die Zellen tragen zusätzlich ein Reporterkonstrukt, das die Tat-abhängige Expression der β -Galactosidase vermittelt. Nach der Infektion mit HIV exprimiert die Zelle das Tat-Protein, das seinerseits die Expression des β -gal-Genes auf dem Reporterkonstrukt initiiert. Infizierte Zellen können nach Zugabe von X-gal durch Blaufärbung nachgewiesen werden.

Am Tag vor der Infektion wurden $3,5 \cdot 10^3$ Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte in 100 μ l Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die HIV-Stocksuspension im Wasserbad (37°C) aufgetaut und eine Verdünnungsreihe aus zehn 2-fach Verdünnungen in Medium hergestellt. Mit jeder Verdünnung wurden fünf Ansätze mit je 100 μ l beschickt und für 3 Tage inkubiert.

Danach wurde das Medium von den Kulturen entfernt und dreimal mit je 100 μ l PBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren wurden die Ansätze für 5 min mit je 100 μ l PBS 1% Formaldehyd-0,2% Glutaraldehyd inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für ca. 3 Stunden mit 100 μ l Färbepuffer (Kaliumferrocyanid 3 mM, Kaliumferrocyanat 3 mM, $MgCl_2$ 1 mM, und X-gal 25 mg ml^{-1} in PBS) inkubiert. Die blaugefärbten Zellen wurden im Lichtmikroskop gezählt. Für die Berechnung des Virusgehaltes der Stocksuspension wurde die Verdünnung gewählt, bei der zwischen 30 und 300 blaue Zellen pro Ansatz gezählt wurden.

3.2.14 HIV-Infektionsversuche mit Zelllinien

Für die Testung der inhibitorischen Aktivität retroviraler Vektorkonstrukte wurden pro Ansatz $2 \cdot 10^5$ transduzierte Zellen in 1 ml Medium in einer 24-Lochplatte ausgesät. Als Kontrolle für den Infektionsverlauf wurden untransduzierte und mit einem Kontrollvektor (Vektor ohne relevante Transgenkassette) transduzierte Zellen mitgeführt. Titrierte HIV-Stocksuspensionen wurden im Inkubator bei 37°C aufgetaut und unter starkem Vortexen gemischt. Anschließend wurden Verdünnungen in Kulturmedium hergestellt und die Kulturen durch Zugabe einer definierten Virusmenge infiziert. Nach 24 h wurden je Ansatz 500 μ l frisches Kulturmedium addiert. Alle zwei bis drei Tage wurden 90 μ l zellfreier Kulturüberstand geerntet und durch Zugabe von 10 μ l NP-40 (5% in PBS) inaktiviert. Die Proben wurden bis zur Analyse der HIV-p24-Konzentration mittels ELISA bei -20°C gelagert. Nach der Probenahme wurden die Zellen mit der Pipette resuspendiert und je Ansatz 1000 μ l Zellsuspension durch 1100 μ l frisches Kulturmedium ersetzt.

Die Versuche wurden so lange weitergeführt bis die Kontrollzellen an der HIV-Infektion zugrunde gegangen waren, in der Regel für 14 Tage.

3.2.15 HIV-Infektionsversuche mit primären Zellen

Periphere Blutlymphozyten wurden transduziert und für insgesamt 12 Tage in Kultur gehalten. Nach dieser Zeit wurden residuelle CD8⁺ Zellen mittels MACS CD8 MicroBeads (Miltenyi) depletiert (s. Kap. 3.2.7) und die verbliebenen Zellen in einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen ml⁻¹ in X-VIVO 15 mit 5% AB-Serum und 100 IL-2 U ml⁻¹ ausgesät. Die Zellen wurden durch Zugabe von gewaschenen XcyteDyna Beads (Dyna, 3 Beads pro Zelle) für 3 Tage stimuliert. Danach wurden Zellen und Beads durch wiederholtes Resuspendieren voneinander getrennt und die Beads im Handmagneten (Dyna) separiert.

Die HIV-Stocksuspension wurde bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und anschließend mit Medium auf die entsprechende Viruskonzentration eingestellt. Danach wurden die restimulierten Lymphozytenkulturen mit dem Virus infiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 2000 U min⁻¹ zentrifugiert und das Kulturmedium durch frisches Medium ausgetauscht.

Alle zwei bis drei Tage wurden 90 µl Kulturüberstand für die Bestimmung des p24-Antigengehaltes geerntet und durch Zugabe von 10 µl 5%-iger NP40-Lösung inaktiviert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl nach Trypanblau-Färbung mittels Zählkammer bestimmt und die Zelldichte auf $5 \cdot 10^5$ Zellen ml⁻¹ eingestellt. Die Proben für die p24-Gehaltsbestimmung wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert (s. Kap.3.2.16). Zur Bestimmung des Anteils transgenpositiver Zellen wurden 2 - 5 · 10⁵ Zellen geerntet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Um HIV in den Proben zu inaktivieren wurden die gefärbten Zellen für 10 min in 1 ml PBS mit 1,5% Formaldehyd fixiert und anschließend für die durchflusszytometrische Analyse in 300 - 400 µl PBS resuspendiert. Im Intervall von 12 Tagen wurden die Zellen durch Inkubation mit Xcyte Dyna Beads restimuliert.

3.2.16 Bestimmung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Zellen, die produktiv mit HIV infiziert sind exprimiert das HIV-Capsidprotein p24, das auch im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Eine fortschreitende Virusreplikation *in vitro* korreliert mit einer steigenden p24-Konzentration im Kulturmedium.

Die im Versuchsverlauf gesammelten und bei -80°C gelagerten Kulturüberstände wurden unmittelbar vor der Analyse aufgetaut. Für die Gehaltsbestimmung wurden Verdünnungsreihen aus 1:10-Verdünnungen hergestellt und jeweils 100 µl im Test eingesetzt. Der ELISA-Test (Innotest HIV Antigen mAB Kit, Innogenetics) wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt und zur Quantifizierung eine Standardgerade aus Verdünnungen des mitgelieferten p24-Standards erstellt. Für die Auswertung wurde eine lineare Regression der Standard-Messwerte berechnet.

3.2.17 Erzeugung T-20-resistenter Pseudotypviren

RIMSKY *et al.* publizierten 1998 Mutationen in der HR-1-Region von gp41, die Resistenz gegenüber T-20 vermitteln. Sequenzanalysen zeigten, dass die Substitutionen der Wild-Typ-Sequenz GIV zu SIM bzw. DTV ursächlich für die Resistenz waren.

Auf Basis des Plasmides pSG-HxB2 (M104, HE *et al.*, 1997), das das Hüllprotein HIV_{HxB2}-Hüllprotein exprimiert, wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (QuickChange Kit, Stratagene, Heidelberg) die publizierten Resistenzmutationen erzeugt (SIM-Derivat: Primer M140-SIM-F 5'-gccagacaattattgtctagtataatgcagcagcagaacaatttg-3' und M140-SIM-R 5'-caaattgttctgctgctgcattatactagacaataattgtctggc-3', DTV-Derivat: Primer M104-DTV-F 5'-gccagacaattattgtctgatacagtgagcagcagacaacaatttg-3' und M104-DTV-R 5'-caaattgttctgctgctgcactgtatcagacaataa ttgtctggc-3'). Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Viruspartikel der HxB2-Varianten wurden mit einem 3-Plasmid-System erzeugt (NALDINI *et al.*, 1996). Hierfür wurden 293T Zellen mit dem Verpackungsplasmid pCMV Δ R9, dem Transfer-Vektor pRRLsinCMVGFPpre und den env-Expressionsplasmiden transfiziert (s. Kap. 3.2.8). Das Plasmid pCMV Δ R9 exprimiert mittels CMV-Promotor die für die Verpackung notwendigen Proteine (Gag, Pol, Tat und Rev). Die offenen Leserahmen von Env und Vpu sind durch Mutationen inaktiviert (NALDINI *et al.*, 1996). Nur der Transfer-Vektor pRRLsinCMVGFPpre ist mit einem Verpackungssignal ψ ausgestattet. Er exprimiert nur das Markerprotein eGFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (DULL *et al.*, 1998). Als Kontrolle wurden Pseudotypviren, die das Hüllprotein des Virus der vesiculären Stomatitis (VSV-G) tragen, erzeugt.

3.2.18 „Single round“-Infektionsassay

Vektorpartikel, die mit verschiedenen Hüllproteinen ausgestattet waren (Erzeugung siehe 3.2.17) wurden für „single round“-Infektionsassays eingesetzt. Diese Pseudotypviren (Abb. 8) waren vermehrungsinkompetent und exprimierten nur GFP. Infizierte Zellen wurden im Durchflusszytometer detektiert. Es wurden HIV_{HxB2}-Hüllproteinvarianten verwendet, die eine Resistenz gegenüber T-20 vermitteln (RIMSKY et al., 1998). Als Kontrolle wurde das VSV-G-Hüllprotein verwendet, dessen Infektionsmechanismus von T-20 nicht beeinflusst wird.

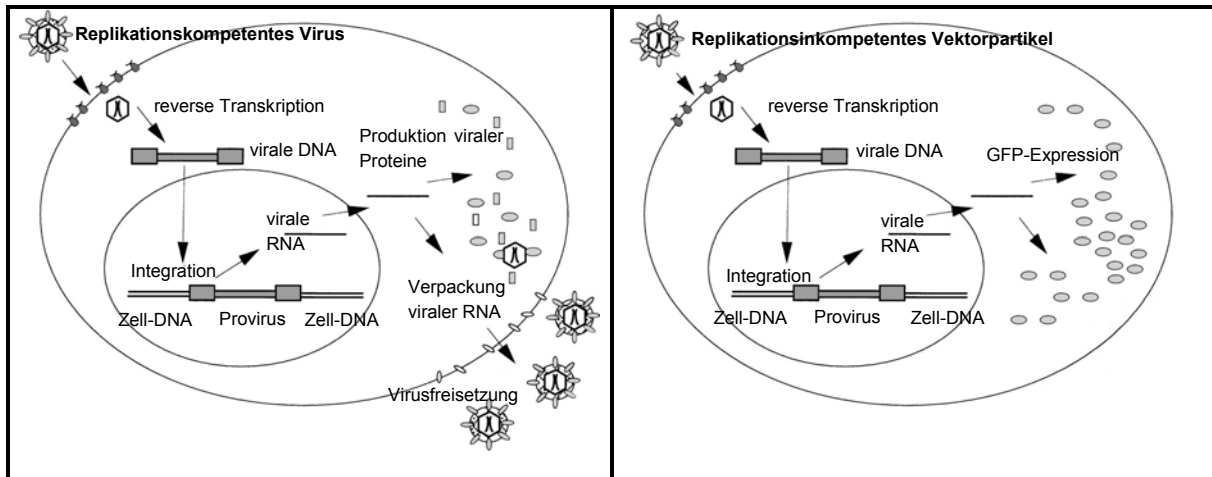


Abb. 8: Replikationskompetente Retroviren integrieren ihr Genom stabil in die Zell-DNA und exprimieren hiervon die Proteine, die zur Herstellung von Nachkommenviren gebraucht werden. Die für die single round-Infektionsassays produzierten replikationsdefekten Vektorpartikel übertragen keine Sequenzen, die für Struktur oder regulatorische Proteine codieren und sind daher nicht in der Lage Nachkommenviren zu produzieren. Die infizierte Zelle kann anhand der Markergenexpression (eGFP) z. B. durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

$2 \cdot 10^5$ PM-1 MP1-neo- bzw. PM-1 M87o-Zellen wurden in einer 24-Lochplatte ausgesät und mit virushaltigem Kulturmedium überschichtet und für 1 h zentrifugiert (200 U min^{-1} , 31°C). Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Prozedur wurde am folgenden Tag wiederholt und die Zellen wieder über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in PBS gewaschen (Zentrifugation, 1600 U min^{-1} , 8 min, Raumtemperatur) und in frischem Medium ausgesät ($2 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1}). Die Zellen wurden für weitere zwei Tag kultiviert und schließlich im Durchflusszytometer auf eGFP-Expression analysiert. Die Infektionsrate wurde aus dem prozentualen Anteil eGFP⁺ Zellen bestimmt.

3.2.19 Nachweis von anti-C46 Antikörpern in Serumproben mittels Western Blot

Zum Nachweis von anti-M87o-Antikörpern wurde die Western Blot-Technik eingesetzt. Hierfür wurde das M87o-Peptid recombinant in *E. coli* K12 hergestellt (recM87o-Stock 1,3 mg ml⁻¹, enthält die gesamte codierende Region inklusiv Signalpeptid) und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurde eine Mini-PROTEAN Gelkassette (Biorad) verwendet. Das 12%-ige Trenngel (1.5 M Tris-HCl, pH 8,8) war mit einem 4%-igen Sammelgel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) überschichtet. Das recM87o-Peptid wurde vor der Auftragung für 5 min auf 100°C erhitzt und davon 1,2 µg pro Spur aufgetragen. Als Größenstandard wurden in einer Spur 10 µl Proteinstandard (Kaleidoscope, Biorad) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für ca. 60 min bei 200 V.

Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (4 °C, 100 V, 1 h). Nach dem Blotten wurde die Membran mit PBS 5% Milchpulver geblockt (1h, RT) und anschließend die einzelnen Spuren mit einer Schere voneinander getrennt und über Nacht bei 4 °C separat mit 10 ml Patientenplasma (1:100 verdünnt in PBST 2,5% Milchpulver) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde α-gp41-2F5 (MUSTER *et al.*, 1993, zur Verfügung gestellt von Prof. Katinger, Wien) mitgeführt (10 ml, 2,5 µg ml⁻¹ in PBST 2,5% Milchpulver). Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal mit je 10 ml PBST gewaschen.

Zum Nachweis gebundener Antikörper wurde ein Ziege-α-human-IgG-HRPO Sekundärantikörper (Dianova) in PBST 2,5% Milchpulver verdünnt (1:20.000). Je Testansatz wurden 10 ml Gebrauchslösung zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließen wurden die Streifen dreimal mit 10 ml PBST und danach dreimal mit 10 ml PBS für je zehn Minuten gewaschen. Für die Detektion wurde das ECLplus-Nachweisreagenz (Pharmacia) gemäß Herstellerprotokoll zusammengemischt und die Streifen mit 0,1 ml cm⁻² überschichtet und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Streifen für unterschiedliche Zeit auf Hyperfilm EC (Pharmacia) belichtet.

3.2.20 Durchflusszytometrie

Die Expression von Markerproteinen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei werden Zellen mittels Laserlicht abgetastet und Zellgröße und Granularität mit Hilfe der Lichtstreuung, die eine Zelle beim Durchtritt durch den Lichtstrahl verursacht, bestimmt. Zellstrukturen lassen sich nach Markierung mit Fluorochromen nachweisen. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellbestandteile meist mit Antikörpern, an die fluoreszierende Stoffe wie z. B. Phycoerythrin (PE) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gebunden sind, markiert. Im Laserstrahl werden diese Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, das detektiert wird. Die Stärke der Lichtemission ist hierbei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und stellt somit ein Maß für die Expressionshöhe des untersuchten Proteins dar.

Direkte Antikörperfärbung: Bei der direkten Antikörperfärbung wurde ein mit einem Fluorochrom konjugierter Antikörper eingesetzt. Je Färbeansatz wurden $2 - 5 \cdot 10^5$ Zellen geerntet, in ein 4 ml Rundbodenröhrchen (FACS-Röhrschen, Falcon) überführt und in 20 μ l Antikörperverdünnung (PBS mit 3% FKS) aufgenommen. Die optimale Menge an Antikörper wurde entweder den Angaben des Herstellers entnommen oder vorher experimentell bestimmt. Die Zellen wurden bei 4 °C für 30 min mit Antikörper inkubiert und danach dreimal mit 3 ml FACS-Puffer (PBS/3% FKS) gewaschen (Zentrifugation 8 min, 1200 U min^{-1}). Abschließend wurden die Zellen in 300 – 400 μ l FACS-Puffer mit 1,5% Formaldehyd resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Indirekte Antikörperfärbung: Zur Bestimmung der C46-Expression wurde ein indirektes Färbeprotokoll angewendet. Das C46-Peptid wurde hierbei durch Bindung des unkonjugierten Primärantikörpers α -gp41-2F5 (MUSTER *et al.*, 1993, zur Verfügung gestellt von Prof. Katinger, Wien) markiert und dieser wurde durch Bindung eines PE-konjugierten Ziege- α -human-IgG Sekundärantikörpers (Dianova) nachgewiesen. Pro Ansatz wurden $2-5 \cdot 10^5$ Zellen geerntet, in ein 4 ml Rundbodenröhrchen (Falcon) überführt und in 20 μ l Antikörperverdünnung (1 μ g α -gp41-2F5 pro Ansatz) resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 8 min 1.200 U min^{-1}). Dann wurden die Zellen in jeweils 20 μ l einer Verdünnung des Zweitantikörpers (1:40 in FACS-Puffer) resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 300 – 400 μ l FACS-Puffer mit 1,5% Formaldehyd resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Messung und Auswertung: Die Messungen wurden mit den Durchflusszytometern FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt und mit Hilfe der CellQuest Pro Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

3.2.21 Zellsortierung mittels FACSCalibur

Zellen ohne Antibiotikumresistenzgenen wurden mittels FACS-Sortierung angereichert. Hierfür kam das FACSCalibur (Becton Dickinson) zum Einsatz. Um sterile Sortierbedingungen zu gewährleisten wurden die Geräteleitungen initial für 30 min mit 70% Ethanol gespült und anschließend für 60 min mit sterilem PBS gewaschen. Der Sortiervorgang wurde mit Hilfe der CellQuest Pro Software (Becton Dickinson) gesteuert.

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mittels Antikörperfärbung markiert und auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen ml^{-1} eingestellt. Bei GFP-exprimierenden Zellen konnte auf eine Antikörperfärbung verzichtet werden. Um eine ausreichende Reinheit des Sortierproduktes zu garantieren wurde die Ereignisrate während des Sortiervorgangs auf < 300 Sortierereignisse pro Sekunde begrenzt. Die positiv-sortierten Zellen wurden in einem mit FKS beschichteten 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) aufgefangen, in dem 10 ml FKS vorgelegt waren. Für die Beschichtung wurden die Röhrchen mit 5 ml FKS beschickt und für 30 min auf einem Drehinkubator inkubiert. In der Regel wurden pro Röhrchen ca. $3 \cdot 10^5$ Zellen gesammelt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (Megafuge 1.0R, 8 min, 1200 U min^{-1} , Raumtemperatur) und in 500 μl halbkonditioniertem Medium (1:1 Mischung aus frischem und konditioniertem Medium) ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde ein Teil des Sortiergutes unverzüglich im Durchflusszytometer analysiert. Für weiterführende Experimente wurden ausschließlich Populationen mit einem Reinheitsgrad von $> 95\%$ verwendet.

3.2.22 Assays zur Bestimmung der Zellproliferation

3.2.22.1 ³H-Thymidin-Einbauassay

Die Proliferation von Zellen geht immer auch mit der Neusynthese von DNA einher. Bietet man einer Zelle radioaktiv markierte DNA-Bausteine an, so werden diese unbesehen zur Synthese von DNA verwendet und finden sich in den neusynthetisierten Molekülen wieder. Für die Quantifizierung der Proliferation von Zellen mittels ³H-Thymidineinbau wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro well einer 96-Lochplatte ausgesät und die Testagenzien in der zu testenden Konzentration addiert. Jede Bedingung wurde hierbei mindestens in Triplikaten angesetzt. Die Zellen wurden anschließend für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze durch Zugabe von 20 µl einer 1:20-Verdünnung der Methyl-³H-Thymidin-Stocklösung (1,0 mCi ml⁻¹, Amersham Pharmacia Biotech) für 6-8 h gepulst. Danach wurden die Zellen mit Hilfe des FilterMate Cell Harvester (Packard) geerntet und die DNA auf einer Fiberglasfiltermembran (Packard) immobilisiert. Die Filtermembran wurde für ca. 24 h bei Raumtemperatur getrocknet und dann in einen 96-Lochfilterhalter (Omni Filter Holder, Packard) montiert. Je Loch wurden 25 µl Szintillationsflüssigkeit (MicroScint 20, Packard) zugegeben. Die Menge an inkorporiertem ³H-Thymidin wurde anschließend im Szintillationszähler (TopCount NXT, Packard) detektiert.

3.2.22.2 Bestimmung der akuten Toxizität antiretroviraler Therapeutika mittels Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega)

Zur Bestimmung der akuten Toxizität antiretroviraler Therapeutika wurde der Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) eingesetzt. Lebende Zellen lassen sich durch die Produktion von ATP nachweisen. Das Prinzip des Assays beruht auf der Erzeugung eines Lumineszenzsignals durch Luziferase in Anwesenheit von ATP. Die konzentrationsabhängige Reduktion des Lumineszenzsignals diente dann als Maß für die Toxizität einer Testsubstanz. Die Durchführung des Testes erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Pro Ansatz wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in 200 µl Medium in einer 96-Lochplatte ausgesät und anschließend mit der Testsubstanz in entsprechender Konzentration inkubiert. Die Zellen wurden zwei bis vier Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kulturen für ca. 30 min auf Raumtemperatur equilibriert. Anschließend wurden die Zellen gründlich resuspendiert und jeweils 100 µl Zellsuspension auf eine 96-Lochluminometerplatte (Greiner) überführt. Das lyophilisierte Assay-Substrat wurde durch Zugabe des mitgelieferten Puffers rekonstituiert und je Ansatz 100 µl zugegeben. Hierdurch wurden die Zellen lysiert und das zelluläre ATP freigesetzt. Die Platte wurde nun für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Stabilisierung des Lumineszenzsignals zu gewährleisten. Die Lumineszenz wurde anschließend im Luminometer (SPECTRAFluorplus, Tecan) detektiert und aus der

konzentrationsabhängigen Signalreduktion die IC_{50} der betreffenden Substanz bestimmt.

3.2.23 Bestimmung des Transformationspotentials retroviraler Vektoren und deren Genprodukte mittels Weichagar-Koloniebildungsassay

Die Rattenfibroblastenzelllinie Rat-1 (SMALL *et al.*, 1987, RICKETTS *et al.*, 1988) zeichnet ein geringes Potential zur Bildung von Kolonien in Weichagar aus. Ein transformierendes Ereignis verleiht den Zellen das Vermögen in Weichagar zu wachsen und kann durch die Bildung von Kolonien nachgewiesen werden.

Zur Abschätzung des transformierenden Potentials des retroviralen Vektors M87o wurden Rat-1-Zellen mit M87o transduziert, nach α -gp41-2F5-Färbung mittels Durchflusszytometer auf M87o-Expression sortiert und im Weichagar-Assay auf Bildung von Kolonien untersucht. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte Rat-1-Zellen und mit M56a (SCHAMBACH *et al.*, 2000; Vektor mit der Gensequenz des grün-fluoreszierenden Proteins, GFP) transduzierte und FACS-sortierte Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurden Rat-1-Zellen mit M318 transduziert, einem retroviralen Vektor, der die Expression des großen T-Antigen des SV40-Virus (Simian Virus 40, Papovaviridae) vermittelt. SV40 verursacht bei neugeborenen Hamstern und Mäusen die Bildung von Tumoren. Das große T-Antigen bindet an zelluläre Tumorsuppressorproteine wie z.B. p53, und immortalisiert dadurch die Zelle. Der Vektor M318 exprimiert zusätzlich GFP, das als Sortierungsmarker verwendet wurde. Für den Weichagar-Assay wurden die Kulturvertiefungen einer 6-Lochplatte mit DMEM 10% FKS, 0,6% Agar-Agar beschickt. Je Ansatz wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in Medium mit 0,3% Agar-Agar ausplattiert. Die Ansätze wurden in je fünf Replikaten ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Kulturen mit jeweils 0,5 ml DMEM 10% FKS überschichtet. Alle zwei bis drei Tage wurde das überschichtete Medium ausgetauscht. Nach vierzehn Tagen wurden die sichtbaren Kolonien mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (Leica) ausgezählt. Das transformierende Potential wurde aus der mittleren relativen Koloniebildungsrate ermittelt. Diese stellt das Verhältnis aus mittlerer Koloniezahl des Testansatzes und der mittleren Koloniezahl des untransduzierten Kontrollansatzes dar.

4 Ergebnisse

4.1 M87o, ein optimierter retroviraler Vektor für die Gentherapie der HIV-Infektion: Untersuchungen zur Wirksamkeit *in vitro*

Der retrovirale Vektor M87 (HILDINGER *et al.* 2001) wurde von der Arbeitsgruppe von LAER für die Gentherapie der HIV-Infektion entwickelt. M87 codiert die antivirale C36-Sequenz, die homolog zu der des T-20 (WILD *et al.*, 1992, KILBY *et al.*, 1998; Kap. 2.5.4.3, s. 14) ist und vermittelt deren membranständige Expression. HILDINGER *et al.* (2001) konnten zeigen, dass M87 die Replikation von HIV *in vitro* mehr als 100-fach inhibiert. Als Hemmmechanismus wurde eine Blockade der gp41-vermittelten Membranfusion identifiziert. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde M87 für eine klinische Anwendung weiter optimiert (EGELHOFER *et al.* 2004a, EGELHOFER 2004b). Der Aufbau des optimierten Konstruktes M87o ist in Abb. 9 skizziert.

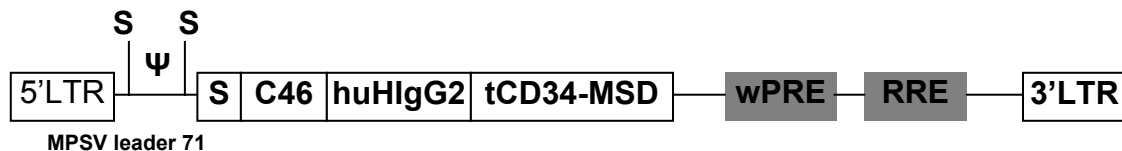


Abb. 9: Darstellung des retroviralen Vektors M87o. M87o codiert für das 46 Aminosäuren lange inhibitorische Peptid C46, die Linkerdomäne der humanen IgG2-Gelenkregion (huHlgG2) und die Transmembrandomäne des humanen tCD34 (tCD34-MSD). Als zweites inhibitorisches Prinzip ist eine RRE-decoy-Sequenz (RRE) eingeführt. Zur Erhöhung der Expression wurden die Codons der codierenden Sequenz auf humanen Codongebrauch adaptiert und ein wPRE (post-transcriptional responsive element des Woodchuck-Hepatitis B-Virus) eingeführt. Der Vektor enthält einen modifizierten MPSV leader (MP71). (SD = Spleiß-Donor, SA = Spleiß-Akzeptor, Ψ = Verpackungssignal *psi*, Abbildung nicht maßstabsgetreu)

M87o vermittelt die zellmembrangebundene Expression des antiviralen C46-Peptides. Dieses leitet sich von der Transmembranuntereinheit gp41 (Aminosäuren 643-678) des HIV-Hüllproteins ab. Das C46-Peptid verhindert durch Interaktion mit dem gp41-Protein die Fusion von Virus- und Zellmembran (siehe Kap. 2.3, s. 8). Für eine membrangebundene Expression wurde das C46-Peptid über eine flexible Verbindungsdomäne (Gelenkregion des humanen IgG2-Antikörpers) mit der Transmembrandomäne des humanen tCD34 (natürliche Spleißvariante ohne Signaldomäne, COMOLI *et al.*, 1996) fusioniert. Das Signalpeptid des niederaffinen Nervenwachstumsfaktorrezeptors (low affinity nerve growth factor receptor, LNGFR) vermittelt die Translokation ins Endoplasmatische Reticulum und wird dort von einer Signalpeptidase abgespalten. Als zweites inhibitorisches Prinzip enthält M87o ein 41 Basenpaare großes Fragment des rev response elements (RRE). Dieses inhibiert als RNA-Struktur den RRE-abhängigen, Rev-vermittelten Export einfach- und ungespleißter RNA (RRE-decoy, BAHNER *et al.*, 1996; BAUER *et al.*, 1997; BAHNER *et al.*, 1997; KOHN, 2000). Um eine hohe Genexpression zu gewährleisten wurde der expressionsoptimierte Vektor MP71-PRE verwendet (SCHAMBACH *et al.*, 2000). Dessen retroviraler leader-Bereich (MP71 leader) enthält neben einem Spleiß-Donor

noch einen Spleiß-Akzeptor, woraus ein funktionelles Intron resultiert (HILDINGER *et al.*, 1999). Das Spleißen des Introns erhöht den mRNA-Export, und damit die Transgenexpression (ZUFFEREY *et al.*, 1999). Zusätzlich sind im leader-Bereich zwei der drei Startcodons (ATG) deletiert. Im 3'-Bereich enthält der Vektor ein post-transcriptional responsive element des Woodchuck-Hepatitis B-Virus (wPRE, SCHAMBACH *et al.*, 2000). Die transgencodierende Sequenz wurde, zur Verbesserung der C46-Expression in T-Zellen, auf humanen Codongebrauch adaptiert (HAAS *et al.*, 1996, DEML *et al.*, 2001).

4.1.1 M87o inhibiert die HIV-Infektion in Zelllinien

Die inhibitorische Wirksamkeit des retroviralen Vektors M87o wurde zunächst in Zelllinien getestet. Hierfür wurden Zellen der T-Helferzelllinie PM-1 (LUSSO *et al.*, 1995) mit M87o transduziert. Die M87o⁺ Zellen wurden nach Markierung mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 (α gp41, erkennt das Epitop ELDKWA im C46-Peptid, MUSTER *et al.*, 1993; BUCHACHER *et al.*, 1994) mittels Durchflusszytometer sortiert. Die Reinheit der Zellpopulation lag bei > 99 % (Abb. 10).

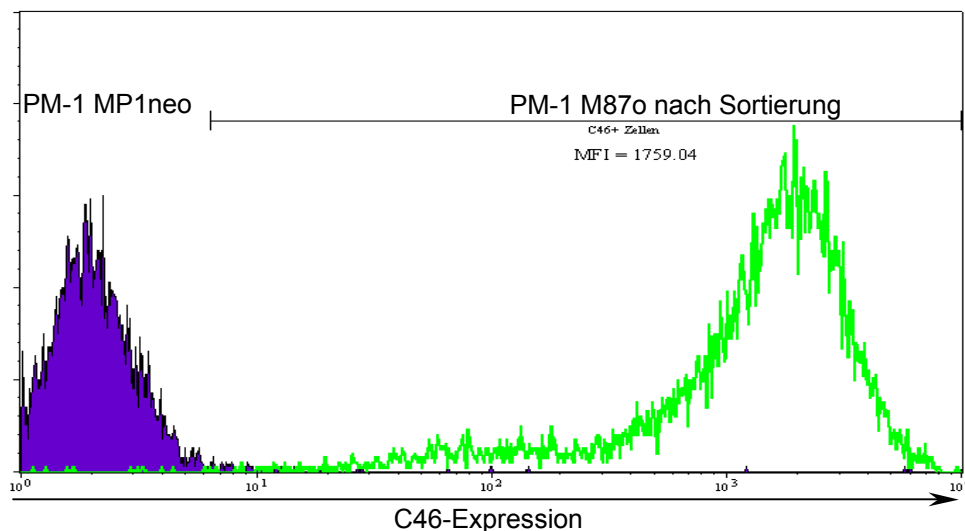


Abb. 10: Zellen von PM-1 exprimieren das membranverankerte, inhibitorische Peptid C46 auf ihrer Oberfläche. Die Zellen wurden mit M87o transduziert und nach Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometer auf M87o-Expression sortiert. Als Färbekontrolle dienten PM-1-Zellen, die mit einem irrelevanten Kontrollvektor (MP1neo) transduziert waren.

Die sortierten PM-1 M87o-Zellen wurden mit HIV-1_{NL4-3} (ADACHI *et al.* 1986; MOI = 0,001) infiziert. Zur Quantifizierung der Virusreplikation wurden an mehreren Tagen zellfreie Kulturüberstände geerntet und die Konzentration des HIV-1-Antigens p24 mittels ELISA bestimmt. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, wurde die Virusreplikation in den Kulturen der M87o⁺ Zellen vollständig gehemmt.

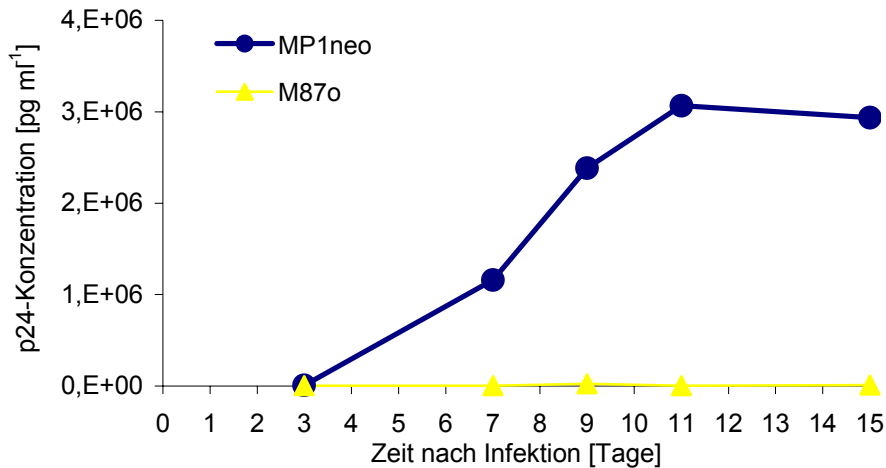


Abb. 11: M87o hemmt effizient die Replikation von HIV-1. PM-1 Zellen wurden mit M87o transduziert, sortiert und anschließend mit HIV-1_{NL4-3} infiziert (MOI = 0,001). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem irrelevanten retroviralen Vektor MP1neo transduziert wurden. Als Maß für die Virusreplikation wurde der p24-Gehalt in zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA quantifiziert.

In den Kontrollkulturen konnte sich das Virus ungehindert vermehren und die Zellen zerstören. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Tagen waren fast alle ungeschützten Zellen zerstört. Im Gegensatz hierzu zeigten die Kulturen der M87o-positiven Zellen keine cytopathischen Viruseffekte und teilten sich ungehindert weiter.

4.1.2 M87o hemmt T-20-resistente HIV-Stämme

RIMSKY *et al.* (1998) publizierten Mutationen in der HR-1-Region von gp41 die zur Resistenz gegenüber T-20 führen (siehe auch Kap. 3.2.18). Ursache hierfür war die Substitution des Wild-Typ-Motivs GIV zu SIM bzw. DTV. Wird T-20 als Monotherapie appliziert kommt es auch *in vivo* relativ schnell zur Entwicklung resistenter Viren (KILBY *et al.*, 1998). WEI *et al.* (2002) konnten in diesen Patienten ebenfalls Mutationen im GIV-Motiv von gp41 als ursächlich für die Resistenz nachweisen. Um zu testen, ob das C46-Peptid T-20-resistente HIV-1-Stämme inhibiert, wurden die publizierten Resistenzmutationen mittels zielgerichteter Mutagenese in die Sequenz des HIV_{HxB2}-Hüllproteins (Expressionsplasmid pSG-HxB2, HE *et al.*, 1997) eingeführt. Dann wurden retrovirale Vektorpartikel mit den verschiedenen Varianten des HIV-1-Hüllproteins pseudotypisiert. Diese Pseudotypviren waren replikationsinkompetent und exprimierten nur GFP. Anschließend wurden PM-1 M87o-Zellen mit den Pseudotypviren inkubiert. Infizierte Zellen exprimierten GFP und wurden im Durchflusszytometer detektiert. Als Infektionskontrolle wurden VSV-G-Pseudotypviren hergestellt, die nicht von membran-verankertem C46 gehemmt werden. PM-1 MP1neo-Zellen, die kein inhibitorisches Transgen exprimieren, dienten zur Quantifizierung der ungehemmten Infektion.

In Abb. 12 sind die Ergebnisse als relative Infektion, bezogen auf die ungehemmte Kontrolle (MP1neo; 100% Infektion), dargestellt.

Ergebnisse

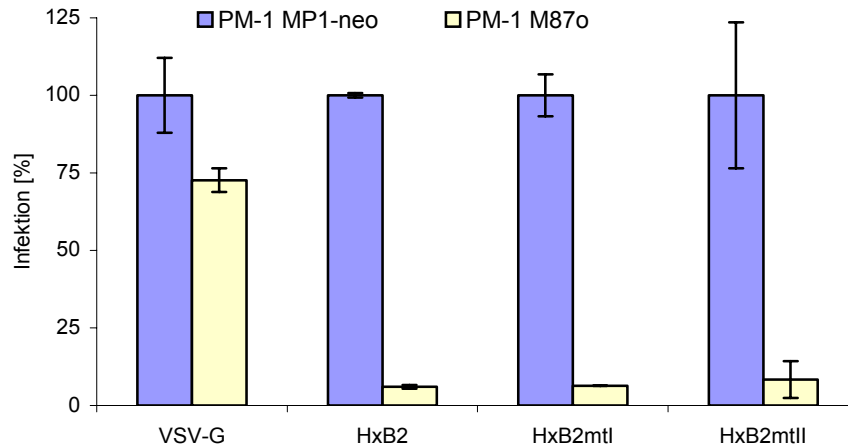


Abb. 12: Hemmversuch mit T-20-resistenten Pseudotypviren. PM-1-Zellen, die mit M87o bzw. dem Kontrollvektor MP1neo transduziert waren, wurden mit Pseudotypviren, die mit unterschiedlichen Hüllproteinen pseudotypisiert waren, infiziert. Dargestellt ist die Infektionsrate relativ zur Kontrolle. Alle T-20-resistenten HxB2-Derivate wurden durch das C46-Peptid effizient gehemmt. (HxB2 = Wildtyp, HxB2mtI bzw. HxB2mtII sind T-20-resistente HIV, VSV-G = Hüllprotein des Virus der vesikulären Stomatitis)

Das C46-Peptid hemmt HxB2-Wildtyp wie T-20-resistente Mutanten gleichermaßen effizient und hat damit ein breiteres Wirkspektrum als das zur HIV-1-Therapie zugelassene T-20-Peptid. Trotz intensivster Anstrengungen ist es bis dato nicht gelungen, C46-resistente HIV-Varianten zu selektieren (LOHRENGEL *et al.*, 2005).

4.1.3 M87o schützt primäre T-Zellen vor der HIV-1-Infektion

Nachdem das inhibitorische Potential im einfachen Zelllinienmodell gezeigt werden konnte (siehe auch EGELHOFER *et al.*, 2004; EGELHOFER, 2004), wurden primäre humane T-Zellen untersucht.

Hierfür wurden periphere Lymphozyten gesunder Spender isoliert, mit M87o transduziert und mit HIV-1_{D117II}, einem dualtropen HIV-1 (RÜBSAMEN-WAIGMANN *et al.*, 1989), infiziert. Zum Zeitpunkt der Infektion exprimierten etwa 24,2% der Lymphozyten das C46-Peptid (Abb. 13).

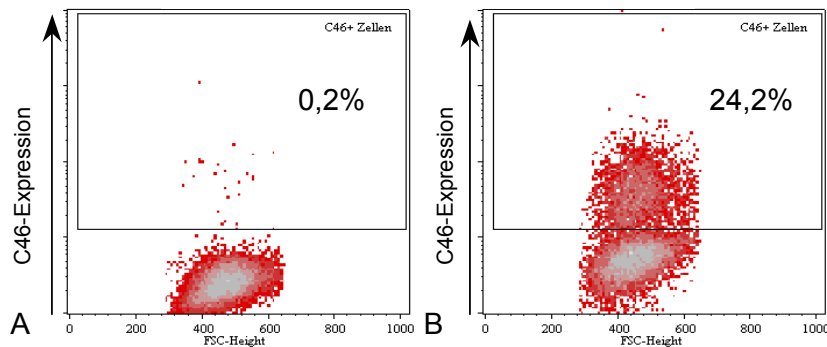


Abb. 13: Periphere Blutlymphozyten exprimieren nach Transduktion mit M87o das inhibitorische C46-Peptid auf ihrer Oberfläche. Die primären Zellen wurden mit dem retroviralen Vektor MP1neo (A) bzw. M87o (B) transduziert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression des inhibitorischen C46-Peptides nach 2F5-Färbung im Durchflusszytometer nachgewiesen.

Abb. 14 zeigt die populationsdynamischen Effekte der HIV-1-Replikation auf die Zusammensetzung von Lymphozytenkulturen. M87o⁺ Zellen reicherten sich in der infizierten Kultur an, während die ungeschützten Zellen durch das Virus zerstört wurden.

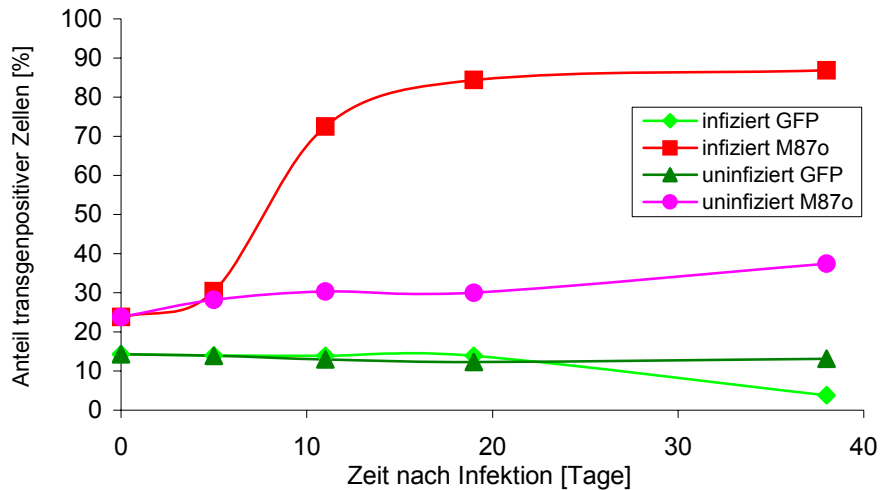


Abb. 14: M87o-positive Zellen reicherten sich in Anwesenheit von HIV-1_{D117II} an. GFP⁺ Zellen, die keinen selektiven Überlebensvorteil besitzen, zeigten keine Anreicherung. Ohne Selektionsdruck blieb der Anteil M87o⁺ Zellen konstant.

Der Anteil der M87o⁺ Zellen stieg unter dem Selektionsdruck des Virus von 24% auf 82% an. In der nichtinfizierten Parallelkultur blieb der Anteil konstant. Da GFP den Zellen keinen Überlebensvorteil verleiht, konnten sich keine GFP⁺ Zellen anreichern. Am Tag 38 war die infizierte GFP-Kultur vollständig abgestorben.

Um die Virusreplikation zu bestimmen, wurde der Gehalt an p24-Antigen in zellfreiem Kulturmedium (s. Abb. 15) mittels ELISA quantifiziert.

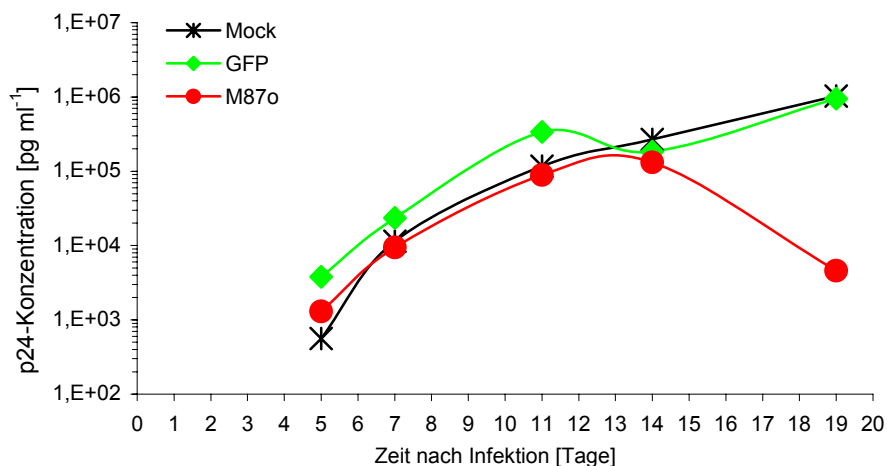


Abb. 15: Verlauf der HIV-Replikation, bestimmt aus dem p24-Gehalt im Kulturmedium. Das Virus vermehrte sich ungehindert in den ungeschützten Kulturen. Im Gegensatz hierzu replizierte das Virus in den M87o-Kulturen nur bis zum 14. Beobachtungstag ungehemmt. Danach war die p24-Produktion, und damit die Virusreplikation rückläufig.

Die HIV-Replikation verlief in den Kulturen der untransduzierten und GFP-transduzierten Zellen sehr ähnlich. Die M87o-Mischkulturen exprimierten allerdings nur anfänglich vergleichbare p24-Mengen. Ab dem Zeitpunkt, als der Anteil der M87o⁺ Zellen auf ca. 70% angestiegen war, wurde die Virusreplikation zunehmend inhibiert.

Weiteren Aufschluss über den Verlauf der HIV-Replikation geben die Kurven der CD4⁺ T-Zellpopulationen (Abb. 16). In den Kulturen der untransduzierten bzw. GFP-transduzierten Zellen ging die Replikation mit einer Depletion der CD4⁺ Zellen einher. In den M87o-Kulturen waren die CD4⁺ Zellen vor der Zerstörung geschützt.

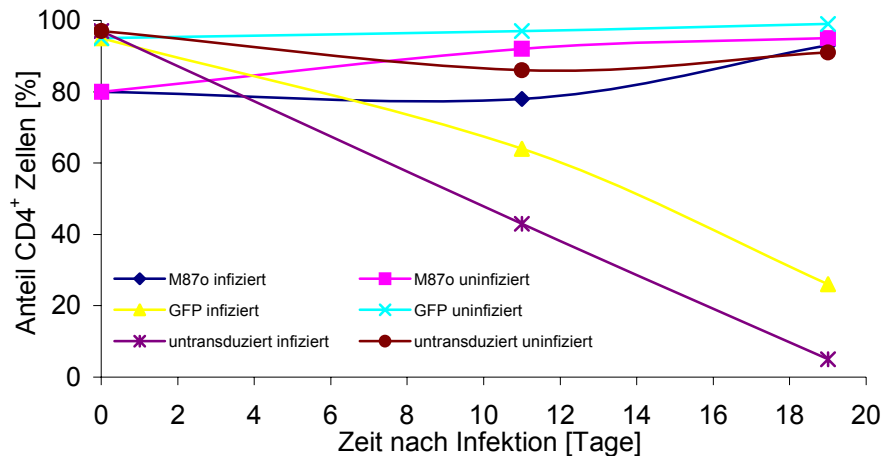


Abb. 16: M87o schützt CD4⁺-Zellen. Der Anteil an CD4⁺ Zellen nahm in den infizierten Kulturen der untransduzierten bzw. GFP-transduzierten Zellen kontinuierlich ab. Im Gegensatz hierzu blieb ihr Anteil in den M87o-transduzierten Proben stabil.

Nachdem die antivirale Aktivität von M87o in Zelllinien und primären T-Zellen nachgewiesen war, wurden *in vitro*-Untersuchungen zur Toxizität des retroviralen Vektors durchgeführt.

4.2 Präklinische *in vitro*-Untersuchungen zur Unbedenklichkeit von M87o

Für die *ex vivo*-Gentherapie der HIV-Infektion müssen dem Patienten CD4⁺ T-Zellen entnommen, genetisch modifiziert und reinfundiert werden. Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten gentherapeutischen Verfahren stellen die autologen M87o⁺/CD4⁺ T-Zellen ein individuell hergestelltes Arzneimittel dar. Für die in Verkehrbringung eines Arzneimittels müssen dessen Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. Die Qualität umfasst die stofflichen Eigenschaften, die durch das Herstellungsverfahren bestimmt sind. Unter Wirksamkeit versteht man die Summe der im Hinblick auf ein Behandlungsziel erwünschten Wirkungen. Arzneimittel können stets auch unerwünschte oder gar schädliche Wirkungen haben. Im Rahmen einer Unbedenklichkeitsprüfung muss bewertet werden, ob Ausmaß und Risiko des Auftretens einer unerwünschten Nebenwirkung in einem vertretbaren Verhältnis zum erwarteten Nutzen stehen. Bevor Arzneimittel im Rahmen einer klinischen Prüfung am Menschen untersucht werden dürfen, müssen diese in präklinischen Labor- und Tierversuchen auf pharmakologische Effekte und Toxizität charakterisiert werden.

BAUM *et al.* (2003) haben eine Zusammenstellung möglicher Nebenwirkungen retroviraler Gentherapien verfasst. Die Autoren beziehen sich in ihren Ausführungen auf hämatopoetische Stammzellen, aber die grundsätzlichen Verhältnisse lassen sich in vielen Punkten auch auf den retroviralen Gentransfer in periphere Lymphozyten übertragen. In Tab. 1 sind für die gentherapeutische Anwendung spezifische Nebenwirkungen zusammengestellt und mit Beispielen erläutert (aus BAUM *et al.*, 2003; modifiziert).

Tab. 1: Zusammenstellung gentherapiespezifischer Nebenwirkungen, die grundsätzlich bei der Anwendung in primären Lymphozyten zu erwarten sind. (aus BAUM *et al.*, 2003, modifiziert)

Nebenwirkung (Art oder Ursache)	Beispiel
• Kultureinflüsse	Einschränkung des T-Zellrezeptorrepertoires
• Vektorpartikeltoxizität	Fusogene Eigenschaften der Hüllproteine
• Genotoxizität	Insertionsmutagenese
• Phänotoxizität	Interferenz des Transgenproduktes mit zellulären Prozessen wie Signalnetzwerken
• Toxizität des Selektionsverfahrens	Nebenwirkungen der Toxine zur Selektion transgenpositiver Zellen
• Immunologische Reaktionen	Elimination der manipulierten Zellen durch das Immunsystem des Rezipienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden präklinische Untersuchungen zur Abschätzung möglicher unerwünschter Wirkungen durchgeführt. *In vitro*-Assays wurden verwendet, um Fragen zur Geno- und Phänotoxizität zu beantworten. Fragen zur Immunogenität von M87o wurden im Rhesusaffenmodell untersucht (s. Kap. 4.3.2). Der Einfluss der Kulturbedingungen auf das T-Zellrezeptorrepertoire sollten erst später im Rahmen einer klinischen Studie untersucht werden und war daher nicht Bestandteil dieser Arbeit.

4.2.1 Rat-1-Zellen werden von M87o nicht transformiert

Seit ihrer Entdeckung durch Peyton Rous 1911 werden die Retroviren mit Neoplasien in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der retrovirale Vektor M87o bzw. das von ihm exprimierte Transgen Zellen transformieren können. Hierfür wurde die Rattenfibroblastenzelllinie Rat-1 (SMALL *et al.*, 1987; RICKETTS *et al.*, 1988; KROSL *et al.*, 1998) verwendet. Diese zeichnet ein geringes endogenes Potential ($< 10^{-5}$) zur Koloniebildung in Weichagar aus. Durch ein transformierendes Ereignis wird die Kontakthemmung, die das Zellwachstum normalerweise begrenzt, aufgehoben und die Zellen bilden in Weichagar Kolonien (siehe Abb. 17).

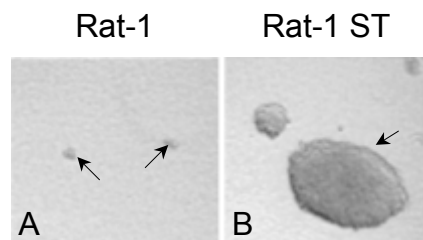


Abb. 17: Normale (A) Rat-1-Zellen, bilden in Weichagar keine Kolonien. Zellen, die durch Expression des großen T-Antigens von SV40 transformiert wurden (B), bilden dagegen Kolonien in Weichagar.

Zur Abschätzung des transformierenden Potentials von M87o wurden Rat-1-Zellen transduziert, nach 2F5-Färbung mittels Durchflusszytometer auf M87o-Expression sortiert und in Weichagar-Assays (SMALL *et al.*, 1987, RICKETTS *et al.*, 1988) auf Bildung von Kolonien untersucht. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Rat-1-Zellen und mit M56a (SCHAMBACH *et al.* 2000, Vektor mit der Gensequenz für GFP) transduzierte Zellen ebenfalls durchflusszytometrisch sortiert und analysiert. Als Positivkontrolle wurden Rat-1-Zellen mit M318 transduziert, einem retroviralen Vektor, der das große T-Antigen von SV40 (Simian Virus 40, Papovaviridae) exprimiert. SV40 verursacht bei neugeborenen Hamstern und Mäusen die Bildung von Tumoren. Das große T-Antigen bindet an zelluläre Tumorsuppressorproteine wie z. B. p53, und immortalisiert dadurch die Zelle (MODROW und FALKE, 1998).

In Abb. 18 ist die mittlere relative Koloniebildungsrate, bezogen auf die untransduzierte Kontrolle, grafisch dargestellt. Die Koloniebildungsrate der M87o-transduzierten Zellen war nicht signifikant höher als die der untransduzierten

Kontrollzellen, gleiches galt für die M56a-transduzierten Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigten die M318-transduzierten Zellen eine 92,2-fach erhöhte relative Koloniebildungsrate.

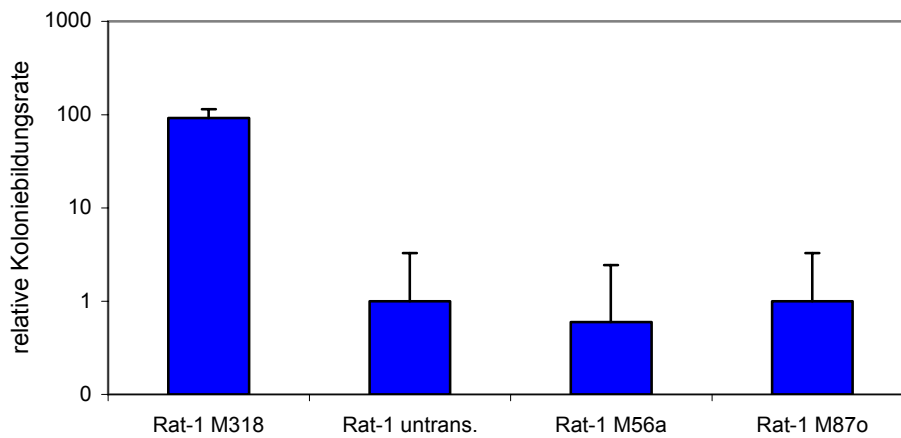


Abb. 18: Rat-1-Zellen wurden durch Transduktion mit M87o nicht transformiert. Dargestellt sind die mittleren relativen Koloniebildungsraten (n = 5), bezogen auf untransduzierte Rat-1 Zellen. M87o erhöhte die relative Koloniebildungsrate nicht.

Im Weichagar-Assay konnte für M87o kein erhöhtes Transformationspotential nachgewiesen werden.

4.2.2 Die Expression von M87o verändert primäre Lymphozyten weder phänotypisch noch funktionell

Für die Gentherapie der HIV-1-Infektion müssen große Mengen an T-Zellen *ex vivo* stimuliert, transduziert und expandiert werden. Durch diese Prozesse sollten die Zellen möglichst wenig in Funktionalität und Phänotyp modifiziert werden. Die funktionelle Integrität der Zellen lässt sich z.B. mit Hilfe von Stimulationsversuchen nachweisen. Hierbei werden die Zellen durch Zugabe eines mitogenen Stimulus zur Proliferation angeregt und das spezifische Zellwachstum mittels ^3H -Thymidineinbau quantifiziert. Der Phänotyp der Zellen lässt sich durch Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen im Durchflusszytometer bestimmen.

4.2.2.1 Phänotypische Prüfung: M87o verändert die Expression charakteristischer Oberflächenmarker nicht

Blutzellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisieren. In ersten Experimenten zur Phänotoxizität wurde daher untersucht, ob der Vektor M87o bzw. das exprimierte Transgen einen Einfluss auf die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle ausüben. Hierzu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, peripheral mononuclear blood cells) aus Frischblut gesunder Spender isoliert und mit M87o transduziert. Zur Kontrolle wurden untransduzierte Zellen, sowie Zellen, die mit M56a (exprimiert nur GFP) transduziert waren, parallel kultiviert.

Die mittleren Gentransferraten waren hierbei vergleichbar (M87o: 25,2% ± 8,3%; M56a: 30,62% ± 11,7%).

Zur phänotypischen Charakterisierung der Zellpopulationen wurde die Expression verschiedener Oberflächenproteine (CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA) im Durchflusszytometer detektiert. Wie in Abb. 19 dargestellt hatte M87o keinen Einfluss auf die Verteilung der CD3/CD4- bzw. CD3/CD8-Subpopulationen. Als T-Zellen wurden alle Zellen definiert, die das CD3-Antigen exprimieren. Die Populationen bestanden zu annähernd 100% aus CD3⁺ Zellen (untransduziert 97,1% ± 0,5%; M87o-transduziert 97,1% ± 0,4%).

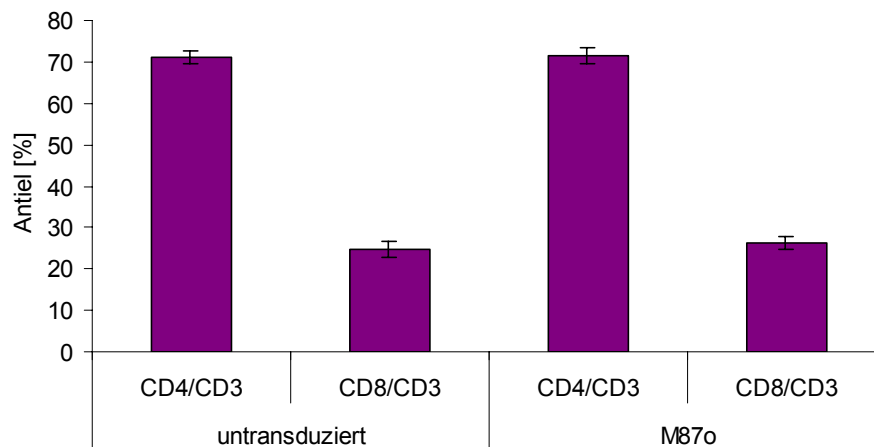


Abb. 19: Die prozentuale Zusammensetzung der CD3⁺-Subpopulationen blieb unbeeinflusst. Die Darstellung der mittleren prozentualen Verteilung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺) nach Transduktion zeigte keine Veränderungen. (n = 3)

Die prozentualen Anteile der CD25-, CD45RA-positiven Zellen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Ergebnis der phänotypischen Charakterisierung der Zellpopulationen nach Transduktion. Wiedergegeben sind die mittleren prozentualen Anteile der jeweiligen Population. (n = 3)

	CD3 ⁺	CD25 ⁺	CD45RA ⁺
untransduzierte Zellen	97,1% ± 0,5%	69,2% ± 2,5%	3,9% ± 3,4%
M87o-transduzierte Zellen	97,1% ± 0,4%	67,9% ± 0,5%	7,2% ± 6,0%

Mehr als 2/3 der Zellen exprimierten das CD25-Antigen. Dieses Oberflächenantigen ist die α-Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors und wird von T-Zellen erst nach Antigenstimulation exprimiert.

Ein geringer Anteil der Zellen exprimierte das CD45RA-Antigen. Dieses wird von naiven T-Zellen exprimiert. Diese sind durch den Phänotyp CD45RA⁺/CD45RO⁻ charakterisiert. Naive T-Zellen hatten noch keinen Kontakt mit ihrem Antigen. Nach Antigenerkennung proliferieren diese Zellen und werden zu Effektorzellen (RILEY *et al.*, 1998). Der Anteil CD45RA⁺ Zellen war in der transduzierten Fraktion im Mittel (7,2% ± 6,0%) etwas erhöht. Der Anteil CD45RA⁺ Zellen schwankte zwischen den drei getesteten Spendern sehr stark und die Unterschiede waren nicht signifikant.

4.2.2.2 Funktionelle Prüfung: Die Stimulierbarkeit primärer T-Zellen wird durch M87o nicht verändert

Nachdem die phänotypischen Untersuchungen gezeigt hatten, dass M87o in Lymphozyten die Expression charakteristischer Oberflächenmarker nicht beeinflusst, wurde untersucht, ob M87o die Funktion von T-Zellen beeinträchtigen kann. Eine wichtige Eigenschaft funktionsfähiger T-Zellen ist ihr Vermögen, nach der Erkennung eines MHC-gebundenen Antigens zu proliferieren. Das aktivierende Signal wird dabei durch den mit dem T-Zellrezeptorkomplex (TCR) assoziierten CD3-Komplex erzeugt. Die antigenspezifische TCR/MHC-Interaktion kann, in Gegenwart von Interleukin-2 durch Antikörper, wie OKT-3, die direkt an den CD3-Komplex binden, ersetzt werden. Da die T-Zellen hierbei unabhängig von Ihrer Antigen-spezifität stimuliert werden, ist die resultierende Proliferation polyklonal.

Für die funktionelle Charakterisierung primärer M87o⁺ T-Zellen wurde die Proliferation nach polyklonaler OKT-3/IL-2-Stimulation untersucht. Hierzu wurden transduzierte T-Zellen mit OKT-3/IL-2 stimuliert. Die DNA-Neusynthese und damit das Zellwachstum wurde mit Hilfe des ³H-Thymidin-Einbaus quantifiziert. Abb. 20 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes.

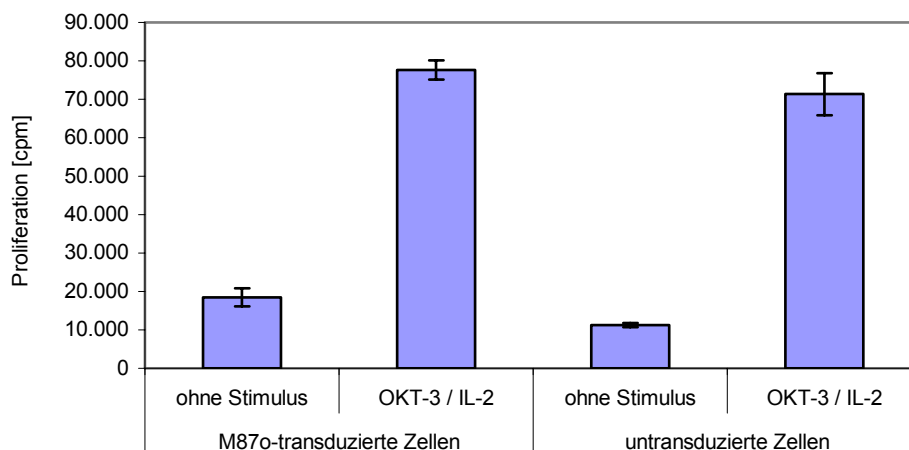


Abb. 20: M87o hatte keinen Einfluss auf die Proliferation primärer T-Zellen. M87o-transduzierte und untransduzierte Zellen proliferierten nach Stimulation mit OKT-3/IL-2 gleich stark. (n = 3)

Wie in Abb. 20 ersichtlich, proliferierten die M87o-transduzierten Zellen der drei Parallelkulturen nach OKT-3/IL-2-Stimulation (77.590 cpm ± 2.487) ebenso gut wie die untransduzierten Kontrollzellen (71.335 cpm ± 5.531). M87o hat demnach keinen nachweisbaren Einfluss auf die Funktionalität der T-Zellen in diesem Assay.

4.3 Untersuchungen zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie im Rhesusmakakenmodell

Die zellulären Tests zeigten für Vektor und Transgen weder transformierendes noch cytotoxisches Potential. Im syngenem, murinen T-Zelltransplantationsmodell wurden keine Anzeichen für Toxizität gefunden (VON LAER, persönliche Mitteilung), gleiches gilt für Untersuchungen im syngenem, murinen Knochenmarktransplantationsmodell (VON LAER, persönliche Mitteilung). Zusammengenommen rechtfertigten die Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen und den Mausmodellen weitere Studien zur Verträglichkeit im Rhesusaffenmodell. Wie DONAHUE und DUNBAR (2001) beschreiben, sind Ergebnisse aus autologen Transplantationsmodellen im Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) sehr gute auf die Situation im humanen System übertragbar. Daher wurde zunächst ein Protokoll zur Transduktion peripherer Rhesusaffenlymphozyten entwickelt.

4.3.1 Entwicklung des Transduktionsprotokolls für Rhesusaffenlymphozyten

Allgemein lassen sich Transduktionsprozesse für primäre T-Zellen in drei Abschnitte gliedern:

1. Prästimulation: Primäre T-Zellen liegen in der Peripherie meist in ruhendem Zustand vor. Retrovirale Vektoren, die sich vom murinen Leukämievirus (MLV) ableiten, können ihr Genom nur in sich-teilende Zellen integrieren (MILLER *et al.*, 1990). Nur zwischen mitotischer Pro- und Telophase, ist die Kernmembran aufgelöst und retrovirale Vektoren haben Zugang zum Chromatin. Sie sind nicht in der Lage aktiv die Kernmembran zu überwinden (ROE *et al.*, 1993). Aus diesem Grund müssen T-Zellen vor der Transduktion zur Zellteilung angeregt werden. Um ein möglichst breites T-Zellrepertoire genetisch zu modifizieren, ist eine polyklonale Stimulation notwendig. Dies wird z. B. durch Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA, ein Bohnenlektin) oder Antikörpern, die gegen das CD3-Antigen gerichtet sind, erreicht.
2. Transduktion: Für die Übertragung der genetischen Information werden die stimulierten T-Zellen mit Vektorpartikeln inkubiert. Durch sequentiell wiederholte Transduktionen, oder durch die Zugabe von „Hilfsstoffen“, wie z. B. Protaminsulfat oder Polybrene, kann der Gentransfer erleichtert werden.
3. Expansion: Die Anzahl an Zellen, die für eine autologe Transplantation aus dem peripheren Blut abgesammelt werden können, ist limitiert und für eine therapeutische Anwendung, im Rahmen der HIV-Gentherapie, zu gering. Aus Sicherheitsgründen sollte die Gentransferrate die 30%-Marke nicht überschreiten, da bei höheren Transferraten das statistische Risiko für Insertionsmutagenesen stark ansteigt (KUSTIKOVA *et al.*, 2003). Eine therapeutische Dosis genetisch modifizierter Zellen, lässt sich daher in der Regel nur dadurch gewinnen, dass die Zielzellen zusätzlich *in vitro* expandiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die einzelnen Teilschritte der Prästimulation, Transduktion und *ex vivo*-Expansion von Makakenzellen optimiert werden.

4.3.1.1 Der anti-CD3-Antikörpern SP34 eignet sich hervorragend zur Stimulation von Rhesusaffenlymphozyten

T-Zellen können *in vitro* durch Antikörper stimuliert werden, die das CD3-Oberflächenantigen binden (MOVASSAGH *et al.*, 2000, siehe auch Kap. 4.2.2.2). Für die Etablierung des Transduktionsprotokolls sollten zunächst monoklonalen anti-Rhesus-CD3-Antikörper getestet werden. Anti-humane Antikörper wie z. B. Okt-3 sind in der Regel nicht kreuzreaktiv und daher für die Stimulation von Rhesusaffen-Lymphozyten ungeeignet. Aus diesem Grund wurden FN18 (BUNNELL *et al.*, 1995) und SP34 (BERGER *et al.*, 2003) getestet.

Die Antikörper wurden auf den Oberflächen von Zellkulturschalen in verschiedenen Konzentrationen immobilisiert und die Zellen darin in Anwesenheit von IL-2 kultiviert. Die Proliferation wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau quantifiziert. In Abb. 21 sind für den direkten Vergleich der beiden Antikörper die ermittelten Stimulationsindices (Stimulationswert bezogen auf Medium mit IL-2) wiedergegeben. SP34 stimulierte die Zellen deutlich stärker als FN-18.

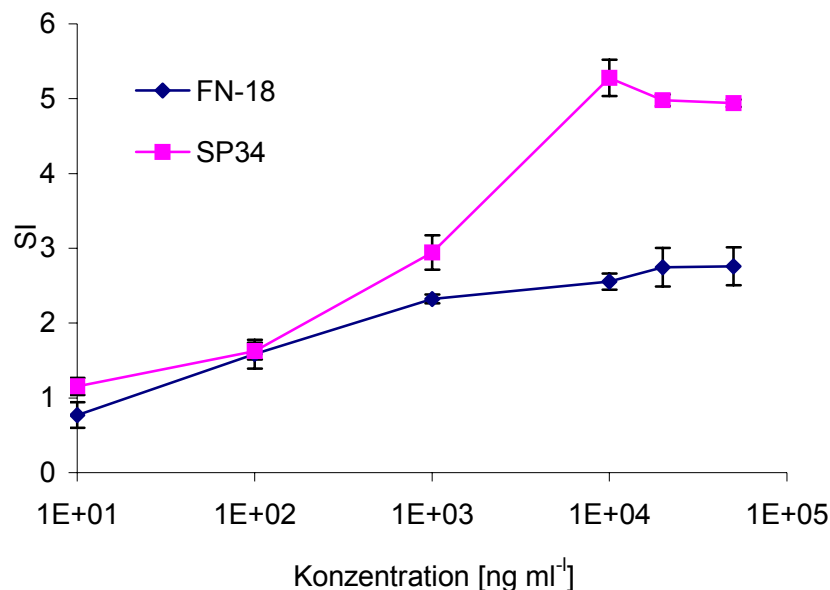


Abb. 21: Titration von anti-CD3 SP34 und FN-18. Wiedergegeben sind die Stimulationsindices (SI) bezogen auf die Kontrolle mit Medium und IL-2. Der Si_{max} -Wert ist nach SP34-Stimulation mit $4,9 \pm 0,05$ deutlich höher als nach FN-18-Stimulation ($Si_{max} = 3 \pm 0,25$). Der Sättigungsbereich beider Antikörper beginnt bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. (n = 4)

Die SP34-Titrationskurve folgt einer Dosis-Wirkungsbeziehung und geht ab einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in die Sättigung. Die deutlich flacher verlaufende Kurve von FN-18 geht ebenfalls ab $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in den Sättigungsbereich über. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde, soweit nicht abweichend vermerkt, SP34 in einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ verwendet.

4.3.1.2 Co-Stimulation: α -CD28 oder IL2?

Im Gegensatz zu der von BUNNELL *et al.* (1995) publizierte Kombination aus FN-18 (50 ng ml^{-1} in Lösung) und IL-2 (200 U ml^{-1}), beschrieben neuere Protokolle für klinische Anwendungen (LEVINE *et al.*, 1998; MITSUYASU *et al.*, 2000; DERKS *et al.*, 2002; LEVINE *et al.*, 2002) eine Kombination aus anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern zur Stimulation von T-Zellen. FERRAND *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die CD3/IL-2-Stimulation eine deutliche Einengung des T-Zellrezeptorrepertoires verursacht, während eine CD3/CD28-Stimulation dieses konserviert.

Im Rahmen der Optimierung des Transduktionsprotokolls wurde untersucht, ob IL-2 durch den monoklonalen anti-CD28-Antikörper Leu28 (ZHANG *et al.*, 2003) ersetzt werden kann. Hierzu wurde SP34 auf der Oberfläche der Kulturschale immobilisiert und darin Blutlymphozyten mit Leu28 ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert. Die Proliferation wurde mittels ^3H -Thymidineinbau quantifiziert (Abb. 22).

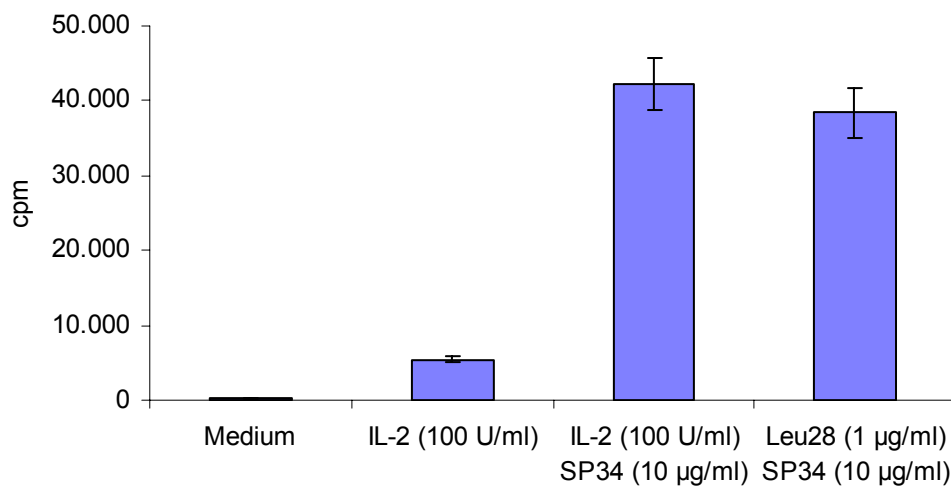


Abb. 22: Vergleichende Darstellung der Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 SP34 in Anwesenheit von IL-2 (100 U ml^{-1}) bzw. in Anwesenheit von anti-CD28 Leu28 ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). Zur Kontrolle wurden Zellen mit Medium oder IL-2 (100 U ml^{-1}) mitgeführt. (n = 4)

Wie aus Abb. 22 ersichtlich, wurde die Zellproliferation durch Co-Stimulation mit Leu28 ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) ebenso stark stimuliert wie durch IL-2/SP34. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Experimenten die Kombination SP34 ($10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$)/Leu28 ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) für die Prästimulation eingesetzt. Damit wurde auch den bereits von anderen Gruppen publizierten Daten, die weitere Vorteile der CD3/CD28-Stimulation zeigen (z. B. Konservierung des T-Zellrezeptorrepertoires) Rechnung getragen.

4.3.1.3 FKS kann während der Kultur durch autologes Rhesusaffenserum ersetzt werden

Die *ex vivo*-Kultur von Rhesusaffenzellen in FKS-haltigem Medium kann dazu führen, dass die Zellen infolge einer humoralen Immunreaktion gegen bovine Proteine abgestoßen werden (BUNNELL *et al.*, 1997). Derartige Beobachtungen wurden bereits für das humane System publiziert (SELVAGGI *et al.*, 1997; TUSCHONG *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob das fötale Kälberserum durch autologes Rhesusaffenserum ersetzt werden kann. Die Schwierigkeit bestand hierbei darin, dass autologes Serum nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung stand, also nach dem Grundsatz „so viel Proliferation wie nötig bei gleichzeitig so geringem Serumverbrauch wie möglich“ zu verfahren war.

Um die Proliferation in Anwesenheit von autologem Serum zu untersuchen, wurden Affenlymphozyten mit SP34 und Leu28 stimuliert und in Anwesenheit von autologem, hitzinaktiviertem Serum unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des ^3H -Thymidineinbaus quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 graphisch wiedergegeben.

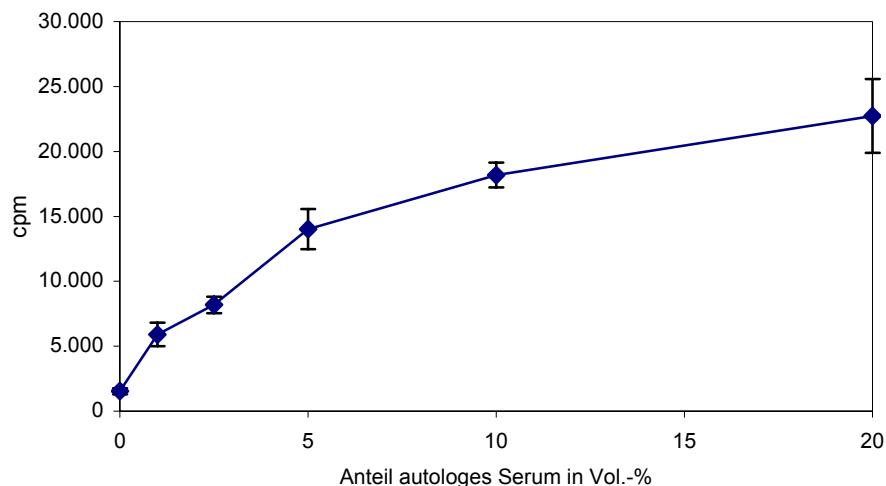


Abb. 23: Die Proliferation der Makakenzellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen autologen, hitzinaktivierten Serums folgte einer Sättigungskurve. Ein Anteil von 5 Vol.-% ist ausreichend um hinreichende Proliferation zu gewährleisten, ohne einen zu hohen Serumbedarf zu verursachen. (Stimulation: SP34 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, Leu28 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$)

Die Proliferation folgte erwartungsgemäß einer Sättigungskurve. Ab einem Serumanteil von 5% flachte die Kurve deutlich ab und die Proliferation stieg mit der Erhöhung des Serumanteils immer geringer an. Für die weiteren Experimente wurde ein Anteil von 5% autologes Serum verwendet.

4.3.1.4 Periphere mononukleäre Blutzellen von Rhesusmakaken können *ex vivo* effizient transduziert werden

Die etablierte Methode zur Vorstimulation peripherer Makakenlymphozyten wurde anschließend in Transduktionsversuchen getestet. Blutlymphozyten wurden für drei Tage mit SP34 und Leu28 stimuliert und transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion (Kap. 3.2.10, s. 30) in Medium mit IL-2 (100 U ml⁻¹) expandiert. Zwei Tage nach Transduktion wurde die Gentransferrate, nach 2F5-Färbung, im Durchflusszytometer bestimmt. Wie in Abb. 24 wiedergegeben lag die Transduktionseffizienz bei 25%.

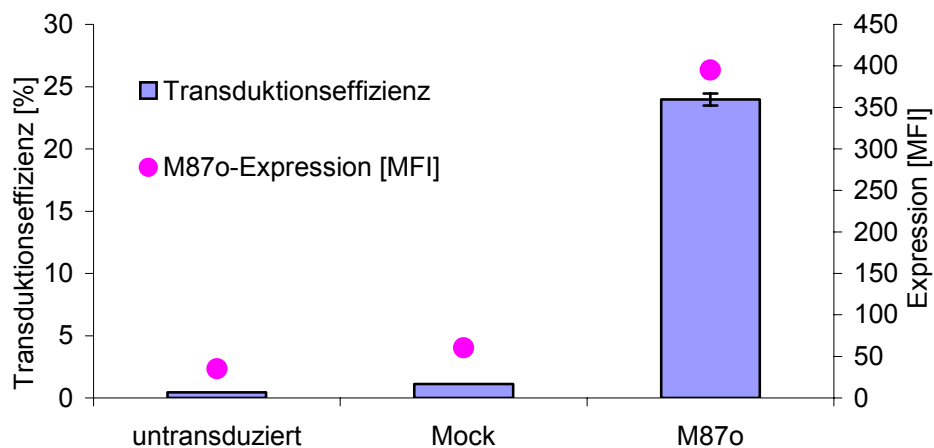


Abb. 24: Lymphozytenkulturen wurden mit dem etablierten Protokoll stimuliert und anschließend transduziert. Hierbei wurde eine Gentransferrate von 25% erreicht.

Das in den Vorversuchen etablierte Stimulationsverfahren erlaubt *ex vivo* eine effiziente Transduktion primärer Rhesusaffenlymphozyten.

4.3.1.5 Die Gentransferrate kann durch RetroNectin gesteigert werden

Nachdem gezeigt wurde, dass mit den beschriebenen Prästimulationsbedingungen eine Gentransferrate von 25% erreicht werden kann, wurde untersucht, ob die Verwendung von RetroNectin-beschichteten Kulturgefäßen die Gentransferrate weiter steigert. RetroNectin ist ein ~63 kDa großes Fibronektinfragment, das recombinant hergestellt wird (KIMIZUKA *et al.*, 1991). Es enthält eine zentrale Zellbindungsdomäne, eine hochaffine Heparinbindungsdomäne und eine CS1-Domäne. Der retrovirale Gentransfer kann durch Anwesenheit von RetroNectin gesteigert werden (HANENBERG *et al.*, 1996; POLLOK *et al.*, 1997). RetroNectin vermittelt wahrscheinlich die Co-Lokalisierung von Zelle und Vektorpartikel durch Bindung beider Partner.

Um den Einfluss von RetroNectin auf den retroviralen Gentransfer in Rhesusaffenlymphozyten zu untersuchen wurden periphere Blutlymphozyten für drei Tage mit SP34 und Leu28 vorstimuliert und anschließend transduziert. Hierfür wurden RetroNectin-beschichtete Zellkulturplatte verwendet. Als Kontrolle dienten herkömmliche 24 Lochplatten. Beide Plattentypen wurden mit Vektorüberstand

vorbeladen (Kap. 3.2.11, s. 31) und je Ansatz $1 \cdot 10^6$ Zellen in Vektorüberstand ausgesät. Schließlich wurden die Zellen für 90 min bei 30°C (BUNNELL *et al.*, 1995) und 2000 UpM zentrifugiert. Die Transduktion wurde am folgenden Tag wiederholt. Die Gentransferraten wurden nach 2F5-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt und sind in Abb. 25 vergleichend dargestellt.

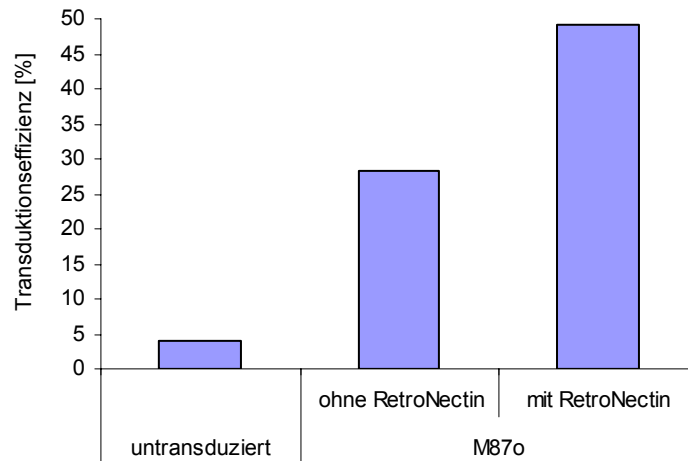


Abb. 25: Vergleichende Gegenüberstellung der Gentransferraten in An- bzw. Abwesenheit von RetroNectin. Die Verwendung RetroNectin-beschichteter Kulturgefäße erhöhte die Gentransferrate deutlich (ohne RetroNectin 28,24% gegenüber 49,11% mit RetroNectin).

Die Transduktionseffizienz konnte durch die Verwendung von RetroNectin fast verdoppelt werden (49,11% mit RetroNectin, 28,24% ohne RetroNectin).

4.3.1.6 Das entwickelte Protokoll zur Transduktion primärer Rhesusaffen-Lymphozyten

Aus den dargestellten Versuchen wurde ein Protokoll für den retroviralen Gentransfer in primäre Rhesusaffenlymphozyten abgeleitet, das abschließend zusammenfassend skizziert werden soll.

1. Prästimulation:

- in Anwesenheit von SP34 ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$, immobilisiert), Leu28 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) und 5% autologem Serum
- Dauer drei Tage

2. Transduktion:

- Verwendung von RetroNectin
- Vorbeladen der Kulturoberfläche durch Aufzentrifugieren (30 min bei 4 °C und 2500 UpM) von Vektorüberstand
- drei Transduktionen

3. Expansion:

- In Medium mit 5% autologem Serum und IL-2 100 (U ml^{-1}).

Das etablierte Transduktionsprotokoll wurde im Rahmen der nachfolgend beschriebenen präklinischen Studie zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie im Rhesusmakakenmodell umgesetzt.

4.3.2 Das autologe Affentransplantationsmodell – Studie zur *in vivo*-Toxizität und Immunogenität

Nachdem das Transduktionsprotokoll für Rhesusaffenlymphozyten definiert war, konnte das gentherapeutische Verfahren im Primatenmodell untersucht werden. Ziel der Studie war es, Daten über die Sicherheit des Verfahrens und die *in vivo*-Persistenz M87o⁺ autologer T-Zellen zu erhalten. Durchgeführt wurde die Studie in Zusammenarbeit mit dem Biomedical Primate Research Center (B.P.R.C.) in Rijswijk, Holland. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde das Zelltransplantat hergestellt. Die Transplantation wurde von Fachpersonal am B.P.R.C. durchgeführt. Die Studienergebnisse sind nachfolgend zusammenfassend wiedergegeben.

Für die Studie wurden zwei vierjährige, männliche Vertreter von *Macaca mulatta* ausgewählt. Zur Gewinnung der T-Zellen wurden je Affe zweimal 20 ml venöses Blut entnommen. Die Lymphozyten wurden isoliert und bis zur Verwendung kryokonserviert. Vier Wochen vor der Transplantation wurden die Zellen aufgetaut und gepoolt. Von dem Affen ID-No. 98006 wurden $3,2 \cdot 10^7$ Zellen und von dem Affen ID-No. 98023 wurden $3,6 \cdot 10^7$ Zellen geerntet. Diese wurden für 3 Tage mit SP34 ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) und Leu28 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) in Medium mit 5% autologem Serum stimuliert. An den nachfolgenden drei Tagen wurden die Zellen täglich transduziert. Hierfür wurden Zellkulturplatten mit RetroNectin beschichtet und mit Vektorüberstand beladen. Um M87o-spezifische Immunreaktionen zu detektieren, wurden Zellen mit dem transkriptionell inaktiven M87o-Derivat M87i transduziert. M87i⁺ Zellen wurden mittels quantitativer PCR (qPCR) nachgewiesen.

Nach der Transduktion wurden die Zellen für zwei Tage in Medium mit IL-2 expandiert und dann eingefroren. Die durchflusszytometrisch bestimmte Transferrate für M87o, bezogen auf CD4⁺ Zellen, betrug bei beiden Tieren 11% (Tab. 3).

Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der Zellpopulation nach Transduktion. (n. b. = nicht bestimmt)

ID	Vektor	Zellzahl	Anteil CD4-Zellen [%]	Anteil C46 ⁺ von CD4 ⁺ [%]	Anteil C46 ⁺ von CD8 ⁺ [%]
98006	M87o	$1,12 \cdot 10^8$	25	11	11
	M87i	$1,00 \cdot 10^8$	26	n.b.	n.b.
98023	M87o	$1,70 \cdot 10^8$	20	11	13
	M87i	$1,50 \cdot 10^8$	20	n.b.	n.b.

Dem Affen 98006 (5,0 kg Körpermasse) wurden insgesamt $3,08 \cdot 10^6$ M87o⁺ CD4-Zellen reinfundiert ($6,2 \cdot 10^5$ M87o⁺ CD4-Zellen kg^{-1}). Der Affe 98023 (4,65 kg Körpermasse) erhielt insgesamt $3,74 \cdot 10^6$ M87o⁺ CD4-Zellen ($8,04 \cdot 10^5$ M87o⁺ CD4-Zellen kg^{-1}). Von den M87i-Kontrollzellen wurde eine Dosis von $1,04 \cdot 10^5$ (Affe 98006) bzw. $1,29 \cdot 10^5$ (Affe 98023) M87i⁺ CD4-Zellen kg^{-1} transplantiert.

Während der Infusion wurde keine akute Toxizität beobachtet. Vorübergehend traten leichte Veränderungen des Blutbildes (Blutglucose, Leberwerte) auf. Nach der

Reinfusion wurde eine moderate Zunahme der Gesamtblutzellzahl beobachtet, die von einer Zunahme der Granulozyten begleitet war. Tier 98006 zeigte eine Abnahme der Lymphozytenzahl. Alle Werte waren bereits am Tag 3 wieder im Normbereich. Die beobachteten Abweichungen sind wahrscheinlich der Narkose mit Ketamin zuzuschreiben und treten in diesem Zusammenhang regelmäßig auf (KOOPMAN, BPRC, persönliche Mitteilung). Die Transplantation hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der B-Zellen und T-Zellpopulationen (CD4⁺ bzw. CD8⁺). Die Aktivierungsmarkerexpression (HLA-DR, CD25, CD69) zeigte innerhalb der CD4⁺ Zellpopulation ebenfalls keine signifikanten Veränderungen. Die immunologischen Untersuchungen (Cytokinfärbung, Proliferationsassay, ELISPOT) ergaben keinen Hinweis auf eine zelluläre oder humorale Immunreaktion. Die histologischen Untersuchungen von Lymphgewebe ergaben ebenfalls keine Hinweise auf Veränderungen.

Zusammengenommen betrachtet wurden im Affenmodell keine akut-toxischen Effekte, die dem gentherapeutischen Verfahren und keine Immunogenität, die M87o zugeordnet werden könnte, beobachtet.

4.3.2.1 M87o-transduzierte Zellen können *in vivo* nachgewiesen werden

Um den Verbleib der genetisch modifizierten Zellen *in vivo* zu verfolgen, wurden in regelmäßigen Abständen Blut und Gewebeproben entnommen und der Anteil transgenpositiver Zellen mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmt. Der immunochemische Nachweis M87o-positiver Zellen in Gewebeproben war aufgrund unspezifischer Hintergrundfärbung nicht brauchbar. Die Gentransferrate wurde direkt nach Transduktion mittels 2F5-Färbung und qPCR bestimmt, wobei die qPCR-Ergebnisse mit 21% (98006) und 25% (98023) deutlich über dem Wert der immunochemischen Bestimmung (11%) lagen. Wahrscheinlich enthielten einige Zellen mehrere Vektorgenome. Dies kann mittels qPCR nicht aufgelöst werden und könnte die Überschätzung der Gentransferrate erklären.

Da die 2F5-Färbung für die Bestimmung des Anteils M87o⁺ Zellen in Gewebeproben nicht brauchbar war, sind hier die Ergebnisse der qPCR wiedergegeben. Im peripheren Blut waren bis 140 Tage nach Transplantation M87o⁺ Zellen nachweisbar. Bei Affe 98023 waren M87o⁺ Zellen mehr als drei Monate und bei Affe 98006 mehr als vier Monate nach Transplantation nachweisbar. Dabei waren maximal 0,07% (98006) bzw. 0,21% (98023) der Zellen M87o⁺. Am Ende des knapp sechsmonatigen Beobachtungszeitraumes waren diese allerdings weder in Lymphknoten noch in Milz oder Knochenmark detektierbar.

Insgesamt lagen die Bestimmungen aber an der Detektionsgrenze der qPCR, sodass keine sichere Quantifizierung möglich war. In den Proben von Affe 98023 konnten M87i⁺ Zellen, mit kleinen Unterbrechungen, ab ca. zwei Monate nach Transfusion detektiert werden. Da die immunologischen Untersuchungen (Cytokinfärbung, Proliferationsassay, ELISPOT, s. auch 4.3.2.1.1) keinen Hinweis auf eine zelluläre oder humorale Immunreaktion ergaben, ist dies wahrscheinlich nicht auf eine immunologische Abstoßungsreaktion gegen M87o zurückzuführen.

Ergebnisse

Tab. 4: Chronologische Aufstellung der qPCR-Wiederfindungsraten. (n.d. = nicht detektierbar, (2/3) = zwei von drei qPCR-Ansätzen positiv, (1/3) = einer von drei Ansätzen positiv)

Tag der Probenahme	Art des beprobten Gewebes	Affe 98006		Affe 98023	
		% M87o ⁺	% M87i ⁺	% M87o ⁺	% M87i ⁺
-131	Blut	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-18	M87o-transduzierte Zellen	21	n.d.	25	n.d.
	M87i-transduzierte Zellen	n.d.	1	n.d.	1
0	Blut (nach Infusion)	0,035	n.d.	0,105	n.d.
1	Blut	0,015	n.d.	0,015	n.d.
3	Blut	0,012 ^(1/3)	n.d.	0,0065 ^(1/3)	n.d.
7	Blut	0,011 ^(2/3)	n.d.	0,015	n.d.
	Lymphknoten	n.d.	n.d.	0,001 ^(1/3)	n.d.
14	Blut	0,0065 ^(2/3)	n.d.	0,002 ^(1/3)	n.d.
21	Blut	n.d.	n.d.	0,0001 ^(1/3)	n.d.
42	Blut	0,005 ^(1/3)	n.d.	n.d.	n.d.
70	Blut	n.d.	0,001 ^(1/3)	n.d.	0,001 ^(1/3)
84	Blut	n.d.	n.d.	n.d.	0,0005 ^(1/3)
98	Blut	n.d.	n.d.	0,007 ^(1/3)	0,0015 ^(1/3)
112	Blut	n.d.	n.d.	n.d.	0,0015 ^(1/3)
140	Blut	0,003 ^(1/3)	n.d.	n.d.	0,0005 ^(1/3)
154	Blut	n.d.	n.d.	n.d.	0,0015 ^(2/3)
168	Blut	n.d.	n.d.	n.d.	0,0005 ^(1/3)
178	Lymphknoten	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Milz	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Knochenmark	n.d.	n.d.	n.d.	0,0005 ^(1/3)

4.3.2.1.1 Nachweis von C46-spezifischen Antikörpern

Neben den Untersuchungen der zellulären Immunantwort wurde untersucht, ob M87o eine Antikörperantwort auslöst. Hierfür wurde das M87o-Peptid (einschließlich Signalpeptid) recombinant in *E. coli* exprimiert und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die Membranen wurden anschließend mit den Testseren inkubiert und gebundene Antikörper mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Rhesus Antikörper nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde der 2F5-Antikörper verwendet, der mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-humanen Antikörper detektiert wurde. Als Nachweis für die Spezifität wurden die Seren mit T-20 vorinkubiert, wodurch im Falle des 2F5-Standards die spezifischen Banden „ausgelöscht“ wurden. Wie aus Abb. 26 ersichtlich, konnten keine anti-M87o Antikörper in den Serumproben der Versuchstiere nachgewiesen werden.

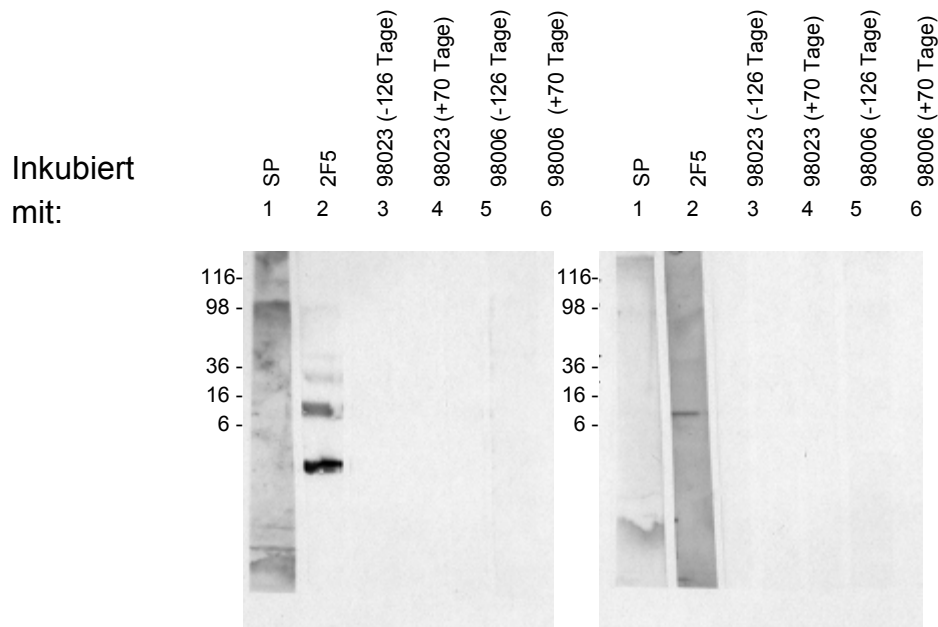


Abb. 26: Nachweis von anti-M87o-Antikörpern in Seren der Versuchstiere mittels Western Blot-Technik. In den Serumproben konnten keine anti-M87o-Antikörper nachgewiesen werden. Nur der 2F5-Kontrollantikörper entwickelte die typischen Banden. A: Recombinant hergestelltes M87o wurde auf Nitrocellulose geblottet und mit Serumproben, die vor (-126 Tage) bzw. nach Transplantation (+70 Tage) entnommen wurden, inkubiert. B: Um die Spezifität der Kontrollbanden nachzuweisen, wurden die Ansätze mit T-20 vorinkubiert, was zum Verschwinden der M87o-Banden führte.

Dies ist ein weiterer wichtiger Hinweis dafür, dass M87o nicht immunogen wirkt und damit der gentherapeutische Ansatz kein erhöhtes Risiko für immunologische Nebenwirkungen aufweist.

4.4 Vorbereitungen für eine klinische Studie der Phase I/II: Entwicklung eines Protokolls für die Produktion genetisch modifizierter Lymphozyten HIV-infizierter Spender

Nachdem *in vitro* die Wirksamkeit des antiviralen Prinzips gezeigt war und die Untersuchungen zur Immunogenität und Toxizität die Unbedenklichkeit des Verfahrens belegt hatten, sollte eine klinische Studie zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II) an freiwilligen HIV-positiven Probanden durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte ein Protokoll für die Produktion M87o-modifizierter T-Zellen, HIV-positiver Spender, im relevanten Maßstab (mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen pro Spender) entwickelt werden.

Das für die Studie definierte Probandenkollektiv bestand aus „austherapierten“ Patienten deren konventionelle antiretrovirale Therapie bereits durch das Auftreten multiresistenter Viren unwirksam geworden war. Als weitere Studieneinschluss-Kriterien war eine Viruslast von >5.000 Kopien ml⁻¹ und einer CD4-Zellzahl von 50 - 200 µl⁻¹ Blut definiert worden. Hieraus ergaben sich besondere Probleme:

- Niedrige Ausgangszellzahl: Um die angestrebte Zellzahl, von der eine therapeutische Wirkung erwartet wurde, zu generieren war bei der niedrigen CD4-Zellzahl eine *ex vivo*-Expansion der Zellen unverzichtbar, wobei die Kulturdauer so kurz wie möglich gehalten werden sollte.
- Ex vivo-Expansion von HIV: Während der Kultur musste die Virusreplikation effektiv gehemmt werden. Einerseits sollte damit die, theoretisch mögliche *in vitro*-Selektion M87o-resistenter Viren verhindert werden, andererseits war die Superinfektion der Patienten mit *in vitro* expandiertem HIV nicht vertretbar.
- Multiresistente HIV: Da die konventionelle antiretrovirale Therapie *in vivo* versagt hatte, war es nötig, einen neuen Medikamentencocktail zu definieren, der *in vitro* die Viren aller Studienpatienten effektiv hemmt. Bei der Auswahl der Hemmsubstanzen und der anschließenden Dosisfindung musste berücksichtigt werden, dass diese den retroviralen Gentransfer beeinträchtigen und die Zellen schädigen können.

4.4.1 CD8⁺ T-Zellen können sehr effektiv depletiert werden

Die CD8⁺ T-Zellen konkurrieren während der Herstellung des Zellpräparates mit den CD4⁺ T-Zellen um Stimulus, Nährstoffe und um Vektorpartikel. Das Ziel des therapeutischen Ansatzes ist der Schutz der CD4⁺ T-Zellen, daher sollten die CD8⁺ T-Zellen vor der Prästimulation depletiert werden.

Hierfür wurden antikörpergekoppelte magnetische Beads der Firmen Dynal und Miltenyi getestet. PBMC HIV-1-positiver Spender (n = 8) wurden über einen Dichtegradienten aufgereinigt und die CD8-Zellen mittels anti-CD8-Beads markiert und, gemäß Herstellerprotokoll, in einem Magnetfeld von den unmarkierten Zellen separiert. Die CD8-Anteile wurden nach Antikörperfärbung für die Ausgangspopulation und die depletierten Fraktionen mittels Durchflusszytometer bestimmt. In Abb. 27 sind die CD8-Restanteile sowie die prozentuale Abreicherung dargestellt.

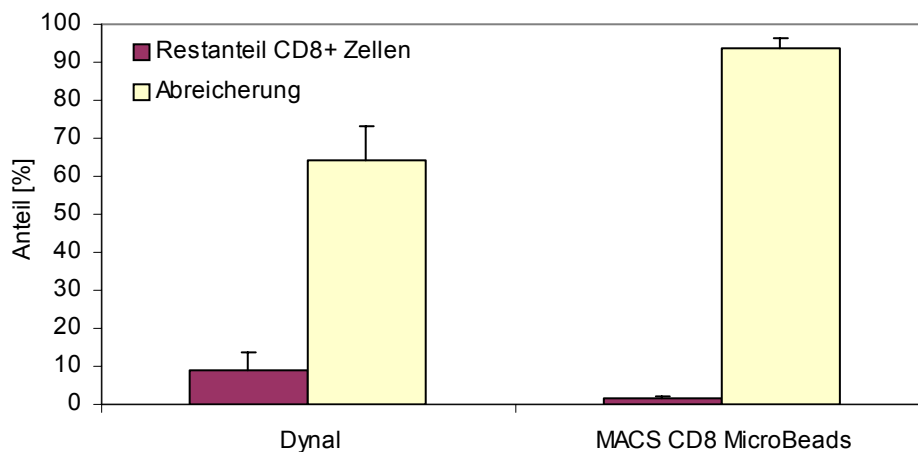


Abb. 27: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von CD8-Depletionsversuchen mit CD8-Beads der Firmen Dynal und Miltenyi. Die Depletion mit Dynal-CD8-Beads ergab im Mittel (je Protokoll n = 4) mit 9,08% ± 4,85% einen höheren CD8-Restanteil als mit MACS CD8 MicroBeads (1,5% ± 0,79%).

Die CD8-Depletion mittels MACS CD8 MicroBeads ergab eine deutlich reinere Zellfraktion als die Depletion mittels Dynal-System. Mit dem Miltenyi-System wurden im Mittel 93,9% ± 2,5% der CD8-Zellen depletiert. Dagegen wurden mit dem Dynal-System im Mittel nur 64,1% ± 9,1% der CD8-Zellen depletiert. Für alle folgenden Experimente wurde das MACS CD8 MicroBeads-System zur CD8-Depletion eingesetzt.

4.4.2 Stimulationsbedingungen - Vergleich CD3/CD28-Beads/IL-2 und OKT-3/IL-2

Wie bereits in Kap. 4.3.1.1 dargestellt, müssen primäre periphere Blutlymphozyten zur Teilung angeregt werden, bevor die retrovirale Transduktion erfolgen kann. In der Literatur finden sich verschiedene Protokolle zur Stimulation humaner PBMC. Einige publizierte Transduktionsprotokolle beschreiben die Verwendung von OKT-3 und IL-2 zur initialen Stimulation peripherer Blutlymphozyten (ROBERTS *et al.*, 1994, BUNNELL *et al.*, 1995; COOPER *et al.*, 1999). In Vorversuchen wurde, mittels ^3H -Thymidineinbau-Assay, die optimale OKT-3-Konzentration in Anwesenheit von IL-2 (100 U ml^{-1}) bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente bestätigten den publizierten Optimalwert von $10 \text{ ng OKT-3 ml}^{-1}$.

In jüngster Zeit wurden vermehrt Kombinationen aus anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt (LEVINE *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 2000; MITSUYASU *et al.*, 2000; DEERKS *et al.*, 2002). Hierfür waren die Antikörper häufig auf der Oberfläche von super-paramagnetischen Kügelchen (z. B. Dynaspheres® MS-4.5-REK, $4.5 \mu\text{m}$ im Durchmesser, Dynal) immobilisiert. Mit dieser Methode können CD4^+ T-Zellen polyklonal stimuliert werden (LEVINE *et al.* 1995, 1997). CD3/CD28-Beads inhibieren zusätzlich die Replikation von HIV (BARKER *et al.*, 1998). OKT-3/IL-2-stimulierte T-Zellpopulationen weisen in der Regel ein deutlich eingeschränktes T-Zellrezeptorrepertoire auf (FERRAND *et al.*, 2000). Das kompromittierte T-Zellrepertoire des HIV-Patienten (GOROCHOV *et al.*, 1998) sollte durch das gentherapeutische Verfahren möglichst nicht weiter eingeschränkt werden. Um die beste Stimulationsmethode für die Anwendung im Rahmen der klinischen Studie zu definieren wurden die Etablierungsarbeit mit dem direkten Vergleich der beiden Stimulationsarten (OKT-3/IL-2 versus CD3/CD28-Beads) begonnen.

4.4.2.1 Durch Stimulation mit CD3/CD28-Beads/IL-2 kann die Zellausbeute gesteigert werden

Zu Beginn der Untersuchungen wurde ein direkter Vergleich der Stimulation von T-Zellen mittels OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2 durchgeführt. Hierfür wurden PBMC gesunder Spender (n = 3) nach CD8-Depletion für vier Tage mit OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2 (3 Beads pro Zelle) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, die Beads entfernt und die OKT-3/IL-2-stimulierten Zellen in Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen in frischem Medium mit IL-2 (100 U ml⁻¹) ausgesät. Die Lebendzellzahl wurde alle zwei bis vier Tage nach Trypanblaufärbung im Lichtmikroskop bestimmt und die Zelldichte auf 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹ eingestellt. Die Zellen waren für insgesamt 11 Tage in Kultur. In Abb. 28 sind die mittleren Wachstumskurven dargestellt.

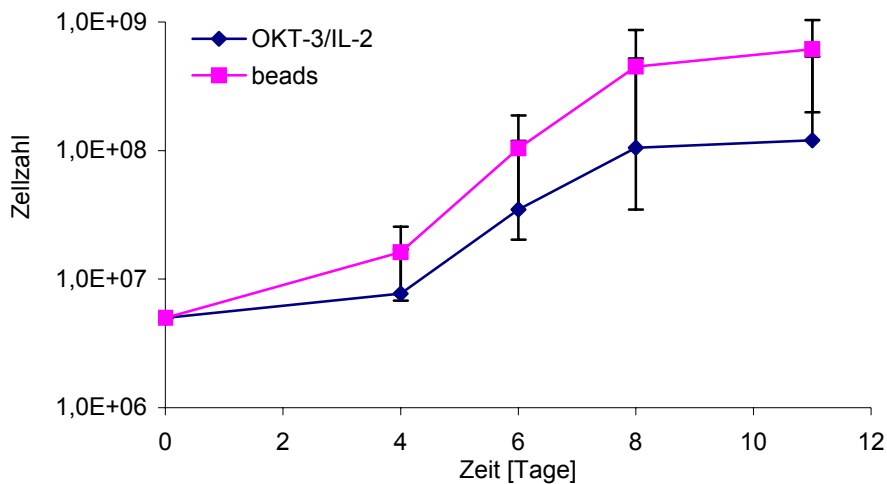


Abb. 28: Vergleichende Darstellung der mittleren Wachstumskurven (n = 3). Nach Stimulation mit Hilfe von CD3/CD28-Beads/IL-2 wuchsen die Zellen mit höherer Wachstumsrate als nach Stimulation mit OKT-3/IL-2. Darüber hinaus wurde nach 11-tägiger Kultur in den CD3/CD28-Beads/IL-2-Ansätzen im Mittel ein 3,4-fach höherer Zellertrag erzielt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die T-Zellen nach CD3/CD28-Bead/IL-2-Stimulation deutlich stärker und schneller expandieren als nach Stimulation mit OKT-3/IL-2. Die in Abb. 28 eingezeichneten Standardabweichungen der Mittelwertkurven spiegeln die hohe Spendervariabilität wieder. Zur genaueren Charakterisierung des Zellwachstums wurden die mittleren Expansionsfaktoren für beide Stimulationsbedingungen ermittelt. Nach CD3/CD28-Bead/IL-2-Stimulation expandierten die Zellen im Mittel um den Faktor 144 ± 69 , während Stimulation mit OKT-3/IL-2 lediglich eine Expansion um den Faktor 33 ± 17 bewirkte.

Die Studienpatienten hatten nur 50 - 200 CD4-Zellen μl^{-1} Blut. Um einen Mindestertrag von $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen zu gewährleisten war es wichtig eine Verfahren zu definieren, dass eine möglichst hohe *ex vivo* Expansionsrate aufweist.

4.4.2.2 CD3/CD28-Bead/IL-2-Stimulation hat keinen Einfluss auf die Expression wichtiger Oberflächenantigene

Neben einer ausreichenden Expansion war der Erhalt der T-Zellfunktion für die Wahl der geeigneten Stimulationsmethode ausschlaggebend. FERRAND *et al.* (2000) konnten zeigen, dass das T-Zell-Rezeptorrepertoire bei Stimulation mittels CD3/CD28-Beads erhalten bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression ausgesuchter Oberflächenmoleküle vergleichend untersucht. Hierfür wurden Zellen mit OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2 stimuliert (Durchführung s. Kap. 4.4.2.1) und die Expression von CD3, CD4, CD25, CD28, CD154, CD62L über den Untersuchungszeitraum bestimmt.

Wie in Abb. 29 dargestellt, akkumulierten die CD4⁺ T-Zellen bis zu einem Anteil von fast 100% in den Kulturen, unabhängig von der Stimulation.

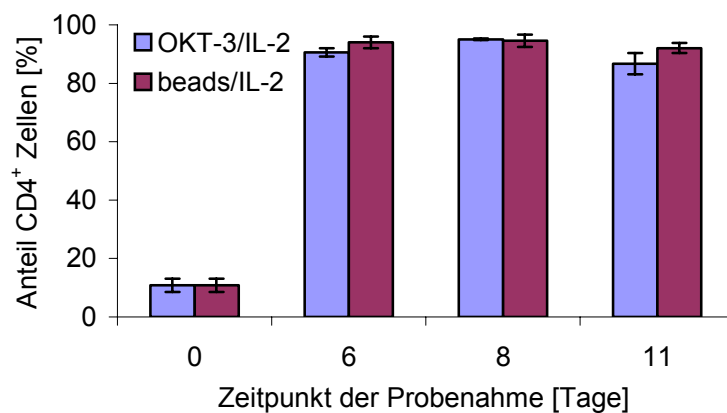


Abb. 29: Vergleichende Darstellung der mittleren Verteilung (n = 3) der CD3⁺/CD4⁺ Zellen im Verlauf der Kultur.

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der T-Zellpopulationen ist in Abb. 30 die Expression der Aktivierungsmarker CD28, CD154 und CD62L am Tag 11 der Kultur wiedergegeben.

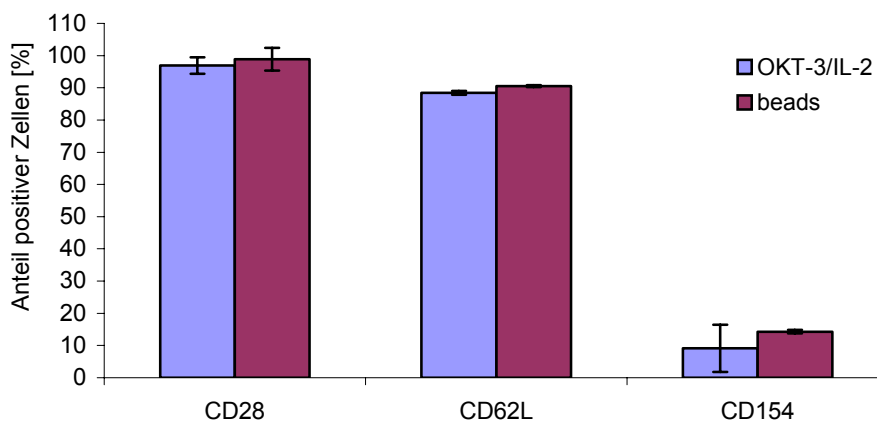


Abb. 30: Vergleichende Darstellung der Aktivierungsmarkerexpression der CD4⁺ Zellen nach elftägiger Kultur. Der Anteil der CD28⁺, CD62L⁺ und CD154⁺ CD4-Zellen zeigte in beiden Stimulationsanreihen keinen signifikanten Unterschied.

CD28 wird von T- und B-Zellen exprimiert und ist an der Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt. Es dient als Rezeptor für co-stimulatorische Signale, die über das CD80- bzw. das CD86-Molekül ausgelöst werden.

CD62L (L-Selectin) wird von T- und B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert und ist eine Adhäsionsmolekül, das die Anlagerung und das Entlangrollen von Leukozyten am Endothel vermittelt und damit für das „homing“ der T-Zellen eine wichtige Rolle spielt.

CD154 wird von aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert und ist als Ligand des CD40-Rezeptors an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt.

Die Expression von CD28, CD154 und CD62L ist nach Stimulation mit CD3/CD28-Bead/IL-2, im Vergleich zur Stimulation mit OKT-3/IL-2 nicht verändert.

4.4.3 Stimulation mit CD3/CD28-Beads/IL-2 erlaubt eine effiziente retrovirale Transduktion

Neben dem Einfluss der beiden Stimulationsbedingungen auf das Zellwachstum und die Expression von Aktivierungsmarkern, wurde deren Einfluss auf die Transduktion mit M87o untersucht. Hierzu wurden CD8-depletierte, periphere Blutlymphozyten mit OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2 stimuliert (Durchführung s. Kap. 4.4.2.1) und mit M87o transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde drei Tage nach der Transduktion mittels Antikörperfärbung im Durchflusszytometer bestimmt. Wie in Abb. 31 dargestellt wurden in beiden Ansätzen vergleichbare Transferraten erzielt.

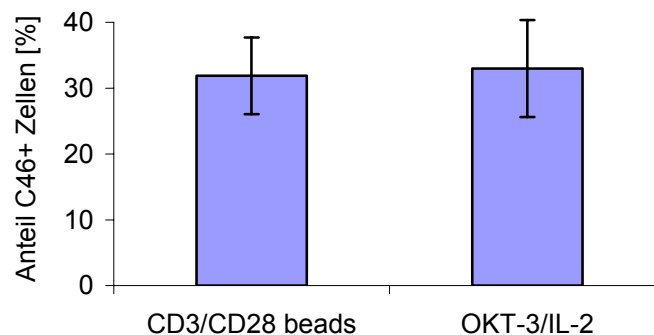


Abb. 31: Gegenüberstellung der mittleren Gentransferraten (n = 2) nach Stimulation mit OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2. Die untersuchten Stimulationsmethoden ergeben vergleichbare Gentransferraten.

4.4.4 CD3/CD28-Beads interferieren mit dem Transduktionsprozess und müssen nach der Stimulation entfernt werden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transduktionsrate durch CD3/CD28-Bead/IL-2-Stimulation nicht reduziert wird, wurde untersucht, ob die Transduktion in Anwesenheit von CD3/CD28-Beads möglich ist.

Hierfür wurden CD8-depletierte, periphere Blutlymphozyten für drei Tage mit CD3/CD28-Beads stimuliert. Anschließend wurden diese in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von CD3/CD28-Beads mit M87o transduziert. Drei Tage nach der Transduktion wurde die Gentransferrate nach Antikörperfärbung im Durchflusszytometer bestimmt. Vor der Färbung wurden die verbliebenen Beads extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 graphisch wiedergegeben.

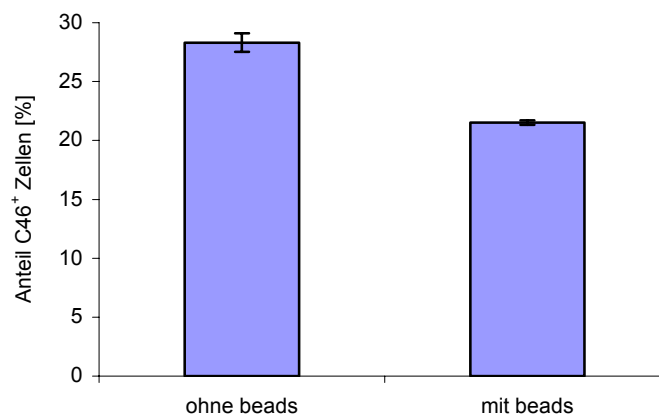


Abb. 32: Vergleichende Darstellung der mittleren Transduktionseffizienz (n = 2) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von CD3/CD28-Beads. Die Beads verringerten die Gentransferrate.

Wie aus Abb. 32 ersichtlich, war die Transduktionseffizienz in Anwesenheit der CD3/CD28-Beads deutlich herabgesetzt. Die Beads begünstigen die Bildung von Zellklumpen, was dazu geführt haben könnte, dass nicht alle Zellen für Vektorpartikel zugänglich waren. Die Bead-Zell-Aggregate sind besonders in der frühen Stimulationsphase fest verbunden und erst unter vehementem Resuspendieren trennbar. Mikroskopische Analysen zeigten, dass die Bead-Zell-Aggregate vier Tage nach Initiation der Stimulation zu zerfallen beginnen und das manuelle Abtrennen der Beads erleichtert ist. Die Expansion der Prästimulation auf vier Tage veränderte die Gentransferrate nicht.

4.4.5 Kultur und Transduktion von T-Zellen HIV-1-positiver Spender

Bei der Kultur der T-Zellen HIV-1-infizierter Spender, die den Einschlusskriterien der klinischen Studie entsprachen, traten folgende zusätzliche Schwierigkeiten auf:

1. Proviren-tragende T-Zellen können durch Stimulation zur Produktion von HIV angeregt werden (GOWDA *et al.*, 1989; KORIN *et al.*, 1998; BARKER *et al.*, 1998). Die Virusvermehrung musste *in vitro* effektiv unterdrückt werden, da hohe Zellverluste durch cytopathische Viruseffekte zu befürchten waren, und grundsätzlich die Gefahr der „*ex vivo*-Resistenzzüchtung“ bestand. Aus ethischer Sicht ist die Transplantation eines hoch virusbelasteten Zellpräparates nicht zu verantworten.
2. Die Zahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut der Spender betrug maximal 200 μl^{-1} .

Zunächst wurde untersucht, wie stark HIV⁺ T-Zellen nach Stimulation HIV replizieren. Hierzu wurden T-Zellen HIV-1-infizierter Spender mit CD3/CD28-Beads/IL-2 stimuliert und für 10 Tage kultiviert. Am Ende der Kultur wurde, als Maß für die Virusreplikation, der p24-Gehalt in zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Wie in Abb. 33 dargestellt, konnte keine Korrelation zwischen Ausgangsviruslast und *in vitro*-Replikation hergestellt werden. So war z. B. in den Zellkulturen der Spender mit der höchsten Viruslast (700.000 bzw. 800.000 RNA-Kopien ml^{-1}) kein p24 nachweisbar. Interessanterweise wurden auch Zellen eines nachgewiesenermaßen HIV-infizierten Spenders untersucht, bei dem im peripheren Blut kein Virus mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Detektionslimit: 25 Kopien ml^{-1}). Dem gegenüber waren die *ex vivo*-Kulturen mit 27.000 pg p24-Antigen ml^{-1} deutlich positiv.

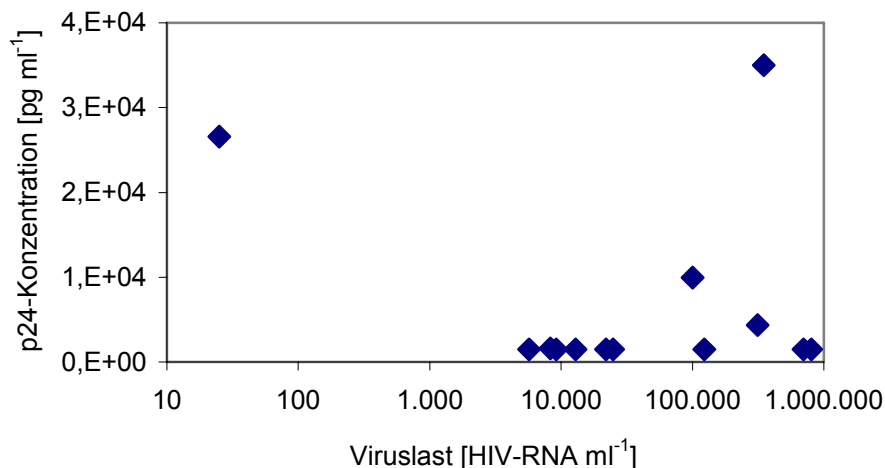


Abb. 33: Das Niveau der *in vitro*-Replikation korrelierte nicht mit der Ausgangsviruslast. Acht von insgesamt dreizehn Kulturen, darunter auch die Proben der beiden Spender mit der höchsten Viruslast (700.000 bzw. 800.000 RNA-Kopien ml^{-1}), zeigten unter den verwendeten Kulturbedingungen keine nachweisbare Virusreplikation (Detektionslimit der durchgeführten Bestimmung 1.500 pg ml^{-1}), während die Kulturen eines Patienten mit einer Viruslast von >25 Kopien ml^{-1} mit 27.000 pg ml^{-1} deutlich positiv waren.

Die beobachtete Hemmung der Virusreplikation ist möglicherweise durch die antivirale Wirkung der CD3/CD28-Bead-Stimulation erklärbar, so konnten BARKER *et al.* (1998) zeigen, dass die HIV-1-Ausbreitung in infizierten T-Zellkulturen in Anwesenheit von CD3/CD28-Beads stark gehemmt war.

Die Inhibition konnte aber nicht in allen Kulturen beobachtet werden. Für die Herstellung der klinischen Zellpräparate musste eine zuverlässige Strategie entwickelt werden, die *in vitro* die effektive Hemmung der Virusreplikation garantiert.

4.4.5.1 Antiretrovirale Medikamente wurden für die Verwendung bei der Herstellung der Zellpräparate getestet

Für den Einsatz in der *ex vivo*-Kultur wurde eine Reihe zugelassener antiretroviraler Medikamente untersucht. Diese sind für die Anwendung im Menschen hinreichend pharmakologisch und toxikologisch charakterisiert und werden gemäß Arzneimittel-Gesetz hergestellt.

Für die Auswahl der getesteten Substanzen war die Verfügbarkeit einer geeigneten Formulierung entscheidend. Es wurden wässrige, oder im Falle von Nelfinavir, ethanolische Lösungen untersucht. Als Maß für die Toxizität wurde die Zellproliferation im ³H-Thymidin-Einbauassay bestimmt. Hierfür wurden frisch isolierte PBMC mit CD3/CD28-Beads/IL-2 stimuliert und mit Verdünnungsreihen der Testsubstanzen inkubiert. Zur Charakterisierung der Toxizität wurde die IC₅₀, jene Konzentration, bei der die Proliferation nur noch 50% des Normalwertes erreicht, bestimmt (s. Tab. 5).

Tab. 5: Zusammenstellung der ermittelten IC₅₀-Werte der getesteten antiretroviralen Medikamente.

Substanzklasse	Testsubstanz	IC ₅₀
Proteaseinhibitor	Amprenavir	6 µM
	Nelfinavir	46 µM
Nucleosidische RTI	Stavudin	70 µM
	Didanosine	8 µM
Fusionsinhibitor	T-20	10 mg ml ⁻¹

4.4.5.2 Antiretrovirale Therapeutika können mit den Prozessen des retroviralen Gentransfers interferieren

Nachdem die IC50-Werte der ausgewählten antiretroviralen Therapeutika bestimmt waren, wurde untersucht, ob die Medikamente den Gentransfer beeinflussen. Die Prozesse der retroviralen Transduktion sind denen der HIV-Infektion ähnlich und antiretrovirale Medikamente können mit den MLV-Homologen ihrer Zielproteine wechselwirken und den Gentransfer stören.

Daher wurde der retrovirale Gentransfer in Anwesenheit der ausgewählten Substanzen genauer untersucht. Hierzu wurden PBMC gesunder Spender in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen antiviraler Testpräparate für drei Tage mit CD3/CD28-Beads/IL-2 stimuliert und mit M87o transduziert. Nach weiteren drei Tagen wurden die C46⁺ Zellen, nach 2F5-Färbung, im Durchflusszytometer detektiert. Aus den Ergebnissen wurden die in Tab. 6 zusammengestellten IC0-Werte, also die maximale Konzentration, die noch keinen Einfluss auf die Transduktion hat, bestimmt.

Tab. 6: Zusammenstellung der ermittelten IC0-Werte der untersuchten antiviralen Medikamente. In den angegebenen Konzentrationen tritt keine Hemmung der Transduktion mit M87o auf.

Substanzklasse	Testsubstanz	IC0 Transduktion
Proteaseinhibitor	Amprenavir	0,3 µM
	Nelfinavir	8,0 µM
Nucleosidische RTI	Stavudin	0,4 µM
Fusionsinhibitor	T-20	25,0 µg ml ⁻¹

4.4.5.3 Die Replikation multiresistenter HIV wird durch Amprenavir, Nelfinavir und T-20 zuverlässig unterdrückt

In einer Reihe von Vorversuchen wurde eine Kombination aus Amprenavir (0,3 μM), Nelfinavir (1 μM) und T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) entwickelt, die die Replikation multiresistenter HIV *in vitro* zuverlässig inhibiert. Zur Testung der Hemmeffizienz des ausgewählten Cocktails wurden CD8-depletierte PBMC eines HIV-1-infizierten Spenders mit CD3/CD28-Beads stimuliert. Nach vier Tagen wurden die Beads entfernt und die Zellen in frischem Medium ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit dem multiresistenten HIV-1_{HV57} überinfiziert. Am Tag darauf wurden die Zellen gewaschen und in Medium mit bzw. ohne antivirale Medikamente ausgesät. Ab dem zweiten Tag nach Infektion wurde täglich zellfreier Kulturüberstand geerntet und der p24-Gehalt bestimmt. Die Zellen wurden zweimal in Medium gewaschen und erneut ausgesät. Auf diese Weise wurde die p24-Menge bestimmt, die jeweils über 24 h produziert wurde. In Abb. 34 sind die Ergebnisse wiedergegeben.

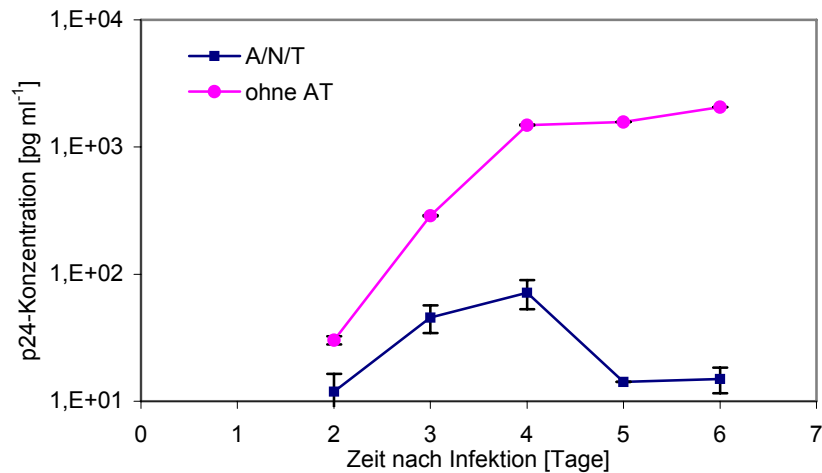


Abb. 34: Vergleichende Darstellung der HIV-1-Replikation (gemessen als p24-Gehalt in Zellkulturüberständen, n = 3) mit und ohne antiviralen Medikamentencocktail. CD8-depletierte PBMC eines HIV-1-infizierten Spenders wurden mit HIV-1_{HV57} überinfiziert und mit bzw. ohne Medikamentencocktail kultiviert. (A = Amprenavir 0,3 μM , N = Nelfinavir 1,0 μM , T = T-20 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

Wie aus Abb. 34 ersichtlich, konnte mit dem Cocktail aus Amprenavir (0,3 μM), Nelfinavir (1,0 μM) und T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) die Replikation von HIV-1_{HV57} sehr effektiv inhibiert werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde dieser Cocktail beibehalten.

4.4.6 Das optimierte Transduktionsprotokoll für die klinische Anwendung

Aus den Ergebnissen der beschriebenen Experimente wurde ein optimiertes Transduktionsprotokoll abgeleitet. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte zusammenfassend dargestellt:

1. Aufreinigung der Zielzellen:

- Depletion der CD8⁺ Zellfraktion mittels MACS CD8 MicroBeads
- Anreicherung der Zielzellen durch Inkubation mit CD3/CD28-Beads (3 Beads pro CD3⁺ Zelle, 30 min) und Extraktion der gebundenen Zellen

2. Prästimulation:

- Stimulation der Zellen mit CD3/CD28-Beads und IL-2 (100 U ml⁻¹) in Gegenwart von Nelfinavir (1 µM) und Amprenavir (0,33 µM) für vier Tage
- Erneute Zugabe der antiretroviralen Therapeutika (AT: Amprenavir 0,33 µM, Nelfinavir 1 µM, T-20 10 µg ml⁻¹) am dritten Tag

3. Transduktion:

- Magnetische Extraktion der CD3/CD28-Beads
- Zweimaliges Vorbeladen der Zellkulturgefäße mit Vektorüberstand
- Aussaat der Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen ml⁻¹) in einem mit Vektorpartikeln vorbeladenen Kulturgefäß in Medium mit AT und IL-2 (100 U ml⁻¹), Inkubation bei 37 °C
- Wiederholung der Transduktion am folgenden Tag

4. Expansion:

- Expansion der Zellen (Zelldichte 0,5 – 1,0 · 10⁶ Zellen ml⁻¹) in Medium mit AT und IL-2 (200 U ml⁻¹) bis zum Erreichen der Zielzellzahl

Das hier dargestellte Transduktionsprotokoll wurde anschließend im Versuchsmaßstab getestet. Hierfür wurden Blutproben von HIV-1-Patienten, die den Studienkriterien entsprachen, verwendet.

4.4.7 Testung des Protokolls im Versuchsmaßstab

Für die Testung im Versuchsmaßstab (small scale) wurden Zellen von drei HIV-1⁺ Spendern, die den Einschlusskriterien der klinischen Studie entsprachen, eingesetzt. Die peripheren mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut isoliert und die CD8⁺ Zellen mittels MACS CD8 MicroBeads depletiert. Die CD8-depletierte Zellpopulation wurde anschließend für 30 min mit CD3/CD28-Beads (Dynal, 3 Beads pro CD3⁺ Zelle) inkubiert und die gebundenen Zellen mit Hilfe eines Handmagneten extrahiert. Die angereicherten CD3⁺ Zellen wurden in frischem Medium mit IL-2 (100 U ml⁻¹), Nelfinavir (1µM) und Amprenavir (0,33 µM) in einer Zelldichte von 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹ bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle für die Wirksamkeit des antiviralen Cocktails wurden Parallelkulturen ohne AT angelegt. Nach dreitägiger Inkubation wurden Amprenavir (0,33 µM), Nelfinavir (1 µM) und T-20 (10 µg ml⁻¹) zugegeben. Am folgenden Tag wurden die CD3/CD28-Beads von den Zellen abgelöst und aus der Kultur entfernt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt und die Zellen mit M87o transduziert. Für die Transduktion wurden pro Ansatz 5 · 10⁵ Zellen auf einer zweifach mit Vektorüberstand vorbeladenen 24-Lochplatte ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde als Transduktionskontrolle in Medium mit AT parallelkultiviert. Die Lebendzellzahl wurde täglich bestimmt und ab einer Zelldichte von 1 · 10⁶ Zellen ml⁻¹ wurde die Zellsuspension, nach dem in Tab. 8 wiedergegebenen Schema, auf eine Zelldichte von 5 - 10 · 10⁵ Zellen ml⁻¹ eingestellt. Pro Ansatz wurden auf diese Weise ca. 2 · 10⁶ Zellen in Kultur gehalten. Die Kultur wurde am Tag 10 beendet. In Abb. 35 sind die Wachstumsverläufe, bestimmt aus den akkumulierten Zellzahlen dargestellt.

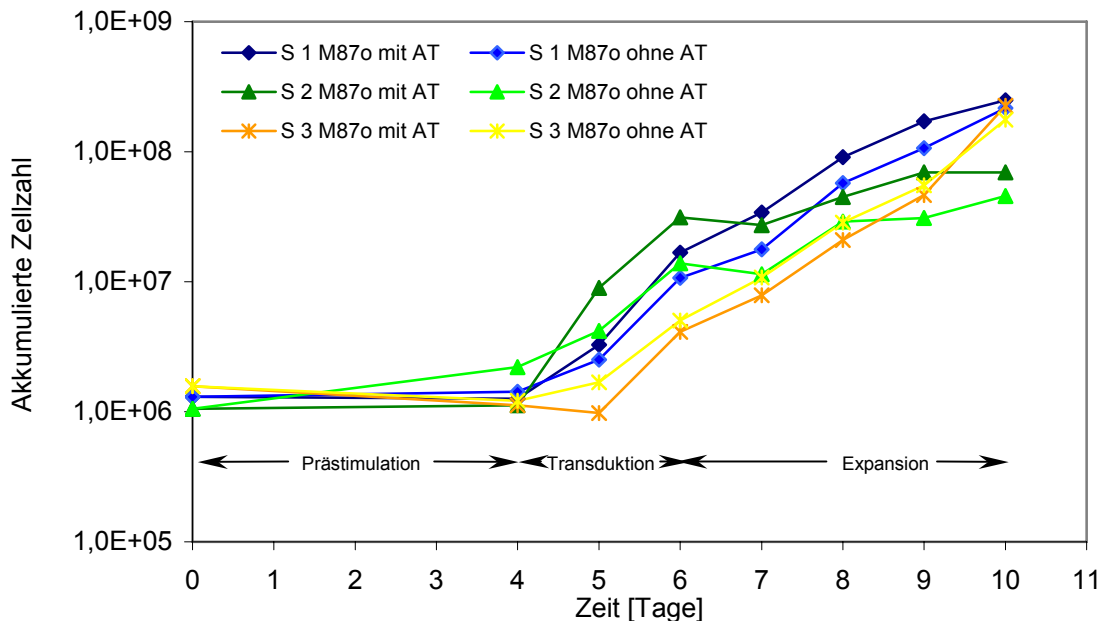


Abb. 35: Umsetzung des vorgeschlagenen Protokolls im Versuchsmaßstab. Wachstumsverlauf von T-Zellen HIV-1-positiver Spender. Die verwendeten antiretroviralen Therapeutika (AT) hatten keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen. (S 1 - S 3 = Spender 1 - 3)

Wie in Abb. 36 wiedergegeben expandierten die Zellen im Mittel ($n = 3$) nach Transduktion mit AT 153-fach (± 35 -fach), ohne AT 135-fach (± 28 -fach) und untransduziert mit AT 132-fach (± 61 -fach). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen festgestellt.

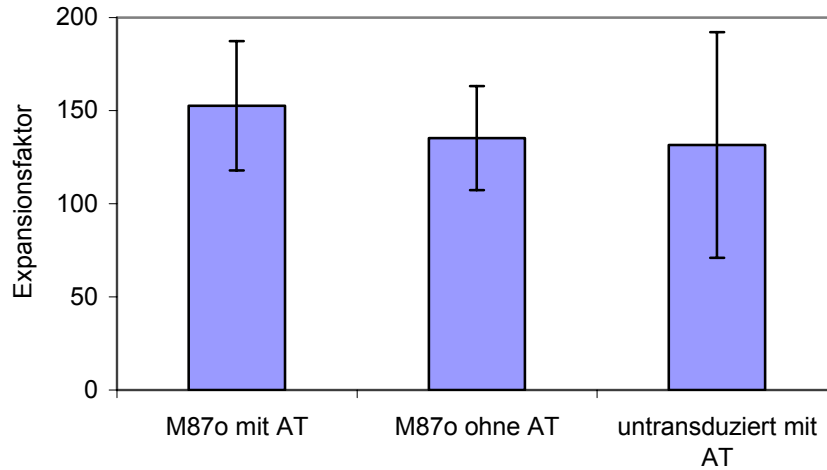


Abb. 36: Gegenüberstellung der mittleren Expansionsfaktoren ($n = 3$). Die Vermehrungsfaktoren zeigen keine signifikante Abhängigkeit von den Kulturbedingungen auf.

Die Zellpopulationen wurden am Ende der Expansionsphase weiter charakterisiert. Hierfür wurden die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellpopulationen mittels Antikörperfärbung markiert und im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die mittlere prozentuale Verteilung der T-Zellpopulationen ist in Abb. 37 grafisch dargestellt.

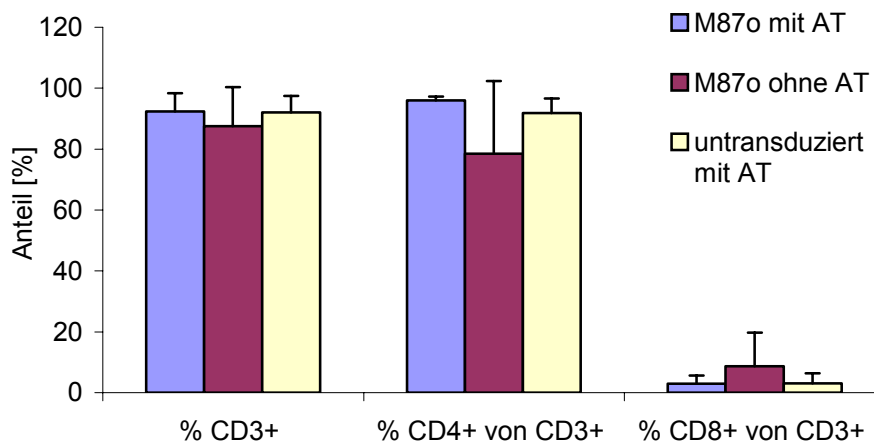


Abb. 37: Vergleichende Darstellung der Zusammensetzung der Zellpopulationen (Mittelwerte, $n = 3$) am Erntetag (Tag 10). Die Erntepopulationen waren fast ausschließlich $CD3^+/CD4^+$ -Zellen. In Anwesenheit der antiretroviralen Therapeutika waren die $CD4^+$ T-Zellen effektiv geschützt.

Wie erwartet, hatte die Transduktion keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der T-Zellpopulation. In beiden Fällen (mit und ohne Transduktion) bestand die Zellpopulation am Erntetag im Mittel zu 92% aus T-Zellen ($CD3^+$), davon hatten über 90% (M87o-Ansatz $96\% \pm 1,3\%$, untransduziert $92\% \pm 4,8\%$) den Phänotyp $CD3^+/CD4^+$. Die Kulturen ohne antiretrovirale Medikamente hatten am Erntetag im Mittel einen geringeren $CD4$ -Anteil. Diese Beobachtung war bei einem Patienten

besonders ausgeprägt. Hier betrug der CD3⁺/CD4⁺-Anteil in der Kultur mit AT 95,1%, während der Anteil in der Parallelkultur ohne AT auf 61,5% gesunken war. Die Zellen dieses Patienten zeigten ohne AT die höchste Virusreplikation (Tab. 7), in den Kulturen mit AT wurde die Virusreplikation dagegen vollständig gehemmt.

Um die Höhe der *in vitro*-Replikation genauer zu quantifizieren, wurden am Erntetag (Tag 10) zellfreie Kulturüberstände gesammelt und der Gehalt an p24-Antigen mittels ELISA bestimmt. Wie Tab. 7 zeigt, konnte die HIV-1-Replikation sehr effektiv unterdrückt werden. Die Zellen von Spender S 1 zeigten allerdings auch in Abwesenheit von AT keine nachweisbare HIV-1-Replikation.

Tab. 7: Aufstellung der p24-Konzentrationen, wie sie mittels ELISA in zellfreien Kulturüberständen am Erntetag bestimmt wurden. Die eingesetzten AT inhibierten die Virusreplikation vollständig. In den Kulturen von S 1 konnte keine HIV-1-Replikation nachgewiesen werden.

Spender-ID	p24-Konzentration [pg ml ⁻¹]		
	M87o mit AT	M87o ohne AT	Untransduziert mit AT
S 1	< 8,7	< 8,7	< 8,7
S 2	< 8,7	> 21.466	< 8,7
S 3	< 8,7	> 27.900	< 8,7

Möglicherweise wurde die HIV-1-Replikation in den Kulturen von S 1 durch die Bead-Stimulation gehemmt.

Neben einer ausreichenden Expansion der Zellen und einer effektiven Hemmung der Virusreplikation sollte das etablierte Protokoll den effektiven Gentransfer garantieren. Zur Überprüfung der Gentransferrate wurde der Anteil M87o⁺ Zellen mittels qPCR bestimmt. In Anwesenheit von T-20 ist die 2F5-Färbung kein zuverlässiges Verfahren zum Nachweis von M87o⁺ Zellen. T-20 beinhaltet das Epitop (ELDKWA, GORNY und ZOLLAR-PAZNER, 2000) an das 2F5 bindet. T-20 reichert sich wahrscheinlich in der Zellmembran an (PEISAJOVICH *et al.*, 2003). Hier wird es vom 2F5-Antikörper erkannt und erzeugt so ein hohes, M87o-unabhängiges Hintergrundsignal. Die Ergebnisse der Bestimmung mittels qPCR sind in Abb. 38 grafisch dargestellt.

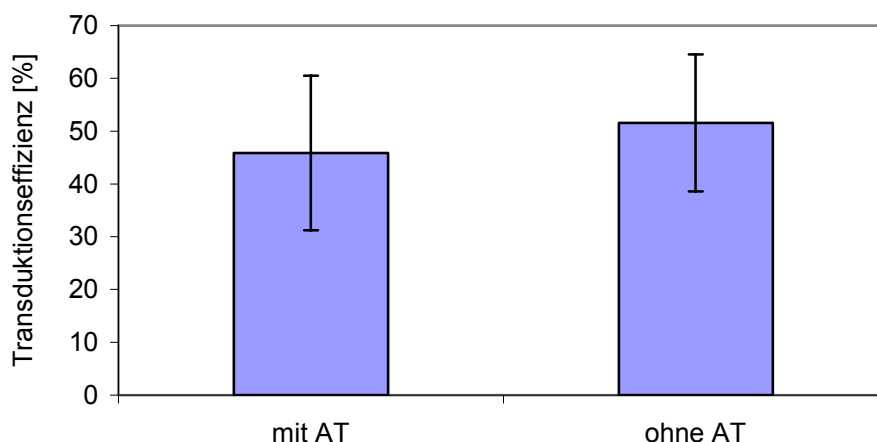


Abb. 38: Zusammenstellung der mittleren Transduktionsraten. Die Bestimmung der Gentransferraten erfolgte mittels qPCR. Im Mittel wurde mit AT eine Transduktionsrate von 46% ± 15% und ohne AT von 52% ± 13% erzielt. (n = 3)

Die mittleren Gentransferraten der Ansätze mit bzw. ohne AT zeigten keinen signifikanten Unterschied. In beiden Fällen wurde eine hohe Gentransferrate erzielt. Die Proben der untransduzierten Kontrollansätze waren ausnahmslos negativ.

In den dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit dem etablierten Protokoll eine effektive Vermehrung der Zielzellen bei gleichzeitig vollständiger Unterdrückung der HIV-1-Replikation möglich ist. Zusammen mit der hohen Transduktionsrate erfüllte das Protokoll daher die Voraussetzungen zur Umsetzung im klinisch relevanten Produktionsmaßstab.

4.4.8 Umsetzung des Protokolls im klinisch relevanten Maßstab (large scale)

Zur Gewinnung der Primärzellen wurden die peripheren Blutlymphozyten mittels Aphereseapparatur aus dem venösen Blut der Spender abgesammelt und aufkonzentriert. Dieses Leukapheresat wurde über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am folgenden Tag die Depletion der CD8⁺ Zellen durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Thrombozyten mit Hilfe des CytoMate aus dem Apheresat ausgewaschen und die Restzellen mit MACS CD8 MicroBeads inkubiert. Die Depletion der markierten CD8⁺ Zellen erfolgte automatisiert mit Hilfe des CliniMACS. Nach der CD8-Depletion wurden die CD3⁺ Zellen angereichert. Hierfür wurden CD3/CD28-Beads mit den Zellen für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Aggregate aus Zellen und Beads mit Hilfe des MaxSep-Magnetzellseparators extrahiert, in Medium mit IL-2 (100 U ml⁻¹), Nelfinavir (1 µM) und Amprenavir (0,3 µM) überführt und in Kultur genommen. Am Tag drei wurde dem Medium erneut Nelfinavir (1 µM), Amprenavir (0,3 µM) und T-20 (10 µg ml⁻¹) zugesetzt. Am Tag vier erfolgte die Transduktion. Hierzu wurden die Zellen resuspendiert und die Beads, mit Hilfe des MaxSep, aus der Zellsuspension entfernt. T-75-Zellkulturflaschen wurden zweimal mit Vektorüberstand beladen und nach Entfernen des Vektorüberstandes mit Zellsuspension (1,25 · 10⁷ Zellen, 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹) beschickt. Insgesamt wurden in die Transduktion maximal 2,5 · 10⁸ Zellen eingesetzt. Am folgenden Tag wurde die Transduktion wiederholt. Während der anschließenden Expansionsphase wurde die IL-2 Konzentration auf 200 U ml⁻¹ erhöht. Die Lebendzellzahl wurde täglich mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und die Zellen bei Überschreitung einer Zelldichte von 1 · 10⁶ Zellen ml⁻¹ gemäß dem in Tab. 8 dargestellten Schema gesplittet.

Tab. 8: Aufstellung der Splittfaktoren in Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte.

Ausgangszelldichte	Splittfaktor	resultierende Zelldichte
< 1,0 · 10 ⁶ ml ⁻¹	nicht splitten	< 1,0 · 10 ⁶ ml ⁻¹
1,0 · 10 ⁶ ml ⁻¹ bis < 1,5 · 10 ⁶ ml ⁻¹	2	5 – 7,5 · 10 ⁵ Zellen ml ⁻¹
1,5 · 10 ⁶ ml ⁻¹ bis < 2,0 · 10 ⁶ ml ⁻¹	3	5 – 6,7 · 10 ⁵ Zellen ml ⁻¹
2,0 · 10 ⁶ ml ⁻¹ bis < 2,5 · 10 ⁶ ml ⁻¹	4	5 – 6,3 · 10 ⁵ Zellen ml ⁻¹
usw.		

An den Tagen, an denen die Zellen gesplittet wurden, wurden Amprenavir (0,3 μM), Nelfinavir (1 μM), und T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) erneut zugegeben. An den Tagen, an denen dies nicht nötig war, erfolgte lediglich die Zugabe von T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Die Zellen wurden für insgesamt 10 Tage kultiviert.

Am Erntetag wurden die Zellen zunächst gründlich resuspendiert und die eventuell verbliebenen CD3/CD28-Beads mit dem MaxSep aus der Zellsuspension entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit dem CytoMate konzentriert und gewaschen. Die geernteten Zellen wurden schließlich zentrifugiert (500 g, 5 min) und kryokonserviert (-80°C).

4.4.8.1 Charakterisierung des Primärmaterials

Da das Spendermaterial nicht direkt nach der Apherese verwendet werden konnte wurde es über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und erst am Folgetag aufgearbeitet. Um zu untersuchen, ob das Ausgangsmaterial bei der Lagerung Schaden nimmt, wurden die Spenderapheresate am Tag der Entnahme und am Tag der Aufarbeitung phänotypisch charakterisiert (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten). Wie aus Abb. 39 ersichtlich, hatte die Lagerung bei Raumtemperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellpopulation.

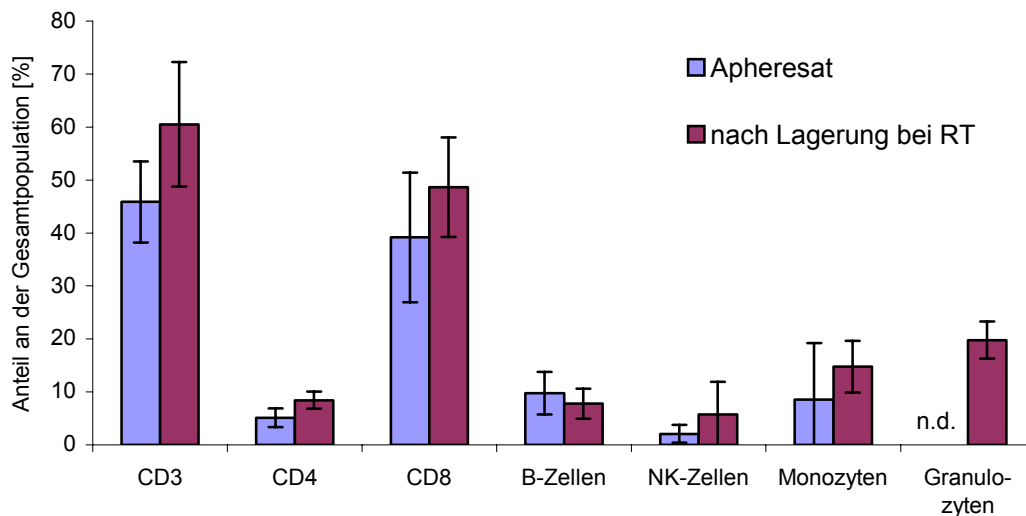


Abb. 39: Phänotypische Charakterisierung des Spenderapheresates (Mittelwerte, n = 3). Unter den CD3⁺ Zellen dominieren erwartungsgemäß die CD8⁺ Zellen. Die Lagerung des Ausgangsmaterials bei Raumtemperatur beeinflusste die Verteilung der Zelltypen nicht signifikant. (n. d. = nicht detektiert)

Der Anteil der CD3⁺/CD4⁺ Zellen war nach der Lagerung nicht verringert, weshalb angenommen werden kann, dass dieses Vorgehen die Transplantatherstellung nicht negativ beeinflusst hat.

4.4.8.2 Die Zielzellzahl wurde im large scale-Prozess deutlich überschritten

Das Zellwachstum wurde während des gesamten Experiments täglich bestimmt. Die Wachstumsverläufe von drei unabhängigen large scale-Ansätzen sind in Abb. 40 wiedergegeben.

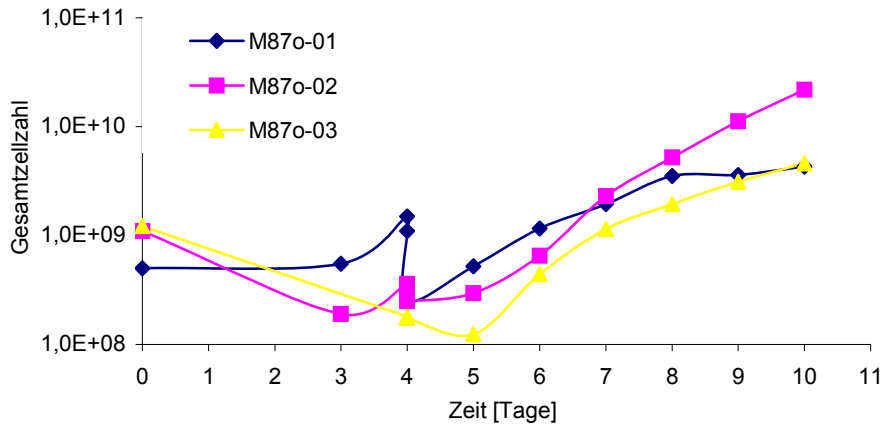


Abb. 40: Wachstumsverläufe im large scale-Experiment (n = 3). Während der Transduktion konnten maximal $2,5 \cdot 10^8$ Zellen prozessiert werden. Ausgehend von dieser Zellzahl wurden die Zellen expandiert.

Wie bereits in den small scale-Experimenten beobachtet, war das Expansionsvermögen der Zellen spenderabhängigen Schwankungen unterworfen. Während die Zellen von Spender M87o-02 eine Gesamtzellzahl von $2,2 \cdot 10^{10}$ erreichten ($2,5 \cdot 10^8$ Zellen bei der Transduktion), konnten von M87o-03 nur $4,6 \cdot 10^9$ ($1,75 \cdot 10^8$ Zellen bei der Transduktion) und von M87o-01 nur $4,3 \cdot 10^9$ ($2,5 \cdot 10^8$ Zellen bei der Transduktion) geerntet werden.

Ziel des etablierten Protokolls war es mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o-transduzierte CD4⁺ T-Zellen zu generieren. Neben der Gesamtzellzahl wurde daher die Transduktionsrate sowie die phänotypische Verteilung der Zellen in den Erntepopulationen bestimmt. Die Gentransferrate betrug gemäß qPCR, zwischen 20% und 37%. Sie lag damit etwas niedriger als in den small scale-Experimenten.

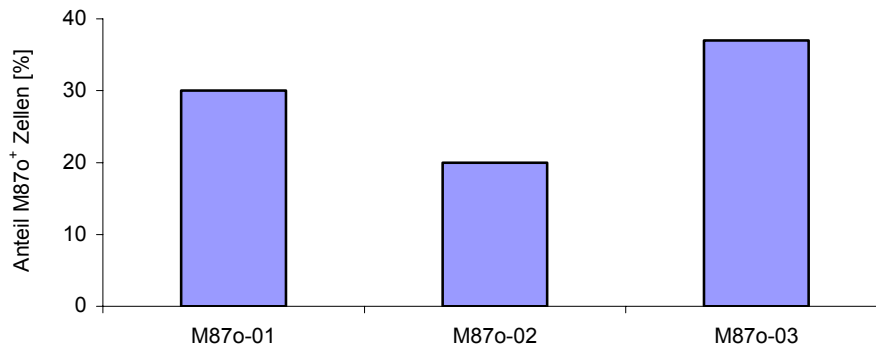


Abb. 41: Vergleichende Darstellung der Gentransferraten der drei untersuchten large scale-Experimente. Wiedergegeben sind die Ergebnisse der Bestimmungen mittels qPCR.

Proben der Erntezellpopulation wurden zum Nachweis der verschiedenen Blutzellpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten) mittels Antikörperfärbung markiert und im Durchflusszytometer detektiert.

In Abb. 42 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Um die populationsdynamischen Veränderungen, die im Laufe der *ex vivo*-Kultur auftraten zu verdeutlichen, sind die Ergebnisse der Bestimmungen von Start- und Erntepopulation einander gegenübergestellt.

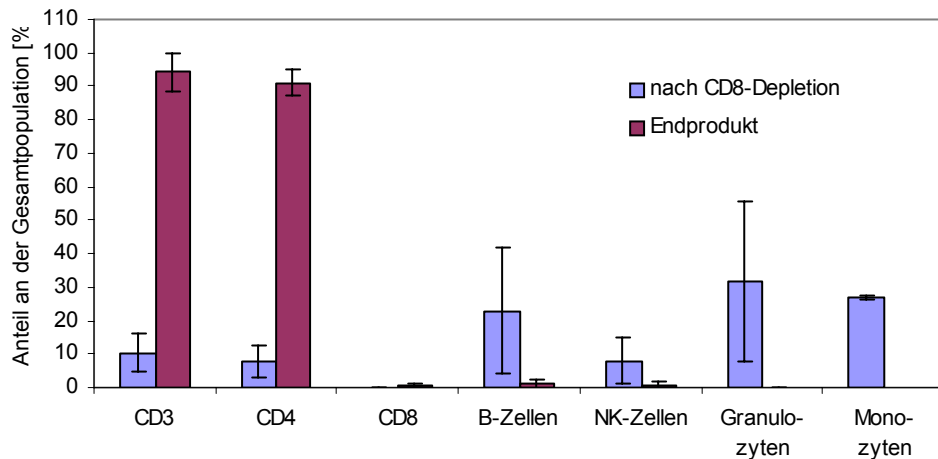


Abb. 42: Vergleichende Darstellung der phänotypischen Zusammensetzung der Zellpopulationen zu Beginn des Prozesses und im Endprodukt (Mittelwerte, n = 3). Das etablierte Protokoll ermöglicht die gezielte Expansion von CD3⁺/CD4⁺ Zellen. Die übrigen Zelltypen verschwanden fast vollständig aus den Kulturen.

Wie aus Abb. 42 ersichtlich, wurden mit Hilfe des etablierten large scale-Protokolls selektiv CD3⁺/CD4⁺ Zellen expandiert. Von den übrigen Zellpopulationen, die im Ausgangsmaterial enthalten waren, waren im Endprodukt nur noch sehr geringe Anteile an B- und NK-Zellen nachweisbar. Für die klinische Anwendung war eine weitere Aufarbeitung der Erntepopulation nicht notwendig.

Aus den beschriebenen Ergebnissen lässt sich die Menge an Zellen mit dem Zielphänotyp CD3⁺/CD4⁺/M87o⁺ bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellzahlbestimmung, der Gentransferraten, der CD3/CD4-Bestimmungen und der Anzahl an Zielzellen, die generiert werden konnten.

Spender	Endzellzahl	Transduktionsrate	Anteil CD3 ⁺ /CD4 ⁺	Anzahl CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /M87o ⁺
M87o-01	4,3 · 10 ⁹	30%	88,2%	1,14 · 10 ⁹
M87o-02	22,0 · 10 ⁹	20%	95,5%	4,20 · 10 ⁹
M87o-03	4,6 · 10 ⁹	37%	89,7%	1,53 · 10 ⁹

Die für die klinische Studie geforderte Zahl von 5 · 10⁸ CD3⁺/CD4⁺/M87o⁺ Zellen konnte in allen Experimenten deutlich überschritten werden, womit das Ziel der Etablierungsarbeit voll erreicht war. Im keinem der Präparate konnte mittels p24-ELISA HIV-Replikation nachgewiesen werden.

Im Rahmen der klinischen Studie der Phase I/II zur Toxizität und Wirksamkeit des gentherapeutischen Verfahrens wurden 10 Studientransplantate gemäß dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll hergestellt. Alle Transplantate wurden am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg transfundiert und von den Patienten sehr gut vertragen. Die Patienten werden derzeit nachbeobachtet.

5 Diskussion

In den westlichen Industrieländern konnte die individuelle Progression der HIV-Infektion durch die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie drastisch verlangsamt werden (D'SOUZA *et al.*, 2000; RICHMAN, 2001). Zumindest in den USA scheint allerdings der maximale therapeutische Nutzen bereits erreicht und die Inzidenz von Infektionen mit multiresistenten HIV-Stämmen steigt langsam aber stetig an (YANG, 2004). Gentherapeutische Verfahren bieten viel versprechende Therapiealternativen, indem sie die CD4⁺ Zielzellen durch die Expression antiviraler Gene effektiv vor der Infektion durch HIV schützen bzw. die Virusreplikation effektiv unterdrücken („intrazelluläre Immunisierung“). So könnte das Immunsystem vor dem Zusammenbruch bewahrt werden.

Der retrovirale Vektor M87o (Abb. 43, EGELHOFER *et al.*, 2004a, EGELHOFER, 2004b) wurde für die gentherapeutische Anwendung am Menschen entwickelt (siehe auch Kap. 2.6.2, s. 18). M87o exprimiert ein neuartiges antivirales Gen, das die Fusion von Virus- und Zellmembran und damit den Eintritt des Virus in die Zielzelle (Klasse I Mechanismus; VON LAER und BRANDENBURG 2001, siehe auch Kap. 2.6.1, s. 16) inhibiert.



Abb. 43: Der retrovirale Vektor M87o exprimiert ein antivirales Gen der Klasse I und verhindert damit die Integration des Provirus ins Zellgenom. Es besteht aus dem Signalpeptid von LNGFR (S), dem inhibitorischen C46-Peptid (C-46), der Gelenkregion des humanen IgG2- (huHIgG2) und der Transmembrandomäne des humanen tCD34 (tCD34-MSD). 3' zum Transgen befindet sich ein post-transcriptional responsive element des Woodchuck-Hepatitis B-Virus (wPRE). Als zweites inhibitorisches Prinzip ist eine RRE-decoy-Sequenz (RRE) vor der 3'-LTR inseriert. (Abbildung nicht maßstabsgetreu)

Die inhibitorische Domäne des Transgens, das C46-Peptid, leitet sich von der HR2-Region von gp41 ab. Es schließt dabei die Aminosäuresequenz des zur HIV-Therapie zugelassenen, peptidischen Fusionsinhibitors T-20 (36 Aminosäuren, M = 4.492 g mol⁻¹; WILD *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2003) ein. Im Gegensatz zu T-20 enthält die C46-Domäne darüber hinaus eine Sequenz, von der CHAN *et al.* (1998) zeigen konnten, dass diese mit einem konservierten Bereich im gp41 interagiert. Die Daten von Ji *et al.* (1999) bestätigen, dass diese Struktur einen besonders wirkungsvollen Angriffspunkt für Fusionsinhibitoren darstellt. Durch die zusätzliche Interaktion mit dieser Zielstruktur kann das Risiko der Resistenzbildung im Vergleich zum T-20 deutlich verringert werden. Darüber hinaus konnte, im Gegensatz zu den für T-20 publizierten Daten (DERDEYN *et al.*, 2000, 2001; Reeves *et al.*, 2002), zwischen CCR5-tropen und CXCR4-tropen HIV-Stämmen kein Unterschied in der Suszeptibilität gegenüber M87o nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde in vorklinischen Untersuchungen die Eignung von M87o für die Anwendung am Menschen erfolgreich gezeigt und die Grundlage für die Durchführung einer klinischen Prüfung (Phase I/II) gelegt. T-Zellen, die durch Transduktion mit M87o genetisch modifiziert wurden, sind effektiv vor der Infektion durch T-20-resistente HIV-Isolate geschützt und reichern sich unter dem Selektionsdruck der Virusreplikation *in vitro* an. Die retrovirale Transduktion mit M87o erhöht weder das Transformationsrisiko in Rat-1-Zellen noch wirkt sie phänotoxisch auf primäre T-Zellen. Für die Durchführung einer vorklinischen Prüfung zur Toxizität und Immunogenität im Rhesusaffenmodell wurde ein Gentransferprotokoll für periphere Affenlymphozyten entwickelt. Zwei Studientransplantate wurden gemäß diesem Protokoll hergestellt und den Rezipiententieren transplantiert. Die Studie erbrachte weder Hinweise auf Toxizität noch Immunogenität der M87o-Gentherapie. Für eine klinische Studie zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II) an HIV-infizierten Probanden wurde ein Protokoll zur Produktion M87o-modifizierter autologer T-Zellen HIV-infizierter Spender mit multiplem Therapieversagen im Labormaßstab entwickelt und erfolgreich in den klinisch relevanten Produktionsmaßstab übersetzt. 10 Studientransplantate, die gemäß dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll hergestellt wurden, wurden am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg transfundiert und von den Patienten sehr gut vertragen.

5.1 Präklinische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*

Im Falle der hier vorgestellten M87o-Gentherapie stellen retroviral transduzierte, autologe T-Zellen ein individuell hergestelltes Arzneimittel dar. Bevor ein neues Arzneimittel oder eine Therapie am Menschen angewandt werden darf, müssen Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in vorklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden.

5.1.1 Präklinische *in vitro*-Untersuchungen zur Wirksamkeit

Der Wirkmechanismus eines antiviralen Gens ist für den zu erwartenden therapeutischen Erfolg bei der Behandlung der HIV-Infektion von entscheidender Bedeutung (VON LAER und BRANDENBURG, 2001). M87o stellt in der Reihe der zum Teil bereits klinisch untersuchten antiviralen Gene eine Ausnahme dar. Es verhindert die Infektion der Zielzelle bereits extrazellulär durch Inhibition der gp41-vermittelten Fusion von Virus- und Zellmembran (EGELHOFER *et al.*, 2004). Damit werden die Zellen sehr früh und besonders effizient vor der Infektion geschützt. Bisher entwickelte antivirale Gene wie z. B. dominant-negative Derivate viraler Proteine Δ Rev M10 (BONYHADI *et al.*, 1997; WOFFENDIN *et al.*, 1996) und dominant negative RNA-Sequenzen wie das RRE-decoy (RRE-Köder; KOHN *et al.*, 1999) konnten noch keine überzeugenden klinischen Erfolge vorweisen.

Ein Grund für die ausgebliebenen Erfolge liegt in der Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der mehr als $1 \cdot 10^{11}$ CD4⁺ Zellen eines Patienten (Haase, 1999) *ex vivo*

manipuliert werden kann. Um die Virusreplikation nachhaltig zu unterdrücken müssen sich die genetisch modifizierten Zellen also *in vivo* anreichern und die nicht-modifizierten Zellen ersetzen. Nur unter dieser Voraussetzung kann die HIV-Infektion nachhaltig therapiert werden. M87o verhindert bereits die Integration des Virus ins Zellgenom (Klasse I Gene; VON LAER und BRANDENBURG 2001). Wie VON LAER *et al.* (2005) durch mathematische Modellierungen zeigen konnten, kann den genetisch modifizierten Zellen dadurch der nötige Selektionsvorteil verliehen werden.

In vitro konnte dieser Selektionsvorteil für M87o-transduzierte T-Zellen bereits eindrucksvoll demonstriert werden. So reicherten sich primäre CD4⁺/M87o⁺ Zellen in der Gegenwart von HIV-1 in wenigen Tagen von ca. 20% auf mehr als 80% an. Parallel dazu kam die Virusreplikation praktisch zum Stillstand. Selbst HIV-Mutanten, die gegen T-20 resistent sind (RIMSKY *et al.*, 1998, WEI *et al.*, 2002, D'AQUILA *et al.*, 2003) werden von M87o vollständig inhibiert. Trotz großer Anstrengung ist es bislang nicht gelungen *in vitro* M87o-resistente HIV zu erzeugen (LOHRENGEL *et al.*, 2005).

Zusammen mit den theoretischen Grundüberlegungen demonstrieren diese Ergebnisse das therapeutische Potential des neuen retroviralen Vektors M87o, eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer klinischen Anwendung.

5.1.2 Präklinische Untersuchungen zur Toxizität *in vitro*

5.1.2.1 Genotoxizität

Retrovirale Vektoren integrieren stabil in das Zellgenom. Hierbei scheint es gewisse Präferenzen für bestimmte Genabschnitte zu geben (LAUFS *et al.*, 2003), ob die Integration bevorzugt transkriptionell aktive Genregionen betrifft, wird derzeit noch kontrovers diskutiert (WEIDHAAS *et al.*, 2000; SCHRÖDER *et al.*, 2002; LAUFS *et al.*, 2003). Retrovektoren können durch Integration in oder in der Nähe funktioneller Chromosomenabschnitte wie Introns oder Promotorregionen genotoxische Nebenwirkungen verursachen (GRAY, 1991; DONAHUE *et al.*, 1992; BAUM *et al.*, 2003; CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2004).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird die in Rat-1 Fibroblasten die Koloniebildungsrate in Weichagarkultur durch Transduktion mit M87o nicht erhöht. Die Bildung von Kolonien ist phänotypisch charakteristisch für die Aktivierung von Onkogenen (SMALL *et al.*, 1987, RICKETTS *et al.*, 1988). In den M87o-Kulturen, wie in den naiven Kontrollkulturen war durchschnittlich nur eine Kolonie pro $5 \cdot 10^4$ Zellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu erhöhte die Überexpression des transformierenden großen T-Antigens von SV40 die Koloniebildungsrate fast 100-fach. Das mit der Transduktion mit M87o assoziierte Risiko neoplastischer Transformationen ist somit $< 5 \cdot 10^{-4}$ pro Insertion und liegt damit unterhalb der Sensitivitätsgrenze des Assays. Die Ergebnisse anderer Autoren, die mit vergleichbaren Assaysystemen das Risiko einer Zelltransformation durch retroviralen Gentransfer abgeschätzt haben, unterstützen das vorgestellte Ergebnis. POWELL *et al.* (1999) schätzten das Transformationspotential MLV-basierender Retrovektoren in der murinen Zelllinie BALB/c-3T3 auf $< 1,1 \cdot 10^{-5}$ pro Insertion. MOOLTEN und CUPPLES (1992) schätzten

das Risiko in der humanen Leukämiezelllinie auf $2 \cdot 10^{-7}$ pro Insertion. Allgemein variieren die Angaben in der Literatur sehr stark, zwischen 10^{-3} und 10^{-9} pro Insertion (VARMUS *et al.*, 1991; KING *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 1993; DOSSERS *et al.*, 1993; GROSOVSKY *et al.*, 1993; HUBBARD *et al.*, 1994, POWELL *et al.*, 1999).

Nimmt man die spontane Koloniebildungsrate, wie sie im Rat-1-Assay für die M87o bestimmt wurde, als oberste Grenze für eine Risikoabschätzung, so würden bei einem Gentransfer, bei dem $2,5 \cdot 10^8$ T-Zellen mit einer Transduktionsrate von 30 % transduziert werden, maximal $1,5 \cdot 10^3$ T-Zellen transformiert. Wenn diese in einer nachgeschalteten Expansionsphase 50-fach vermehrt würden, was etwa 6 Zellteilungen entspricht, würden einem Patienten maximal $7,5 \cdot 10^4$ transformierte Zellen transplantiert. Dies ist allerdings eine Höchststrisikoabschätzung, die tatsächliche Dosis transformierter Zellen lässt sich aus den Daten nicht ableiten und wäre sicher deutlich geringer, da die Mehrzahl der Integrationen ohne Konsequenz bleibt.

Die reine Dosis an potentiell transformierten Zellen sagt aber nur sehr wenig über das tatsächliche individuelle Risiko, therapieassoziiert eine maligne Erkrankung auszuprägen aus. Denn die Integration innerhalb eines Gens oder dessen Nachbarschaft führt nicht zwangsläufig zur malignen Entartung der Zelle. In der Regel führt eine solche Integration zur Deletion des betroffenen Gens, die aber im diploiden Genom durch das zweite Allel ausgeglichen werden kann und sich deshalb still verhält (GRAY, 1991). Insertionen, die zu Störungen von Signalwegen führen, haben eher negative Folgen für die Überlebensraten der Zellen *in vivo* oder leiten direkt apoptotische Prozesse ein. Nach dem gegenwärtigen Verständnis würde bei primären Zellen eine einzelne Insertionsmutation für sich genommen nicht ausreichen um einen malignen Phänotyp zu erzeugen (HAHN und WEINBERG, 2002). Hierfür sind weitere chromosomale Schädigungen Voraussetzung.

Im Vergleich mit anderen etablierten Therapieverfahren, wie z. B. Bestrahlung und Chemotherapie mit DNA-schädigenden Medikamenten, ist das Risiko, dass onkogene Veränderungen allein durch eine Insertionsmutagenese ausgelöst werden, wahrscheinlich deutlich geringer (MOOLTEN und CUPPLES, 1992). KIEM *et al.* (2004) publizierten eine Studie in der sie unter anderem 42 Rhesusaffen nach retroviraler Stammzellgentherapie für einen mittleren Zeitraum von 3,5 Jahre beobachteten. Die Autoren konnten in keinem der Versuchstiere Anzeichen für neoplastische Veränderungen nachweisen. Dass das Risiko einer Karzinogenese als Folge eines retroviralen Gentransfers dennoch nicht rein hypothetisch ist, belegen Beispiele aus der Literatur (DONAHUE *et al.* 1992; LI *et al.* 2002; HACEIN-BEY-ABINA *et al.*, 2003). Die publizierten Fälle von gentransferassoziierten Neoplasien weisen alle charakteristische Besonderheiten auf und unterscheiden sich substantiell von der für M87o geplanten Anwendung.

In der von DONAHUE *et al.* 1992 publizierten Rhesusaffenstudie führten replikationskompetente Retroviren (RCR), die durch Rekombination in der Verpackungszelllinie gebildet wurden, zur Entstehung aggressiver T-Zelllymphome. Die malignen Lymphomzellen trugen 14-25 RCR-Kopien (VANIN *et al.*, 1994). Die

Rezipienten waren allerdings nach Konditionierung mittels Ganzkörperbestrahlung immunologisch kompromittiert und konnten die Replikation der RCR nicht kontrollieren, was die Manifestation der Leukämie erheblich begünstigte. Für die klinische Anwendung der M87o-Gentherapie müssen Vektor-Präparationen verwendet werden, die RCR-negativ getestet wurden. Damit kann das Risiko einer RCR-Übertragung nahezu ausgeschlossen werden. Darüber hinaus können sich MLV-basierende RCR in humanen T-Lymphozyten generell sehr schlecht replizieren und fast alle Nachkommen sind nicht infektiös (EBELING *et al.*, 2003). Retrovektoren, die von murinen Retroviren abgeleitet sind, werden schnell durch humanes Komplement inaktiviert (ROTHER *et al.*, 1995). Somit ist im Fall der akzidentellen Infektion eine Vermehrung im menschlichen Organismus nicht anzunehmen.

LI *et al.* (2002) beobachteten die Entstehung akuter myeloider Leukämien (AML), Subtyp M5, nach serieller Stammzelltransplantation in Mäuse. In diesem Fall waren die Vektorpräparationen frei von RCR. Die Leukämien wurden von einem Zellklon verursacht, der eine Vektorintegration in Evi1-Gen (ecotropic viral integration site-1), einem Transkriptionsfaktor der Zink-Finger-Proteinfamilie (MORISHITA *et al.*, 1988; MATSUGI *et al.*, 1990), trug. Die Aktivierung von Evi1 könnte zur Leukämieentstehung beigetragen haben, reichte aber alleine nicht aus, denn sie ist normalerweise nicht mit einer AML vom Subtyp M5 assoziiert (RAVID und LICHT, 2001). Die Autoren vermuteten einen synergistischen Beitrag zur Tumorgenese seitens des Transgens (siehe auch Kap. 5.1.2.2).

FISCHER *et al.* veröffentlichten Anfang 2000 die erste erfolgreiche Gentherapie der schweren Immundefizienz X1 (severe combined immuno deficiency X-1, SCID-X1) in zwei Patienten (CAVAZZANA-CALVO *et al.*, 2000). Diese X-chromosomal vererbte Krankheit ist durch eine frühe Blockierung der T- und NK-Zell-Differenzierung charakterisiert. Diese wird von einer Mutation im Gen der γ c-Untereinheit der Rezeptoren für Interleukin-2, -4, -7, -9 und -15, die an der Übermittlung von Wachstums-, Überlebens- und Differenzierungssignalen früher Lymphozyten-vorläufer beteiligt sind, verursacht. Autologe CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen wurden mit einem retroviralen Vektor, der die γ c-Untereinheit exprimiert, transduziert und transplantiert. Innerhalb der zehnmonatigen Nachbeobachtung konnten funktionelle, transgenpositive T-, B-, und NK-Zellen nachgewiesen werden. Zwei der insgesamt zehn behandelten Kinder entwickelten allerdings eine Leukämie (HACEIN-BEY-ABINA *et al.*, 2003). Genetische Untersuchungen zeigten, dass der retrovirale Vektor in beiden Fällen in das Onkogen Lmo-2 (Rhombotin 2) integriert war und dieses aktivierte. Lmo-2 ist ein Onkogen, das bei T-Zell-Leukämien häufig überexprimiert wird (LOWSKY *et al.*, 1997; ONO *et al.*, 1998; RABBITTS *et al.*, 1999). Obwohl es keine Hinweise für veränderte Signaltransduktion durch die transgene γ c-Untereinheit gab, war ihre physiologische Wirkung offensichtlich ausreichend, um die starke Expansion der Zellen zu ermöglichen. Neben diesen Faktoren wurde bei einem der betroffenen Kinder eine Chromosomenaberration festgestellt, die eine Prädisposition für die Lymphomentstehung darstellen könnte.

Zusammengenommen weisen alle bisher veröffentlichten Neoplasien als Folge retroviraler Gentransfers, deutliche Parallelen und Gemeinsamkeiten auf. In allen Fällen waren hämatopoetische Stammzellen, die große Teile des blutbildenden Systems rekonstituieren mussten, betroffen. Daraus ergeben sich mehrere wichtige Konsequenzen. Einerseits müssen die Zellen nach der Transplantation sehr stark proliferieren und andererseits spalten sich Zellen in die einzelnen Zelllinien auf. Diese unterscheiden sich in ihrer Genexpression und somit können im Laufe der Differenzierung Gene exprimiert werden, mit denen das übertragene Transgen interferiert, ohne dass dies bei der Prüfung an den modifizierten Stammzellen der Fall sein muss. Die M87o-Gentherapie wie sie in der hier vorgestellten Arbeit konzipiert ist, zielt auf die genetische Modifikation peripherer Lymphozyten ab. Diese Zellen sind schon weitgehend ausdifferenziert und entwickeln sich nicht zu anderen Zelllinien weiter. Damit wird das System weit besser charakterisierbar und weniger anfällig für maligne Geschehen. Seit der ersten klinischen Untersuchung zum retroviralen Gentransfer 1989 (ROSENBERG *et al.*, 1990) ist in mehr als zehn Jahren intensiver klinischer Forschung kein einziger Fall einer Neoplasie nach retroviralem Gentransfer in primäre Lymphozyten aufgetreten.

5.1.2.2 Phänotoxizität

Wie bereits in Kap. 5.1.2.1 diskutiert, kann die Expression eines Transgens mit der Expression wichtiger Zellproteine interferieren (BAUM *et al.*, 2003) und dadurch die Zelle funktionell kompromittieren. In Experimenten zur Phänotoxizität wurde der Einfluss von M87o auf die Expression der charakteristischen Lymphozytenproteine CD3, CD4, CD25, CD45RA/RO untersucht. Hierfür wurden primäre Lymphozyten gesunder Spender mit M87o bzw. einem Kontrollvektor (M56) transduziert und mit untransduzierten Zellen verglichen. Die Expression der untersuchten Oberflächenproteine wurde durch die Transduktion mit M87o nicht verändert. Eine Veränderung der Expression würde darauf hinweisen, dass die Antigenerkennung der T-Zellen (CD3 & CD4) bzw. ihre Stimulation (CD25) durch M87o beeinträchtigen würden. Die ungestörte Interaktion zwischen T-Zellrezeptor, CD4 Co-Rezeptor und den entsprechenden antigenpräsentierenden MHC-Molekülen ist Grundvoraussetzung für einen therapeutischen Erfolg der M87o-Gentherapie, da nur so gewährleistet ist, dass die genetisch modifizierten Zellen immunologisch aktiv sind.

Gesunde T-Zellen zeichnen sich, neben der Expression charakteristischer Markerproteine, dadurch aus, dass sie nach der Erkennung eines MHC-gebundenen Antigens proliferieren und Cytokine ausschütten. Der CD3-Komplex, der mit dem T-Zellrezeptorkomplex (TCR) assoziiert ist, übermittelt hierbei das aktivierende Signal (BRETSCHER, 1992). Um den Einfluss der Transduktion mit M87o auf die Stimulierbarkeit primärer T-Zellen zu untersuchen, wurden M87o⁺ T-Zellen mit OKT-3/IL-2 polyklonal stimuliert und das Zellwachstum mit Hilfe des ³H-Thymidin-Einbaus quantifiziert. M87o-transduzierte T-Zellen proliferierten nach OKT-3/IL-2-Stimulation (77.590 cpm ± 2.487) ebenso gut wie untransduzierte Kontrollzellen (71.335 cpm ±

5.531). Die mit einer Antigenerkennung verbundene Cytokinausschüttung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

LI *et al.* (2002; siehe auch Kap. 5.1.2.1) vermuteten bei der von ihnen beobachteten akuten myeloiden Leukämien (AML) einen Zusammenhang mit dem exprimierten Transgen Δ LNGFR. Es handelt sich dabei um ein Derivat des Tumornekrosefaktorrezeptors p75NTR, dessen cytoplasmatische Domäne deletiert wurde. Hämatopoetische Zellen, mit Ausnahme einiger B-Zell Subtypen, exprimieren normalerweise kein p75NTR (LABOUYRIE *et al.*, 1999). Die Deletion der cytoplasmatischen Domäne macht Δ LNGFR allerdings natürlich vorkommenden antiapoptotisch wirkenden „Fängerrezeptoren“ der TNF-Rezeptorfamilie ähnlich, die als dominant-negative Inhibitoren proapoptotischer Signalwege wirken (ASHKENAZI und DIXIT, 1999). Fibroblasten, die Δ LNGFR zusammen mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor *Trk* exprimieren, werden durch Zugabe von Neutropinen transformiert (HANTZOPOULOS *et al.*, 1994). M87o exprimiert im Gegensatz dazu ein artifizielles Peptid, das keine Domänen enthält, von denen Interaktionen mit Proteinen der Signalübertragungswege bekannt sind. Da in den Experimenten zur Stimulierbarkeit M87o-transduzierter T-Zellen keine Unterschiede zwischen M87o-transduzierten Zellen und untransduzierten Kontrollzellen gefunden wurden, muss eine Beeinflussung der Signaltransduktion durch M87o nicht befürchtet werden.

Zusammengenommen erbrachten die Untersuchungen *in vitro* keine Anzeichen für phänotoxische Wirkungen durch M87o. Es kann also angenommen werden, dass M87o-transduzierte T-Zellen *in vivo* in der Lage sind, Antigene im MHC-Kontext zu erkennen und auf diesen Stimulus hin zu proliferieren. Die Entstehung von Neoplasien nach M87o-Genstransfer ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu erwarten.

5.2 Präklinische *in vivo*-Untersuchungen zur Toxizität und Immunogenität der M87o-Gentherapie im autologen Rhesus-Affenmodell

Neben *in vitro*-Untersuchungen sind von Behördenseite präklinische Untersuchungen am Tiermodell vorgeschrieben. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde mit der Entwicklung eines Transduktionsprotokolls für Rhesusaffen-Lymphozyten die Grundlage für die Durchführung einer Studie zur Toxizität und Immunogenität von M87o im Rhesusmakaken gelegt.

5.2.1 Das Transduktionsprotokoll für Rhesusaffenlymphozyten

Das Transduktionsprotokoll, wie es für die präklinische Studie zur Toxizität und Immunogenität von M87o im autologen Rhesusaffentransplantationsmodell etabliert und eingesetzt wurde, ist nachfolgend kurz skizziert:

1. Prästimulation:

Drei Tage in Anwesenheit von SP34 (10 µg ml⁻¹, immobilisiert), Leu28 (1 µg ml⁻¹) und 5% autologem Serum.

2. Transduktion:

Für die Transduktion werden die stimulierten Zellen in Kulturschalen, die mit RetroNectin beschichtet und durch serielle Zentrifugation (30 Minuten bei 4 °C und 2.500 UpM) mit Vektorpartikeln vorbeladen sind, ausgesät. Die Transduktion wird zweimal im Abstand von 24 Stunden durchgeführt.

3. Expansion:

Die Zellen werden in Medium mit 5% autologem Serum und IL-2 (100 U ml⁻¹) expandiert.

Für die präklinische Testung der M87o-Gentherapie musste ein Gentransferprotokoll für periphere Blutlymphozyten von Rhesusaffen entwickelt werden. Um die Studienergebnisse gute auf die Verhältnisse im humanen System übertragen zu können sollte das Protokoll eine klinische Anwendung möglichst genau simuliert. Das Verfahren zur Transplantatherstellung muss damit so weit wie möglich den Anforderungen der „Guten Herstellpraxis für pharmazeutische Produkte“ (GMP) entsprechen. So ist z.B. die Verwendung von Feederzellen zur *ex vivo*-Stimulation der T-Zellen, wie sie von ZHANG *et al.* (2003) vorgeschlagen wurde, nicht möglich. Die *ex vivo*-Stimulation primärer T-Zellen ist aber für den retroviralen Gentransfer unabdingbar, da C-Typ Retroviren (MLV,) nicht in der Lage sind, aktiv die Kernmembran zu überwinden (MILLER *et al.*, 1990; ROE *et al.*, 1993). In dem in dieser Arbeit vorgestellten Transduktionsprotokoll werden die Lymphozyten durch die Stimulation der Oberflächenantigene CD3 und CD28 mittels Antikörper (SP34, Leu28) zur Zellteilung angeregt. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass anti-CD3 Antikörper in pharmazeutischer Qualität verfügbar sind und bereits in einer

Reihe von Studien (LEVINE *et al.*, 1995; BUNNELL *et al.*, 1995; LEVINE *et al.*, 1997; MOVASSAGH *et al.*, 2000) erfolgreich zur *ex vivo*-Stimulation von T-Zellen verwendet wurden. Darüber hinaus bewirken sie über die Kreuzvernetzung der CD3-Untereinheit des T-Zellrezeptors eine polyklonale Stimulation der Zellen, die unabhängig von der Antigenpezifität der T-Zelle ist (GERMAIN, 2001).

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte anti-CD3 Antikörper SP34 hatte in vergleichenden Untersuchungen eine deutlich stärkere Wirkung auf die Zellproliferation als der von anderen Arbeitsgruppen verwendete anti-CD3 Antikörper FN-18 (BUNNELL *et al.*, 1995; HANAZONO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003). Damit war SP34 für die Gewinnung hoher Zellzahlen, wie sie für die Durchführung einer Studie zur Toxizität und Immunogenität von M87o im Rhesusaffentransplantationsmodell gewünscht waren, besser geeignet als FN-18.

Neben dem über den CD3-Komplex des TCR übermittelten Signal sind weitere so genannte co-stimulatorische Signale, wie sie z. B. von dem Adhäsionsmolekül CD28 nach Bindung an CD80 bzw. CD86 übermittelt werden, für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle nötig (BRETSCHER, 1992; JUNE *et al.*, 1994; DUSTIN und CHAN, 2000). Aus diesem Grund wurde neben SP34 der anti-CD28 Antikörper Leu28 für die Prästimulation der T-Zellen eingesetzt. BUNNELL *et al.* (1995) verwendeten zur Stimulation von T-Zellen anti-CD3 Antikörper in Kombination mit IL-2. In vergleichenden Untersuchungen zur Zellproliferation konnten keine Unterschiede zwischen SP34/Leu28- und SP34/IL-2-Stimulation festgestellt werden. Für die klinische Anwendung setzt sich die Kombination von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (LEVINE *et al.*, 1998; MITSUYASU *et al.*, 2000; DEERKS *et al.*, 2002; LEVINE *et al.*, 2002) jedoch immer mehr durch. Für die Verwendung von anti-CD28 Antikörpern sprechen auch die Daten von FERRAND *et al.* (2000), die zeigen, dass das T-Zellrezeptorrepertoire nach Stimulation mit CD3/IL-2 deutlich eingeengt ist, während CD3/CD28-Stimulation das Rezeptorrepertoire konserviert. Wahrscheinlich werden mit CD3/IL-2 präferentiell Gedächtniszellen sehr stark aktiviert (LEVINE *et al.*, 1995, 1997) und damit nur einen Teil des T-Zellpools expandiert.

Durch den Einsatz von RetroNectin-beschichteten Kulturgefäßen konnte die Gentransferrate in den Vorversuchen auf ca. 50% gesteigert werden. Die beobachtete Steigerung der Gentransferrate steht in Einklang mit den von HANENBERG *et al.* (1996), POLLOK *et al.* (1997) und MACNEILL *et al.* (1999) publizierten Daten. RetroNectin ist ein recombinantes Fibronektinfragment (KIMIZUKA *et al.*, 1991) und enthält eine zentrale Zellbindungsdomäne, eine hochaffine Heparinbindungsdomäne und eine CS1-Domäne. Wahrscheinlich vermittelt es die Co-Lokalisierung von Vektorpartikel und Zelle durch Bindung beider Partner.

Das entwickelte Protokoll zur Transduktion von Rhesusaffenlymphozyten erlaubt eine effektive Stimulation und Transduktion der Zielzellen und legte damit die Grundlage für die Durchführung der präklinischen Studie zur Toxizität und Immunogenität von M87o im autologen Rhesusaffentransplantationsmodell.

5.2.2 Das Rhesusaffenmodell zur Toxizität und Immunogenität von M87o

Für die Durchführung von Untersuchungen zur Toxizität und Immunogenität eignen sich Rhesusaffen besonders gut, da sie dem Menschen relativ nahe stehen (DONAHUE und DUNBAR, 2001). Zwei männliche Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) wurden für die M87o-Studie ausgewählt. Den Tieren wurde Blut entnommen und daraus die peripheren Lymphozyten isoliert. Die Zellen wurden transduziert und schließlich reinfundiert. Bei der Umsetzung des Transduktionsprotokolls konnten, im Gegensatz zu den Vorversuchen nur 21% (98006) bzw. 25% (98023) der Zellen transduziert werden (Bestimmung mittels qPCR). Die Transferraten sind allerdings mit den in der Literatur angegebenen Daten (BUNNELL *et al.*, 1995; HANAZONO *et al.*, 1999) vergleichbar.

Bei der Transplantation wurden den Tieren $6,2 \cdot 10^5$ bzw. $8,0 \cdot 10^5$ M87o⁺ CD4-Zellen kg⁻¹ infundiert. Von den M87i-Kontrollzellen, die kein Transgen exprimierten, wurde eine Dosis von $1,04 \cdot 10^5$ bzw. $1,29 \cdot 10^5$ M87i⁺ CD4-Zellen kg⁻¹ transplantiert. M87i diente als Kontrolle für das *in vivo*-Überleben der *ex vivo*-manipulierten Zellen und sollte Anhaltspunkte für eventuell auftretende transgenbedingte Immunreaktionen liefern. Die Transplantation wurde von beiden Versuchstieren sehr gut vertragen. Es gab keine Anhaltspunkte für akute Toxizität.

M87o⁺-Zellen konnten bis zu 98 bzw. 140 Tage nach der Transplantation mittels PCR nachgewiesen werden. In Lymphknotenbiopsien gelang der Nachweis lediglich in einem Affen an Tag 7 nach Transplantation. HEIM *et al.* (2000) führten im Rhesusaffenmodell vergleichbare Versuche zur Transplantation genetisch modifizierter Lymphozyten durch. Sie verglichen Zellen, die nach retroviralem Gentransfer das *neo*-Resistenzgen exprimierten, mit Zellen, die ein transkriptionell inaktiviertes Derivat des Vektors trugen. Nach der Transplantation waren die *neo*-exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, deutlich kürzer nachweisbar. Die Autoren fanden aber keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Antikörpern und dem Verschwinden der *neo*-exprimierenden Zellen. Sie schlossen daher auf eine zelluläre Immunreaktion als Ursache. Grundsätzlich scheint die Immunogenität genetisch modifizierter Lymphozyten höher als die genetisch modifizierter Stammzellen (HEIM *et al.*, 2000) zu sein. Die immunologischen Untersuchungen (Cytokinfärbung, Proliferationsassay, ELISPOT) der M87o-Studie ergaben jedoch keine Hinweise auf zelluläre oder humorale Immunreaktionen. Western Blot-Analysen konnten im Serum der Versuchstiere keine M87o-spezifischen Antikörper nachweisen. Bei der Entwicklung des retroviralen Vektors M87o wurde bereits versucht, das immunogene Potential des Transgens soweit wie möglich zu minimieren. So wurde das Transgen, mit Ausnahme der C46-Sequenz, aus Modulen humanen Ursprungs zusammengesetzt (EGELHOFER *et al.*, 2004). Das C46-Peptid selbst scheint nur wenig immunogen zu sein, so enthält es z. B. kein CTL-Epitop (HIV Molecular Immunology Database 2001, Los Alamos National Laboratory, HIV Molecular Database, <http://hiv-web.lanl.gov/immunology>). Eine sehr seltene Ausnahme stellt allerdings der neutralisierende Antikörper 2F5 (MUSTER *et*

al., 1993; BUCHACHER *et al.*, 1994) dar, der an die im C46-Peptid enthaltene gp41-Sequenz ELDKWA bindet. Allgemein ist diese Sequenz aber nur sehr wenig immunogen, weshalb Antikörper wie 2F5 sehr selten auftreten (LABRIJN und PARREN, 2000).

BUNNELL *et al.* (1997) beobachteten ebenfalls das Verschwinden *neo*-transduzierter Zellen über einen Zeitraum von 168 Tagen nach Transplantation. In dieser Studie konnten keine Antikörper gegen das Transgen oder Vektorkomponenten nachgewiesen werden. Die Autoren fanden aber Antikörper gegen Proteine aus fötalem Kälberserum und machten dieses für den Untergang der Zellen mitverantwortlich. In der präklinischen Studie zur Toxizität und Immunogenität von M87o wurden die Zellen allerdings in Abwesenheit von FKS kultiviert, weshalb das Auftreten von Antikörpern gegen FKS ausgeschlossen war.

Obwohl offensichtlich keine immunologische Reaktion gegen die transplantierten Zellen erfolgte, waren transgenpositive Zellen nur für 98 bzw. 140 Tage nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für das Verschwinden der M87o⁺ T-Zellen könnte die Tatsache liefern, dass die in dieser Studie applizierten Zelldosen verhältnismäßig niedrig waren. In vergleichbaren Studien wurde die 10 bis 20-fache Dosis appliziert (BUNNELL *et al.*, 1997; HEIM *et al.*, 2000). Direkt nach Transfusion wurde im Blut mit 0,105% der höchste Anteil M87o⁺ Zellen nachgewiesen. Ausgehend von diesem niedrigen Wert sank der Anteil M87o⁺ Zellen innerhalb des Beobachtungszeitraums unter die Detektionsgrenze. Da die M87o⁺ Zellen in den gesunden Affen keinen Selektionsvorteil hatten, war eine nachfolgende Anreicherung der Zellen nicht zu erwarten. Die applizierte Zelldosis hätte sicher ausgereicht um eine Immunreaktion gegen M87o auszulösen, wenn M87o immunogen wirken würde. Da keine Anhaltspunkte für eine Immunreaktion gefunden wurden, ist nicht ausgeschlossen, dass sich die Zellen im Körper der Versuchstiere verteilten und in keinem der untersuchten Gewebe in ausreichender Zahl, um mit den eingesetzten Nachweismethoden detektiert zu werden, anreicherten.

Alles in allem hat die Studie gezeigt, dass M87o⁺ T-Zellen in immunkompetenten Affen nicht immunogen wirken und nicht toxisch sind. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass auch in der klinischen Anwendung am Menschen das Risiko von Immunreaktionen als eher gering eingeschätzt werden kann. Dieses Ergebnis war eine entscheidende Voraussetzung für die klinische Entwicklung der M87o-Gentherapie.

5.3 Vorbereitungen für eine klinische Studie der Phase I/II: Die Transduktion HIV⁺ Spenderzellen kann im klinisch relevanten Maßstab durchgeführt werden

Als Vorbereitung einer klinischen Studie zur Toxizität und Wirksamkeit (Phase I/II) an HIV-infizierten, freiwilligen Probanden musste ein Protokoll für die Produktion M87o-modifizierter T-Zellen (mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen pro Spender) entwickelt werden.

Folgende Einschlusskriterien wurden für die Probanden formuliert:

- Anamnese mit multiplem Therapieversagen durch multiresistente Viren
- Viruslast von >5.000 Kopien ml^{-1}
- CD4-Zellzahl von $50 - 200 \mu\text{l}^{-1}$ Blut

Aus dieser Konstellation ergaben sich besondere Problempunkte:

- Niedrige Ausgangszellzahl: Aufgrund der geringen Ausgangszellzahl (<200 Zellen ml^{-1}), war zum Erreichen der Studienspezifikation ($>5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen pro Spender) eine *ex vivo*-Expansion der Zellen mindestens um den Faktor 10 notwendig.
- Ex vivo-Expansion von HIV: Während der Kultur musste die Virusreplikation effektiv gehemmt werden. Einerseits musste dadurch die theoretisch mögliche *in vitro*-Selektion M87o-resistenter Viren verhindert werden, andererseits wäre eine Superinfektion der Patienten mit *in vitro*-expandierten HIV unethisch.
- Multiresistente HIV: Die Studienpatienten waren Träger multiresistenter Viren, was in ihrer Anamnese bereits durch multiples Therapieversagen dokumentiert war. Daher musste für die *ex vivo*-Kultur ein Medikamentencocktail definiert werden, der *in vitro* die Viren aller Studienpatienten effektiv hemmte. Hierbei war sicherzustellen, dass die antiviralen Medikamente einerseits den retroviralen Gentransfer nicht beeinträchtigen und andererseits in der eingesetzten Konzentration nicht toxisch auf die Zielzellen wirken.

5.3.1 Das Protokoll für die retrovirale Transduktion von CD4⁺ T-Zellen HIV-infizierter Spender im Versuchsmaßstab

Im Labormaßstab wurden mit dem in dieser Arbeit entwickelten Transduktionsprotokoll bis zu 61% der CD4⁺ T-Zellen mit M87o transduziert.

Das Transduktionsprotokoll beinhaltet mehrere Schritte und sei der nachfolgenden Diskussion skizzenhaft vorangestellt:

1. Aufreinigung der Zielzellen:

- Depletion der CD8⁺ Zellen mittels MACS CD8 MicroBeads
- Anreicherung der Zielzellen durch Inkubation mit CD3/CD28-Beads (3 Beads pro CD3⁺ Zelle, 30 min)

2. Prästimulation:

- Stimulation der Zellen für vier Tage mit CD3/CD28-Beads und IL-2 (100 U ml⁻¹) in Gegenwart von Nelfinavir (1 µM) und Amprenavir (0,33 µM)
- Am dritten Tag erneute Zugabe der antiretroviralen Therapeutika (AT; Amprenavir 0,33 µM, Nelfinavir 1 µM, T-20 10 µg ml⁻¹)

3. Transduktion:

- Extraktion der Beads mittels Magnet
- Zweimaliges Vorbeladen der Zellkulturgefäße (T-75 Zellkulturflasche) mit vektorhaltigem Zellkulturüberstand (KUHLCHE *et al.*, 2002)
- Aussaat der Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen ml⁻¹) in einem mit Vektorpartikeln vorbeladenen Kulturgefäß in Medium mit AT und IL-2 (100 U ml⁻¹)
- Wiederholung der Transduktion am folgenden Tag

4. Expansion:

- Expansion der Zellen (Zelldichte 0,5 – 1,0 · 10⁶ Zellen ml⁻¹) in Medium mit AT und IL-2 (200 U ml⁻¹) bis zum Erreichen der Zielzellzahl

Vor der eigentlichen Transduktion erfolgte die Depletion der CD8⁺ T-Zellen. Diese T-Zellsubpopulation konkurriert während der Prästimulation und Transduktion mit den CD4⁺ Zielzellen um Stimulus, Nährstoffe und Vektorpartikel. Die Transduktion CD8⁺ T-Zellen mit M87o ist nicht beabsichtigt, da CD8⁺ T-Zellen nicht von HIV infiziert werden können und von M87o⁺ CD8-Zellen keine therapeutische Wirkung erwartet wird. Es gelang mit Hilfe von MACS CD8-MicroBeads 94% der CD8-Zellen zu depletieren und damit eine sehr reine CD4-Zellpopulation zu generieren. Der Reinheitsgrad der Zielzellpopulation konnte damit gegenüber den von BUNNELL *et al.* (1995, 1997) publizierten Ergebnissen weiter gesteigert werden.

Nach der Depletion der CD8-Zellen wurden die Zellen mit CD3/CD28 Beads stimuliert. Das ist nötig, da Lymphozyten in der Körperperipherie meist in ruhendem Zustand vorliegen und vor der retroviralen Transduktion zur Zellteilung angeregt

werden müssen (LEWIS und EMERMAN, 1994). Die stimulierenden Antikörper waren hierfür kovalent auf der Oberfläche von super-paramagnetischen Kügelchen (z. B. Dynaspheres® MS-4.5-REK, $\varnothing = 4,5 \mu\text{m}$, Dynal) gebunden. Dieses Verfahren wurde bereits von anderen Autoren erfolgreich zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt (LEVINE *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 2000; MITSUYASU *et al.*, 2000; DEERKS *et al.*, 2002). Die Präsentation von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern auf super-paramagnetischen Beads hat mehrere Vorteile. Die Kombination beider Antikörper erlaubt die Stimulation der T-Zellen über den CD3-Komplex des TCR und gleichzeitig über das co-stimulatorische CD28 Molekül, was für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle nötig ist (BRETSCHER, 1992; JUNE *et al.*, 1994; DUSTIN und CHAN, 2000). Ein weiterer Vorteil von CD3/CD28 Beads besteht darin, dass sie zusätzlich zur magnetischen Anreicherung von T-Zellen verwendet werden können. Einige Autoren schlagen hingegen die Verwendung von anti-CD3-Antikörpern (z. B. OKT-3) und IL-2 vor (ROBERTS *et al.*, 1994; BUNNELL *et al.*, 1995; RANGA *et al.*, 1998; COOPER *et al.*, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass CD8-depletierte T-Zellen nach CD3/CD28-Bead-Stimulation deutlich stärker proliferieren als nach OKT-3/IL-2-Stimulation. Phänotypisch (Expression der Oberflächenantigene CD3, CD4, CD28, CD62L, CD154) zeigten beide Zellpopulationen keine Unterschiede. Die Gentransferrate war in beiden Versuchsreihen ebenfalls gleich hoch (CD3/CD28-Beads: $31,89\% \pm 5,8\%$, OKT-3/IL-2: $32,98\% \pm 7,4\%$). Wie FERRAND *et al.* (2000) zeigten, konserviert die CD3/CD28-Bead-Stimulation das T-Zellrezeptorrepertoire, während Stimulation mit CD3/IL-2 dieses deutlich einengt. Wahrscheinlich bewirkt die CD3/CD28-Bead-Stimulation eine polyklonale Proliferation, während die Stimulation mit CD3/IL-2 präferentiell Gedächtniszellen aktiviert (LEVINE *et al.*, 1995, 1997) und damit nur einen Teil des T-Zellpools expandiert. Im Hinblick auf eine Anwendung im HIV-Patienten, speziell in fortgeschrittenem Stadium der Infektion, wäre der Verlust von Antigenespezifitäten im Zellpräparat problematisch, da im Verlauf der Krankheit das T-Zellrezeptorrepertoire des Patienten bereits drastisch eingeschränkt ist (VALLE *et al.*, 2001; LI PIRA *et al.*, 2003). Um ein funktionierendes Immunsystem zu rekonstituieren, das auch nach Applikation in der Lage ist, Infektionen zu bekämpfen und zu kontrollieren, muss der Pool der M87o-modifizierten Zellen über ein breites T-Zellrezeptorrepertoire verfügen.

Proviren-tragende T-Zellen können durch Stimulation zur Produktion von HIV angeregt werden (GOWDA *et al.*, 1989; KORIN *et al.*, 1998; BARKER *et al.*, 1998). Die Virusvermehrung muss aber während der Herstellung der Zellpräparate effektiv unterdrückt werden. Cytopathische Viren würden hohe Zellverluste verursachen und darüber hinaus bestünde bei ungehinderter Replikation grundsätzlich das Risiko der „*ex vivo*-Resistenzbildung“. Im Fall der M87o-Gentherapie könnte die Replikation des Virus theoretisch zur *ex vivo*-Selektion geschützter Zellen führen. Dadurch wäre die Majorität der reinfundierten Zellen M87o⁺ und diese Zellen hätten dann gleichzeitig den Nachweis ihrer inhibitorischen Potenz erbracht. Wie bereits diskutiert, konnte in Zellkulturversuchen mit PM-1-Zellen und primären T-Zellen gezeigt werden, dass die

in vitro-Selektion innerhalb weniger Tage abgeschlossen sein kann. Trotz großer Anstrengungen ist es *in vitro* bisher nicht gelungen, M87o-resistente HIV-1 zu selektieren (LOHRENGEL *et al.*, 2005). Aus ethischer Sicht ist die Transplantation eines hoch virusbelasteten Zellpräparats allerdings nicht zu rechtfertigen. Die Virusreplikation muss also *in vitro* während der Zellmanipulation zuverlässig inhibiert werden. Mit einem Medikamentencocktail, bestehend aus den beiden Proteaseinhibitoren Amprenavir (0,33 μM) und Nelfinavir (1,0 μM), sowie dem Fusionsinhibitor T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), kann die Replikation multiresistenter Viren vollständig und zuverlässig unterdrückt werden. Der von MITSUYASU *et al.* (2000) publizierte Medikamentencocktail, bestehend aus Zidovudine (AZT, 1 μM), Didanosine (ddl, 10 μM) und Ritonavir (Norvir, 500 μM), unterdrückte die Virusreplikation im Vergleich dazu nur sehr unzuverlässig.

Die von einigen Autoren (CARROLL *et al.*, 1997; LEVINE *et al.*, 1998, BAKER *et al.*, 1998) beobachtete Hemmung der Virusreplikation durch die Stimulation mit CD3/CD28-Beads konnte in Vorversuchen teilweise bestätigt werden, reichte aber nicht aus um eine vollständige Virushemmung in allen getesteten Kulturen zu garantieren. RILEY *et al.* (1997, 1998) und LEVINE *et al.* (2002) zeigten, dass die Expression der Co-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 nach CD3/CD28-Bead-Stimulation herabgesetzt ist und CD4⁺ Gedächtniszellen β -Chemokine produzieren, die die Co-Rezeptorbindung blockieren, wobei die Verringerung der Co-Rezeptorverfügbarkeit mit der Resistenz gegenüber HIV-1 korreliert. HIV-1, die den CCR5-Rezeptor für die Infektion der Zellen nutzen, werden durch die CD3/CD28-Bead-Stimulation besonders effektiv inhibiert (RILEY *et al.*, 1998). Die Studienpatienten sollten nicht auf den Virus-Tropismus hin ausgewählt werden, daher war eine Inhibition, die sich auf CCR5-trope Viren beschränkt, nicht ausreichend.

Mit dem optimierten Transduktionsprotokoll konnte die Zellzahl innerhalb von 10 Tagen im Mittel um den Faktor 153 expandiert werden. Extrapoliert man die Ergebnisse der small scale-Experimente linear auf die Verhältnisse im Produktionsmaßstab, so war zu erwarten, dass mit dem etablierten Protokoll bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^9$ im Mittel $1,5 \cdot 10^{11}$ Zellen produziert werden könnten. Der Ertrag würde bei ca. $7,5 \cdot 10^{10}$ CD3⁺/CD4⁺/M87⁺ Zellen liegen. Die Spezifikation für die Studientransplantate, mindestens $5 \cdot 10^8$ M87o⁺ CD4-T-Zellen pro Spender bei vollständiger Unterdrückung der Virusreplikation, konnte somit nach den Ergebnissen der small scale-Versuche deutlich übertroffen werden.

5.3.2 Das optimierte Transduktionsprotokoll wurde erfolgreich für den klinischen Einsatz adaptiert.

Für eine klinische Anwendung müssen, im Gegensatz zum Laborversuch, vollständige Zelltransplantate mit bis zu 10^{10} Zellen genetisch manipuliert werden. Während des so genannten „up scaling“ sind daher erhebliche Anpassungen des für den Labormaßstab optimierten Protokolls an die klinisch relevanten Verhältnisse nötig. Die peripheren mononukleären Blutzellen müssen aus dem Blut HIV-infizierter

Patienten mittels Aphereseapparatur abgesammelt werden. Dieser Prozess benötigt mehrere Stunden und das Primärzellmaterial muss über Nacht bei Raumtemperatur gelagert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lagerung für die CD4⁺ T-Zellen ohne negative Folgen bleibt.

Den überwiegenden Anteil im Leukapheresat der Studien-Patienten machten CD8⁺ T-Zellen (ca. 50%), NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Granulozyten (je ca. 10%) und Thrombozyten aus. Der Anteil der CD4⁺ Zielzelle betrug unter Studienbedingungen nur etwa 10%. Die übrigen Zellpopulationen konkurrieren jedoch mit den CD4⁺ Zielzellen um Stimulus und Nährstoffe, und während der Transduktion erschweren diese zusätzlich die Interaktion mit den Vektorpartikeln. Aus diesen Gründen war es erforderlich die CD4⁺ T-Zellen über mehrere Schritte anzureichern. Hierfür wurden die Thrombozyten maschinell ausgewaschen und die CD8⁺ T-Zellen mittels automatisierter immunomagnetischer Separation depletiert. Die CD8-Abreicherung war hierbei deutlich effizienter (99,86% ± 0,2%) als im Versuchsmaßstab. Die Extraktion der verbliebenen CD3⁺-Zellen (T-Zellen) wurde durch die Bindung an super-paramagnetische CD3/CD28-Beads und anschließende magnetische Extraktion der Bead-Zell-Aggregate erreicht.

Die eigentliche Bedeutung der CD3/CD28-Beads liegt jedoch in der Stimulation der primären T-Zellen, die für die retrovirale Transduktion Voraussetzung ist. Wie bereits diskutiert, kann durch die CD3/CD28 Stimulation eine vollständige und polyklonale Aktivierung der T-Zellen erreicht werden (BRETSCHER, 1992; JUNE *et al.*, 1994; DUSTIN und CHAN, 2000). Während der Prästimulationsphase war die Zellvermehrung allerdings sehr geringe. Diese Beobachtung ist charakteristisch für primärer CD4⁺ T-Zellen, die nach CD3-Stimulation eine etwa 3-tägige lag-Phase aufweisen (MOVASSAGH *et al.*, 2000).

Um das Risiko einer immunologischen Reaktion im Patienten zu minimieren, wurde fötales Kälberserum, das sich in einigen Studien bereits als immunogen herausgestellt hat (BUNNELL *et al.*, 1997; SELVAGGI *et al.*, 1997; TUSCHONG *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2004), bei der Kultur der Zielzellen durch humanes AB-Serum ersetzt. Für die Gewinnung der Vektorüberstände musste die Vorkultur der Produzentenzelllinie PG13 allerdings in FKS-haltigem Medium erfolgen, da sonst keine ausreichenden Vektortiter erzielt werden können. Nach einem Waschschrift wurde auf serumfreies Medium umgestellt, in dem dann die Vektorpartikel gesammelt wurden. Um den Kontakt der Transplantatzellen mit residuellem FKS weiter zu reduzieren, wurde für die Transduktion das von KUHLCHE *et al.* (2002) publizierte Zentrifugationsverfahren eingesetzt. Hierbei werden die Vektorpartikel durch Zentrifugation auf der Oberfläche der Zellkulturgefäße angereichert und das dadurch an Vektorpartikeln verarmte Medium kann verworfen werden. Mit diesen Maßnahmen konnte eine Kontamination mit bovinen Serumproteinen praktisch ausgeschlossen werden.

Da zurzeit keine Beutelsysteme zur Verfügung stehen, in denen mit dem Zentrifugationsverfahren effiziente retrovirale Transduktionen möglich sind, musste die Transduktion in Kulturflaschen durchgeführt werden. Bei der Transduktion

konnten maximal $2,5 \cdot 10^8$ Zellen prozessiert werden. Aus diesem Grund mussten die Zellen nach der Transduktion expandiert werden. Wie aus Tab. 10 ersichtlich konnte in drei Experimenten die Zahl von $5 \cdot 10^8$ CD3⁺/CD4⁺/M87o⁺ Zellen, die im klinisch relevanten Maßstab durchgeführt wurden deutlich übertroffen werden. Im Mittel wurde die Zellzahl um den Faktor 44 vermehrt, wobei die Virusreplikation vollständig unterdrückt wurde. LEVINE *et al.* publizierten 1998 ein Protokoll zur large scale-Produktion von CD4⁺ Zellen HIV-infizierter Spender. Die Autoren verwendeten ebenfalls CD3/CD28-Beads zur T-Zellstimulation und erzielten mit ihrem Protokoll im Mittel eine 37-fache Expansion über 14 Tage.

Tab. 10: Vergleichende Zusammenstellung der charakteristischen Kenndaten von drei large scale-Experimenten. Die Spezifikation konnte in allen Experimenten erreicht werden. (n. n. = nicht nachweisbar, Nachweisgrenze $8,7 \text{ pg ml}^{-1}$)

	M87o-01	M87o-02	M87o-03	Mittelwert
Zellzahl nach Prästimulation	$15,0 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^8$
Endzellzahl	$4,3 \cdot 10^9$	$22,0 \cdot 10^9$	$4,6 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{10}$
Expansionsfaktor	17,2	88,0	26,3	43,8
Gentransferrate	30%	20%	37%	29%
Anteil CD3⁺/CD4⁺	88%	96%	90%	91%
Zellzahl CD3⁺/CD4⁺/M87o⁺	$11,4 \cdot 10^8$	$42,0 \cdot 10^8$	$15,3 \cdot 10^8$	$22,9 \cdot 10^8$
HIV-Replikation, p24-Gehalt [pg ml^{-1}]	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.

Im Rahmen einer klinischen Studie zur Toxizität und Wirksamkeit der M87o-Gentherapie wurden gemäß dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll 10 Studientransplantate erfolgreich hergestellt. Für die Applikation des Zellpräparates am HIV-Patienten, speziell in fortgeschrittenem Stadium der Infektion, ist der Erhalt des TCR-Repertoires im Zellpräparat von großer Bedeutung. Mit der Progression der Infektion wird das Rezeptorrepertoire des Patienten immer weiter eingeschränkt und das Immunsystem ist immer weniger in der Lage opportunistische Infektionen zu kontrollieren (McCUNE, 2001; LI PIRA *et al.*, 2001). Diese Entwicklung könnte durch Transplantation von M87o⁺ T-Zellen, die das gesamte Rezeptorrepertoire repräsentieren, aufgehoben werden. Erste Ergebnisse von Untersuchungen der 10 Studientransplantate zeigen, dass das T-Zellrezeptorrepertoire in einigen M87o-Transplantat im Vergleich zum Leukapheresat teilweise rekonstruiert wurde (persönliche Mitteilung Dr. Kühlcke, EUFETS AG). Damit konnten die Beobachtungen von FERRAND *et al.* (2000) bestätigt werden.

Alle Studientransplantate wurden am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg transfundiert und von den Patienten sehr gut vertragen. Die Patienten werden derzeit nachbeobachtet.

5.4 Ausblick

Da die Nachbeobachtungsphase zur klinischen M87o-Studie noch nicht abgeschlossen ist, lässt sich über den möglichen Ausgang der Studie im Rahmen dieser Arbeit nur spekulieren.

Die *in vitro*-Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass die Expression von M87o den T-Zellen einen sehr effektiven Schutz vor der Infektion mit HIV verleiht und sich M87o-exprimierende T-Zellen unter dem Selektionsdruck der Virusreplikation schnell und effizient anreichern können. Damit ist eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Therapie erfüllt. Wie bereits VON LAER und BRANDENBURG (2001) ausführten, hat ein Gen der Klasse I, zu der M87o zu rechnen ist, die größten Aussichten auf dauerhaften therapeutischen Nutzen. M87o unterscheidet sich damit substantziell von den bisherigen Gentherapien, die allesamt keine klinischen Erfolge zeigten (BONYHADI *et al.*, 1997; WOFFENDIN *et al.*, 1996; BAHNER *et al.*, 1996).

Natürlich gibt es darüber hinaus weitere Faktoren, die den therapeutischen Erfolg maßgeblich beeinflussen. So wird die Überlebensrate der *ex vivo*-manipulierten T-Zellen entscheidend sein. In einer Studie von WALKER *et al.* (2000) konnten genetisch modifizierte T-Zellen nach Transplantation mehr als ein Jahr lang nachgewiesen werden. Eine weitere Studie (MITSUYASU *et al.*, 2000) bestätigte diese Ergebnisse. In beiden Studien wurde das Transgen (CD4 ζ) in einem syngenem Transplantationsmodell untersucht. Allerdings unterscheiden sich die Studien in der Stimulation der T-Zellen. MITSUYASU *et al.* (2000) verwendeten wie in der vorgelegten Studie CD3/CD28-Beads. LEVINE *et al.* (2002) konnten zeigen, dass nach autologer Transplantation *ex vivo*-expandierter CD4⁺ T-Zellen (mit CD3/CD28-Beads stimuliert) die CD4-Zellzahl gesteigert werden konnte, und die CCR5-Expression auf CD4⁺ T-Zellen herunterreguliert war. Diese Beobachtung lässt eine teilweise Rekonstitution des Immunsystems erwarten. LEVINE *et al.* (2002) konnten keine erhöhte Virusreplikation nach Transplantation aktivierter T-Zellen *in vivo* feststellen, was Grund zur Hoffnung gibt, dass die M87o-transduzierten Zellen *in vivo* eine ähnliche Lebenserwartung besitzen und damit eine Verbesserung des Immunstatus der Patienten erreicht werden kann. Grundsätzlich zeigen die erwähnten Studien aber die Durchführbarkeit von gentherapeutischen Ansätzen. Zusammen mit den überragenden Eigenschaften des retroviralen Vektors M87o erscheint eine klinisch relevante Wirkung sehr wahrscheinlich.

6 Danksagung

Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz danke ich für die Übernahme der Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. habil. M. D. von Laer danke ich herzlich für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, für die stete Diskussionsbereitschaft, hervorragende Betreuung und die überaus produktive Arbeitsatmosphäre.

Frau Dipl. Biol. Patricia Schult-Dietrich möchte ich für die unschätzbare Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die herzliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. Marc Egelhofer, Herrn Dr. Roland Zahn, Frau Dr. Yvonne Fischer, Herrn Frank Vorpahl, Herrn Tefik Merrovzi danke ich für die gute Zusammenarbeit und die kollegiale Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Den übrigen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses in Frankfurt am Main möchte ich für die herzliche Aufnahme und die einmalige Arbeitsatmosphäre ausnahmslos danken.

Den Mitarbeitern der EUFETS AG danke ich für die freundliche Aufnahme und herzliche Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Kühliche und Frau Dr. Andrea Schilz für die guten Vorschläge bei der Niederschrift der Arbeit und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. Rainer Löw danke ich für die guten Diskussionen und die konkreten Hilfestellungen bei der Durchführung meiner Experimente. Frau Dipl. Biol. Birgit Stähle, Frau Dipl. Biol. Sonja Naundorf und Herrn Dr. Carsten Lindemann danke ich für eine gute Arbeitsatmosphäre und konstruktive Diskussionen.

Herrn Dr. Fabrizio Manca, Frau Dr. Giuseppina LiPira, Frau Laura Botone, Frau Manuela Fogli und Herrn Federico Ivaldi möchte ich für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe am Centro Biotecnologie Avanzate Genua, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Herrn Dr. Gerrit Koopman vom Biomedical Primate Research Center, BPRC, Rijswijk, danke ich herzlich für die Bereitstellung von Rhesusaffenblutproben und die sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Mathias Schweitzer und Herrn Dr. Koolibali vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen möchte ich ebenfalls für die Bereitstellung von Rhesusaffenblutproben danken.

Abschließend gilt mein außerordentlicher Dank meinen Eltern, für ihre uneingeschränkte, meiner Ehefrau Marion, für ihren ausnahmslosen, moralischen Rückhalt in schwierigen Zeiten und unserer Tochter Sophie Charlotte Carolin, für ihr Lachen.

7 Literatur

Adachi A., Gendelman H., E., Koenig S., Folks T., Willey R., Rabson A., Martin M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.

Aiken C., Konner J., Landau N.R., Lenburg M.E., Trono D. (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**:853-864.

Andersen D.C., Koch C., Jensen C.H., Skjodt K., Brandt J., Teisner B. (2004) High prevalence of human anti-bovine IgG antibodies as the major cause of false positive reactions in tow-site immunoassay based on monoclonal antibodies. *J. Immunoassay Immunochem.* **25**:17-30.

Ashkenazi A., Dixit V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:255-260.

Bahner I., Kearns K., Hao Q.-L., Smogorzewska E.M., Kohn D.B. (1996) Transduction of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. *J. Virol.* **70**:4352-4360.

Bahner I., Kearns K., Hao Q.-L., Smogorzewska E.M., Kohn D.B. (1997) Infection of human marrow stroma by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is both required and sufficient for HIV-1-induced hematopoietic suppression *in vitro*: Demonstration of gene modification of primary human stroma. *Blood* **90**:1787-1798.

Banda N.K., Bernier J., Kurahara D.K., Kurrle R., Haigwood N., Sekaly R.-P., Finkel T.H. (1992) Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **176**:1099-1106.

Barker E., Bossart K.N., Levy J.A. (1998) Differential effects of CD28 costimulation on HIV production by CD4⁺ cells. *J Immunol.* **161**:6223-6227.

Barré-Simoussi F. (2003) The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nature Med.* **9**:844-846.

Barré-Simoussi F., Cherman J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rosenbaum W., Montangier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.

Bauer G., Valdez P., Kearns K., Bahner I., Wen S.F., Zaia J.A., Kohn D.B. (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) replication after transduction of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ cells from HIV-1-infected donor using retroviral vectors containing anit-HIV-1 genes. *Blood* **89**:2259-2267.

Baum C., Düllmann J., Li Z., Fehse B., Meyer J., Williams D.A., von Kalle C. (2003) Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*, Blood First Edition Paper, prepublished online January 2, 2003; DOI 10.1182/blood-2002-07-2314

Berger C., Blau C.A., Clackson T., Riddell S.R., Heimfeld S. (2003) CD28 costimulation and immunoaffinity-based selection efficiently generate primary gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* **101**:476-484.

Berger E.A., Doms R.W., Fenyö E.-M., Korber B.T.M., Littman D.R., Moore J.P., Sattentau Q.J., Schuitemaker H., Doroski J., Weiss R.A. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature* **391**:240.

Berger E.A., Murphy P.M., Farber J.M. (1999) Chemokine receptors as HOV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Abbu. Rev. Immunol.* **17**:657-700.

Bieniasz P.D., Fridell R.A., Aramori I., Ferguson S.S.G., Caron M.G., Cullen B.R. (1997) HIV-1 induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO* **10**:2599-2609.

Bitton N., Gorochov G., Debre P., Eshhar Z. (1999) Gene therapy approaches for HIV-infection: Immunological strategies: use of T bodies and universal receptors to redirect cytolytic T-cells. *Frontiers in Bioscience* **4**:386-393.

Bonini C., Ferrari G., Verzelletti S., Servida P., Zappone E., Ruggieri L., Ponzoni M., Rossini S., Mavilio F Traversari C., Bordignon C. (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**:1719-1723.

Bonyhadi M.L., Moss K., Voytovitch A., Auten J., Kalfoglou C., Plavec I., Forestell S., Su L., Bohnlein E., Kaneshima H. (1997) RevM10-expressing T cells derived *in vivo* from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **71**:4707-4716.

Bretscher P. (1992) The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol. Today* **13**:74-76.

Brinkman K., Smeitink J.A., Romijn J.A., Reiss P. (1999) Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* **354**:1112-1115

Broder S. (1986) Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus (HTLV III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:1911-1915.

Brown H.E., Chen H., Engelman A. (1999) Structure-based mutagenesis of the human immunodeficiency virus type 1 DNA attachment site: effects on integration and cDNA synthesis. *J. Virol.* **73**:9011-9020.

Buchacher A., Predl R., Sturtzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Trauer C., Steindl F., Jungbauer A., Katinger H. (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins: Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:359-369.

Buchsacher G.L. Jr., Wong-Staal F. (2001) Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.* **12**:1013-1019.

Bunnell B.A., Metzger M., Byrne E., Donahue R.E. (1997) Efficient *in vivo* marking of primary CD4⁺ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector. *Blood* **89**:1987-1995.

Bunnell B.A., Muul L.M., Donahue R.E., Blaese M., Morgan R.A. (1995) High-efficient retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7739-7743.

Cameron D.W., Heath-Chiozzi M., Danner S., Cohen C., Kravcik S., Maurath C., Sun E., Henry D., Rode R., Potthoff A., Leonard J. (1998) Randomized placebo-controlled trial of zidovudine in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Zidovudine Study Group. *Lancet* **351**:543-549.

Capodici J., Kariko K., Weisman D. (2002) Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J. Immunol.* **169**:5196-5201.

Carr C.M., Chaudhry C., Kim P.S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10537-10541.

Carroll R.G., Riley J.L., Levine B.L., Feng Y., Kaushal S., Ritchey D.W., Bernstein W., Weislow O S., Brown C.R., Berger E.A., June C.H., St. Louis D.C. (1997) Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4⁺ T cells. *Science* **276**:273-276.

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.-L., Bousso P., Le Deist F., Fischer A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**:669-972.

Cavazzana-Calvo M., Thrasher A., Mavilio F. (2004) The future of gene therapy. *Nature* **427**:779-781.

Chan D.C., Chutkowski C.T., Kim P.S. (1998) Evidence that a prominent cavity in the coiled-coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15613-15617.

Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.

Chan D.C., Kim P.S. (1998) HIV-1 entry and inhibition. *Cell* **93**:681-684.

- Chu C.K., Schinazi R.F., Arnold B.H., Cannon D.L., Doboszewski B., Bhadti V.B., Gu Z. (1988) Comparative activity of 2',3'-saturated and unsaturated pyrimidine and purine nucleosides against HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Pharmacol.* **37**:3543-3548.
- Comoli P., Dilloo D., Hutchings M., Hoffma T., Heslop H.E. (1996) Measuring gene-transfer efficiency. *Nat. Med.* **2**:1280-1281.
- Condra J.H., Schleif W.A., Blahy O.M., Gabryelski L.J., Graham D.J., Quintero J.C., Rhodes A., Robbins H.L., Roth E., Shivaprakash M., et al. (1995) In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**:569-571.
- Conway B. (2000) Initial therapy with protease inhibitor-sparing regimens: evaluation of nevirapine and delavirdine. *Clin. Infect. Dis.* **30** Suppl 2:S130-134.
- Conway B., Shafran S.D. (2000) Pharmacology and clinical experience with amprenavir. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **9**:371-382.
- Cooper D., Penny R., Symonds G., Carr A., Gerlach W., Sun L.Q., Ely J. (1999) Clinical protocol: A marker study of therapeutically transduced CD4⁺ peripheral blood lymphocytes in HIV discordant identical twins. *Hum. Gene Ther.* **10**:1401-1421.
- Copeland K.F., Heeney J.L. (1996) T helper activation and human retroviral pathogenesis. *Microbiol. Rev.* **60**:722-742.
- D'Aquila R.T., Schapiro J.M., Brun-Vézinet F., Clotet B., Conway B., Demster L.M., Grant R.M., Johnson V.A., Kuitzkes D.R., Loverday C., Shafer R.W., Richman D.D. (2003) Drug resistance mutations in HIV-1. International AIDS Society-USA, *Topics HIV Med.* **11**:92-96.
- Debyser Z., Cherepanov P., Van Maele B., De Clercq E., Witvrouw M. (2002) In search of authentic inhibitors of HIV-1 integration. *Antivir. Chem. Chemother.* **13**:1-15.
- Deerks S.G., Wagner B., Anton P.A., Mitsuyasu R.T., Scadden D.T., Huang C., Macken C., Richman R.T., Christopherson C., June C.H., Lazar R., Broad D.F., Jalali S., Hege K.M. (2002) A phase II randomized study of HIV-specific T cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Molec. Ther.* **5**:788-797.
- Deml L., Bojak A., Steck S., Graf M., Wild J., Schirmbeck R., Wolf H., Wagner R. (2001) Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J. Virol.* **75**:10991-11001.
- Derdeyn C.A., Decker J.M., Sfakianos J.N., Wu X., O'Brien W.A., Ratner L., Kappes J.C., Shaw G.M., Hunter E. (2000) Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* **74**:8358-8367.

Derdeyn C.A., Decker J.M., Sfakianos J.N., Zhang Z., O'Brien W., Ratner L., Shaw G.M., Hunter E. (2001) Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp210 interaction with the coreceptor. *J. Virol.* **75**:8605-8614.

Dimitrov D.S. (1997) How do viruses enter cells? The HIV-1 coreceptors teach us a lesson of complexity. *Cell* **91**:721-730.

Dimitrov D.S. (2000) Cell biology of virus entry. *Cell.* **101**:697-702.

Dimitrov D.S., Xiao X., Chabot D.J., Broder C.C. (1998) HIV coreceptors. *J. Membrane Biol.* **166**:75-90.

Doms R.W., Moore J.P. (2000) HIV-1 membranes fusion: Target of opportunity. *J. Cell Biol.* **151**:F9-F13.

Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D., McDonagh K., Dunbar C., Goodman S., Agricola B., Byrne E., Raffeld M., Moen R., Bacher J., Zsebo K.M., Nienhuis A.W. (1992) Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176**:1125-1135.

Donahue RE, Dunbar CE (2001) Update on the use of nonhuman primate models for preclinical testing of gene therapy approaches targeting hematopoietic cells. *Gene Ther.* **5**:1575–1579.

Donazella B.J., Schols D., Lin S.W., et al. (1998) AMD-3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* **4**:72-77.

D'Souza M.P., Cairns J.S., Plaeger S.F. (2000) Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies. *JAMA* **284**:215-222.

Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. (1998) A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**:8463-8471.

Dustin M.L., Chan A.C. (2000) Signaling takes shape in the immune system. *Cell* **103**:283-294.

Ebeling S.B., Simonetti E.R., Borst H.P.E., Blok A., Schelen A.M., Braakman E., Ederveen J., Hagenbeek A. (2003) Human primary T lymphocytes have a low capacity to amplify MLV-based amphotropic RCR and the virions produced are largely noninfectious. *Gene Ther.* **10**:1800-1806.

Egelhofer M. (2004) Entwicklung neuer retroviraler Vektoren für die Gentherapie der HIV-Infektion. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Egelhofer M., Brandenburg G., Martinius H., Schult-Dietrich P., Melikyan G., Kunert R., Baum C., Choi I., Alexandrov A., von Laer D. (2004) Inhibition of human

- immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* **78**:568-575.
- Esté J.A, Cabrera C., Blanco J., Gutierrez A., Bridger G., Henson G., Clotet B., Schols D., de Clercq E. (1999) Shift of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolate from X4 to R5 and prevention of emergence of syncytium-inducing phenotype by blockade of CXCR4. *J. Virol.* **73**:5577-5585.
- Fauci A. (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Med.* **9**:839-843.
- Fehse B., Schade U.M., Li Z., Uhde A., Koch S., Goller B., Rüger R., Fehse N., Stockschröder M., Zander A.R. (1998) Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br. J. Haematol.* **102**:566-574.
- Ferrand C., Robinet E., Contassot E., Certoux J.-M., Lim A., Hervé P., Tiberghien P. (2000) Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: Influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the t cell receptor β chain hypervariable region repertoire. *Hum. Gene Ther.* **11**:1151-1164.
- Fischer A., Hacein-Bey S., Cavazzana-Calvo M. (2002) Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Nat. Rev.* **2**:615-621.
- Fischer A., Hacein-Bey S., Le Deist F., de Saint Basile G., Cavazzana-Calvo M. (2001) Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Immunity* **15**:1-4.
- Gallaher W.R., Ball J.M., Garry R.F., Griffin M.C., Montelaro R.C. (1989) A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**:703-706.
- Gallay P., Stitt V., Mundy C., Oettinger M., Trono D. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* **70**:1027-1032.
- Gallo S.A., Finnegan C.M., Viard M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat S.S., Puri A., Durell S., Blumenthal R. (2003) The HIV env-mediated fusion reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1614**:36-50.
- Galpin J.E., Casciato D.A., Richards S.B. (1994) A phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (TAF) (HIV-1IIIIBenvtransduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *Hum. Gene Ther.* **5**:997-1017.
- Gauduin M.C., Allaway G.P., Olson W.C., Weir R., Maddon P.J., Koup R.A. (1998) CD4-immunoglobulin G2 protects Hu-PBL-SCID mice against challenge by primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* **72**:3475-3478.
- Germain R.N. (2001) The T cell receptor for antigen: Signaling and ligand discrimination. *J. Biol. Chem.* **276**:35223-35226.

- Glushakova S., Münch J., Carl S., Greenough T., Sullivan J.L., Margolis L., Kirchhoff F. (2001) CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4⁺ T-cell depletion in human lymphoid tissue *ex vivo*. *J. Virol.* **75**:10113-10117.
- Gorny M.K., Zollar-Pazner S. (2000) Recognition by human monoclonal antibodies of free and complexed peptides representing the prefusogenic and fusogenic forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J. Virol.* **74**:6186-6192.
- Gorochov G., *et al.* (1998) Perturbation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell repertoire during progression to AIDS and regulation of CD4⁺ repertoire during antiviral treatment. *Nat. Med.* **4**:215-221.
- Gottfredsson M., Bohjanen P.R. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 as a target for gene therapy. *Frontiers in Bioscience* **2**:619-634.
- Gowda S.D., Stein B.S., Mohagheghpour N., Benike C.J., Engelman E.G. (1989) Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* **142**:773.
- Gray D.A. (1991) Insertional mutagenesis: Neoplasia arising from retroviral integration. *Cancer Investigation* **9**:295-304.
- Grzesiek S., Stahl S.J., Wingfield P.T., Bax A. (1996) The CD4 determinate for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**:10256-10261.
- Haas J., Park E.-C., Seed B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6**:315-324.
- Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., McCormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. (2003) LMO 2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-419.
- Haase A.T. (1999) Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4 cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:625-656.
- Hahn W.C., Weinberg R.A. (2002) Modeling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**:331-341.
- Hanazono Y., Brown K.E., Handa A., Metzger M.E., Heim D., Kurtzman G.J., Donahue R.E., Dunbar C.E. (1999) In vivo marking of rhesus monkey lymphocytes by adeno-associated viral vectors: Direct comparison with retroviral vectors. *Blood* **94**:2263-2270.

- Hanenberg H., Xiao X.L., Dilloo D., Hashino K., Kato I., Williams D.A. (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* **2**:876-882.
- He J., Chen Y., Farzan M., Choe H., Ohagen A., Gartner S., Busciglio J., Yang X., Hofmann W., Newman W., Mackay C.R., Sodroski J., Gabuzda D. (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**:645-649.
- Henkel J. (2004) Attacking AIDS with a 'cocktail' therapy. http://www.fda.gov/fdac/features/1999/499_aids.html
- Heim D.A., Hanazono, Y., Girir N., Wu T., Childs R., Sellers S.E., Muul L., Agricola B.A., Metzger M., Donahue R.E., Tisdale J.F., Dunbar C.E. (2000) Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol. Ther.* **1**:533-544.
- Hildinger M., Abel K.L., Ostertag W., Baum C. (1999) Design of a 5' untranslated sequence in retroviral vectors developed for medical use. *J. Virol.* **73**:4083-4089.
- Hildinger M., Dittmar M., Schult-Dietrich P., Fehse B., Schnierle B.S., Thaler S., Stiegler G., Welker R., von Laer D. (2001) Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol.* **75**:3038-3042.
- Hughson F.M. (1997) Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr. Biol.* **7**:3864-3869.
- Hunter E., gp41, a multifunctional protein involved in HIV entry and pathogenesis. <http://hiv-web.lanl.gov/HTML/reviews/gp41.html>.
- Ji H., Shu W., Burling F.T., Jiang S., Lu M. (1999) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the gp41 core: Role of a conserved hydrophobic cavity in membranes fusion. *J. Virol.* **73**:8578-8586.
- June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M., Thompson C.B. (1994) The B7 and B28 receptor families. *Immunol. Today* **15**:321-331.
- Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. (2001) Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med.* **7**:33-40.
- Kempf D.J., King M.S., Bernstein B., Cernohous P., Bauer E., Moseley J., Gu K., Hsu A., Brun S., Sun E. (2004) Incidence of resistance in a double-blind study comparing lopinavir/ritonavir plus stavudine and lamivudine to nelfinavir plus stavudine and lamivudine. *J. Infect. Dis.* **189**:51-60.
- Kiem H.P., Sellers S., Thomasson B., Morris T.B., Tisdale J.F., Horn P.A., Hematti P., Adler R., Kuramoto K., Calmels B., Bonifacio A., Hu J., von Kalle C., Schmitd M., Sorrentino B., Nienhuis A., Blau C.A., Andrews R.G., Donahue R.E., Dunbar C.E. (2004) Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: No progression to clonal hemoatopoiesis or leukemia. *Mol. Ther.* **9**:389-395.

Kilby J.M., Hopkins S., Venetta T., DiMassimo B., Cloud G.A., Lee J.Y., Alldrege L., Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Matthews T., Johnson M.R., Nowak M.A. Shaw G.M., Saag M.S. (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Med.* **4**:1302-1307.

Kilby J.M., Lalezari J.P., Eron J.J., et al. (2002) The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**:685-693.

Kimizuka F., Taguchi Y., Ohdate Y., Kawase Y., Shimojo T., Hashino K., Sekiguchi K., Titani K. (1991) Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **110**:284-291.

Kimpton J., Emerman M. (1992) Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated 3-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**:2232-2239.

Kinsella T.M., Nolan G.P. (1996) Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* **7**:1405-1413.

Klebba C., Ottmann O.G., Scherr M., et al. (2000) Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective advantage on CD4+ T cells *in vitro*. *Gene Ther.* **7**:408-416.

Kliger Y., Shai Y (2000) Mode action of an antiviral peptide from: Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J. Mol. Biol.* **295**:163-168.

Kohn D.B., Bauer G., Rice C.R., Rothschild J.C., Carbonaro D.A., Valdez P., Hao Q.-I., Zhou C., Bahner I., Kearns K., Bordy K., Fox S., Haden E., Wilson K., Salata C., Dolan C., Wetter C., Aguilar-Cordova E., Chruch J. (1999) A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a *rev*-responsive element decoy gene into CD34⁺ cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* **94**:368-371.

Kohn D.B. (2000) Clinical Protokoll: Transduction of CD34+ cells from bone marrow of HIV-1 infected children: Comparative gene marking by an RRE decoy gene and a neutral gene. *Hum. Gene Ther.* **11**:1577-1590.

Kolson D.L., Collman R., Hrin R., Balliet J.W., Laughlin M., McGann K.A., Debouck C., Gomez-Scarano F. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Tat activity in human neuronal cells uptake and *trans*-activation. *J. Gen. Virol.* **75**:1927-1934.

Korin Y.D., Zack J.A. (1998) Progression to the G1b phase of cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J. Virol.* **72**:3161-3168.

Krosi J., Baban S., Krosi G., Rozenfeld S., Largman C., Sauvageau G. (1998) Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene* **16**:3403-3412

Kuhlcke K., Fehse B., Schilz A., Loges S., Lindemann C., Ayuk F., Lehmann F., Stute N., Fauser A.A., Zander A.R., Eckert H.G. (2002) Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol. Ther.* **5**:473-478.

Kustikova O.S., Wahlers A., Kuhlcke K., Stahle B., Zander A.R., Baum C., Fehse B. (2003) Dose finding with retroviral vectors: Correlation of retroviral vector copy number in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* **102**:3934-3937.

Labouyrie E., Dubus P., Groppe A., et al. (1999) Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J. Pathol.* **154**:405-415.

Labrijn A.F., Parren P.W.H.I. (2000) Neutralizing epitopes of HIV-1. HIV sequence database. <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/articles/parren99/parren99.html>.

Lalezari J.P., DeJesus E., Northfelt D., et al. (2003) A controlled Phase II trial assessing three doses of enfuvirtid (T-20) in combination with abacavir, amprenavir, ritonavir, and efavirenz in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-naive HIV-infected adults. *AIDS* **17**:691:698.

Laufs S., Gentner B., Nagy Z., Jauch A., Benner A., Naundorf S., Kuehlcke K., Schiedlmeier B., Ho A.H., Zeller W.J., Fruehauf S. (2003) Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* **101**:1284-1289.

Letvin N.L., Walker B.D. (2003) Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infection. *Nature Med.* **9**:861-866.

La Villette D., Boson B., Russell S.J., Cosset F.-L. (2001) Activation of membrane fusion by murine leukemia viruses is controlled in *cis* or in *trans* by interaction between the receptor-binding domain and a conserved disulfide loop of the carboxy terminus of the surface glycoprotein. *J. Virol.* **75**:3685-3695.

Levine B., Bernstein W.B., Aronson N.E., Schlienger K., Cotte J., Perfetto S., Hemphries M.J., Ratto-Kim S., Brix D.L., Landay A., Carroll R.G., June C.H. (2002) Adoptive transfer of costimulated CD4⁺ T cells induces expansion of peripheral T cells and decreased CCR5 expression in HIV infection. *Nat. Med.* **8**:57-53.

Levine B.L., Bernstein W.B., Connors M., Graighead N., Lindsten T., Thompson G.B., June C.H. (1997) Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4⁺ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *J Immunol.* **159**:5921-5930.

Levine B.L., Cotte J., Small C.C., Carroll R.G., Riley J.L., Bernstein W.B., Van Epps D.E., Hardwick R.A., June C.H. (1998) Large-scale production of CD4⁺ T cells from HIV-1 infected donors after CD3/CD28 costimulation. *J. Hematother.* **7**:437-448.

Levine B.L., Ueda Y., Craighead N., Huang M.L., June C.L. (1995) CD28 ligands CD80(B7-1) and CD86(B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4⁺ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. *Int. Immunol.* **7**: 891-904.

Lewis P.F., Emerman M. (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:510-516.

Li Pira G., Bottone L., Fenoglio D., Terranova P., Pontali E., Ivaldi F., Del Galdo F., Mortara L., Loregian A., Palù G., Kunkl A., Accolla R., De Palma R., Manca F. (2001) Analysis of the antigen specific repertoires in HIV infection. *Immunol. Lett.* **79**:85-91.

Li Pira G., Fenoglio D., Bottone L., Terranova P., Pontali E., Caroli E., Seri M., Cailliez J.C., Koopman G., Accolla R., del Galdo F., Abbate G., de Palma R., Manca F. (2002) Preservation of clonal heterogeneity of the *Pneumocystis carinii*-specific CD4 T cell repertoire in HIV infected, asymptomatic individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **128**:155-162.

Li Z., Düllmann J., Schiedelmeier B., Schmidt M., von Kalle C., Meyer J., Forster M., Stocking C., Wahlers A., Frank O., Ostertag W., Kühlcke K., Eckert H.-G., Fehse B., Baum C. (2002) Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**:497.

Lohrengel S., Hermann F., Hagmann I., Oberwinkler H., Scrivano L., Hoffmann C., von Laer D., Dittmar M.T. (2005) Determination of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J. Virol.* **79**:10237-10246.

Lowsky R., DeCoteau J.F., Reitmair A.H., Ichinohasama R., Dong W.-F., Xu Y., Mak T.W., Kadin M.E., Minden M.D. (1997) Defects of the mismatch repair gene MSH2 are implicated in the development of murine and human lymphoblastic lymphomas and are associated with the aberrant expression of rhombotin-2 (LMO-2) and TAL-1 (SCL). *Blood* **89**: 2276-2282.

Lu M., Stoller M.O., Wang S., Liu J., Fagan M.B., Nunberg J.H. (2001) Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J. Virol.* **75**:11146-11156

Lusso P., Cocchi F., Balotta C., Markham P.D., Louie A., Farci P., Pal R., Gallo R.C., Reitz M.S. jr. (1995) Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4⁺ T-cell clone (PM-1): Failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* **69**:3712-3720.

Morishita K., Parker D.S., Mucenski et al. (1988) Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in Il-3- dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* **54**: 831-840.

Marozsan A.J., Kuhmann S.E., Morgan T., Herrera C., Rivera-Troche E., Xu S., Baroudy B.M., Strizki J., Moore J.P. (2005) Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D). *Virology* **338**:182-199.

- MacNeill E.C., Hanenberg H., Pollok K.E., van der Loo J.C.M., Bierhuizen M.F.A., Wagemaker G., Williams D.A. (1999) Simultaneous infection with retroviruses pseudotyped with different envelope proteins bypasses viral receptor interference associated with colocalization of gp70 and target cells on fibronectin CH-296. *J. Virol.* **73**:3960-3967.
- Matsugi T., Morishita K., Ihle J.N. (1990) Identification, nuclear localization, and DNA-binding activity of the zinc finger protein encoded by the Evi-1 myeloid transforming gene. *Mol. Cell Biol.* **10**:1259-1264.
- Manca F., Fenoglio D., Franchin E., Saverino E., Li Pira G., Buffa F., Bignardi D., Del Pup L., Palù G. (1997) Anti-HIV genetic treatment of antigen-specific human CD4⁺ lymphocytes for adoptive immunotherapy of opportunistic infections in AIDS. *Gene Ther.* **4**:1216-1224.
- McCoig C., Van Dyke G., Chou C.S., Picker L.J., Ramilo O., Vitetta E.S. (1999) An anti-CD45RO immunotoxin eliminates T cells latently infected with HIV-1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11482-11485.
- McCune J.M. (2001) The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**:974-979.
- McMichael A.J., Hanke T. (2003) HIV vaccines 1983-2003. *Nature Med.* **9**:874-880.
- Melikyan G.B., Markosyan R.M., Hemmati H., Delmedico M.K., Lambert D.M., Cohen F.S. (2000) Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into the six-helix bundle, not the bundle configuration, induce membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**:413-423.
- Miller A.D., Garcia J.V., von Suhr N., Lynch C.M., Wilson C., Eiden M.V. (1991) Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **65**:2220-2224.
- Miller A.D. (1996) Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11407-11413.
- Miller D.G., Adam M.A., Miller A.D. (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.* **10**:4239-4242. *EMBO J.* **12**:2099-2108.
- Mitsuyasu R.T., Anton P.A., Deeks S.G., Scadden D.T., Connick E., Down M.T., Bakker A., Roberts M.R., June C.H., Jalali S., Lin A.A., Pennathur-Das R., Hege K.M. (2000) Prolonged survival and tissue trafficking following adaptive transfer of CD4ζ gene-modified autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* **96**:785-793.
- Modrow S., Flake D. (1998) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moolten F.L., Cupples L.A. (1992) A model for predicting the risk of cancer consequent to retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **3**:479-486.

Moore J.P., Stevenson M. (2000) New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:40-49.

Morgan R.A., Looney D.J., Muenchau D.D., Wong-Staal F., Gallo R.C., Anderson W.F. (1990) Retroviral vectors expressing soluble CD4: a potential gene therapy for AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:183-191.

Morgan R.A., Baler-Bitterlich G., Ragheb J.A., Wong-Staal F., Gallo R.C., Anderson W.F. (1994) Further evaluation of soluble CD4 as an anti-HIV type 1 gene therapy: demonstration of protection of primary human peripheral blood lymphocytes from infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1507-1515.

Movassagh M., Boyer O., Burland M.-C., Leclercq V., Klatzmann D., Lemoine F.M. (2000) Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further *in vitro* selection. *Blood* **89**:1987-1995.

Muster T., Steindl F., Trkola A., Klima A., Himmler G., Rucker F., Katinger H. (1993) A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**:6642-6647.

Nabel G.J. (2001) Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* **410**:1002-1007.

Naldini L., Blomer U., Galay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263-267.

New treatments for HIV infection: Prolonging and improving life. <http://www.niaid.nih.gov/publications/discovery/hiv.htm>

Ono Y., Fukuhara N., Yoshie O. (1998) TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by the action as cofactors for GATA3. *Mol. Cell. Biol.* **18**:6939-6950.

Peisajovich S.G., Gallo S.A., Blumenthal R., Shai Y. (2003) C-terminal octylation rescues an inactive T20 mutant: implications for the mechanism of HIV/SIV-induced membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **278**:21012-21017.

Plavec I., Agarwal M., Ho K.E., Pineda M., Auten J., Baker H., Matsuzaki H., Escaich S., Bonyhardi M., Böhnlein E. (1997) High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS. *Gene Ther.* **4**:128-139.

Pollok K.E., Hanenberg H., Noblitt T.W., Schroeder W.L., Kato I., Emanuel D., Williams D.A. (1998) High-efficient gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T-lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J. Virol.* **72**:4882-4892.

Popovic M., Sarngadharan M.G., Read E., Gallo R.C. (1984) Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.

Powell S.K., Kaloss M., Burimski I., Weaver L., Long Z., Lyons R., McGarrity G.J., Otto E. (1999) *In vitro* analysis of transformation potential associated with retroviral vector insertion. *Hum. Gene Ther.* **10**:2123-2132.

Rabbitts T.H., Bucher K., Chung G., Grutz G., Warren A., Yamada Y. (1999) The effect of chromosomal translocations in acute leukemia: The LMO2 paradigm in transcription and development. *Cancer Research.* **59**:1794-1798.

Ranga U., Woffendin C., Verma S., Xu L., June C.H., Bishop D.K., Nabel G.J. (1998) Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1201-1206.

Ramalho-Santos J., de Lima M.C.P. (1998) The influenza hemagglutinin: a model protein in the study of membrane fusion. *Biochem. Et Biophys. Acta* **1376**:147-154.

Ravid K., Licht J. (2001) Transcription factors: Normal and malignant development of blood cells. (*Wiley, New York*) pp.393-408.

Reeves J.D., Gallo S.A., Ahmad N., Miamidian J.L., Harvey P.E., Sharron M., Pöhlmann S., Sfakianos J.N., Derdeyn C.A., Blumenthal R., Hunter E., Doms R.W. (2002) Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:16249-16254.

Richman D.D. (2001) HIV chemotherapy. *Nature* **410**:995-1001.

Ricketts M.H., Levinson A.D. (1988) High-level expression of c-H-ras1 fails to fully transform Rat-1 cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**:1460-1468.

Riley J.L., Carroll R.G., Levine B.L., Bernstein W., St. Louis D.C., Weislow O.S., June C.H. (1997) Intrinsic resistance to T cell infection with HIV type 1 induced by CD28 costimulation. *J. Immunol.* **158**:5545-5553.

Riley J.L., Levine B.L., Craighed N., Francomano T., Kim D., Carroll R.G., June C.H. (1998) Naive and memory CD4 T cells differ in their susceptibilities to human immunodeficiency virus type 1 infection following CD28 costimulation: implications for transmission and pathogenesis. *J. Virol.* **72**:8273-8280.

Rimsky L.T., Shugars D.C., Matthews T. J. (1998) Determinants for human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* **72**:986-993.

Rizzuto C., Sodroski J. (2000) Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:741-749.

- Rizzuto C.D., Wyatt R., Hernández-Ramos N., Sun Y., Kwong P.D., Hendrickson W.A., Wyatt A., Sodroski J. (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-1953.
- Robbins B.L., Srinivas R.V., Kim C., Bischofberger N., Fridland A. (1998) Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:612-617.
- Roberts M.R., Qin L., Zhang D., Smith D.H., Tran A.-C., Dull T.J., Croopman J.E., Capon D.J., Byrn R.A., Finer M.H. (1994) Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8⁺ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* **84**:2878-2889.
- Roe T., Reynolds T.C., Yu G., Brown P.O. (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO. J.* **12**:2009-2105.
- Rother R.P., Squinto S.P., Mason J.M., Rollins S.A. (1995) Protection of retroviral vector particles in human blood through complement inhibition. *Hum. Gene Ther.* **1**:15-30.
- Rosenberg S.A., Aebersold P.M., Crnetta K., Kasid A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.H., Miller A.D., Blaese M.D., Anderson W.F. (1990) Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Eng. J. Med.* **323**:570-578.
- Rübsamen-Waigmann H., Willems W.R., Bertram U., von Briesen H. (1989) Reversal of HIV-phenotype to fulminate replication on macrophages in perinatal transmission. *Lancet* 1155-1156.
- Saavedra-Lozano J., McCoig C., Xu J., Cao Y., Keiser P., Ghetie V., Siliciano R.F., Siliciano J.D., Picker L.J., Ramilo O., Vitetta E.S. (2002) An anti-CD45RO immunotoxin kills latently infected human immunodeficiency virus (HIV) CD4 T cells in the blood of HIV-positive persons. *J. Infect. Dis.* **185**:306-314.
- Schambach A., Wodrich H., Hildinger M., Bohne J., Kraeusslich H.G., Baum C. (2000) Context-dependence of different modules for post-transcriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol. Ther.* **2**:435-445.
- Schols D., Esté J.A., Henson G., De Clerq E. (1997) Bicyclam, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fudin/CXCR-4. *Antiviral Res.* **35**:147-156.
- Schröder A.R.W., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R., Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-529.
- Schumann G., Hermankova M., Cannon K., Mankowski J.L., Boeke J.D. (2001) Therapeutic effect of a Gag-nuclease fusion protein against retroviral infection in vivo. *J Virol.* **75**:7030-7041.

- Schwartz O., Marechal V., La Gall S., Lemonnier F., Heard J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**:338-342.
- Selvaggi T.A., Walker R.E., Fleisher T.A. (1997) Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* **89**:776-779.
- Sham H.L., Kempf D.J., Molla A., Marsh K.C., Kumar G.N., Chen C.M., Kati W., Stewart K., Lal R., Hsu A., Betebenner D., Korneyeva M., Vasavanonda S., McDonald E., Saldivar A., Wideburg N., Chen X., Niu P., Park C., Jayanti V., Grabowski B., Granneman G.R., Sun E., Japour A.J., Leonard J.M., Plattner J.J., Norbeck D.W. (1998) ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3218-3224.
- Singh M., Berger B., Kim P.S. (1999) Learn Coil-VMF: Computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins. *J. Mol. Biol.* **290**:1031-1041.
- Sista P., Melby T., Greenberg S., et al. (2002) Characterization of baseline and treatment emergent resistance to T-20 (enfuvirtide) observed in Phase II clinical trials: substitutions in gp41 amino acids 36-45 and enfuvirtide susceptibility of virus isolates. *Antiviral Ther.* **7**:16-17.
- Small M.B., Hay N., Schwab M., Bishop J.M. (1987) Neoplastic transformation by human gene N-myc. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1638-1645.
- Starr-Spires L.D., Collman R.G. (2002) HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. *Clin. Lab. Med.* **22**:681-701.
- Staszewski S., Morales-Ramirez J., Tashima K.T., Rachlis A., Skiest D., Stanford J., Stryker R., Johnson P., Labriola D.F., Farina D., Manion D.J., Ruiz N.M. (1999) Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N. Engl. J. Med.* **341**:1865-1873
- Stephenson J. (2002) Researchers explore new anti-HIV agents. *JAMA* **287**:1635-1637.
- Stitz E., Buhholz C.J., Engelstädter M., Uckert W., Bloemer U., Schmitt I., Cichutek K. (2000) Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**:16-20.
- Strizki J.M., Xu S., Wagner N.E., Wojcik L., Liu J., Hou Y., Endres M., Palani A., Shapiro S., Clader J.W., Greenlee W.J., Tagat J.R., McCombie S., Cox K., Fawzi A.B., Chou C.C., Pugliese-Sivo C., Davies L., Moreno M.E., Ho D.D., Trkola A., Stoddart C.A., Moore J.P., Reyes G.R., Baroudy B.M. (2001) SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is

a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12718-12723.

Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E. (1990) Overexpression of TAR sequence renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell*. **63**:601-608.

Trkola A., Ketas T.J., Nagashima K.A., Zhao L., Cilliers T., Morris L., Moore J.P., Maddon P.J., Olson W.C. (2001) Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J. Virol.* **75**:579-588.

Trkola A., Kuhmann S.E., Strizki J.M., Maxwell E., Ketas T., Morgan T., Pugach P., Xu S., Wojcik L., Tagat J., Palani A., Shapiro S., Clader J.W., McCombie S., Reyes G.R., Baroudy B.M., Moore J.P. (2002) HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:395-400.

Trkola A., Pomales A.B., Yuan H., Korber B., Maddon P.J., Allaway G.P., Katinger H., Barbas C.F. 3rd, Burton D.R., Ho D.D., et al. (1995) Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* **69**:6609-6617.

Trono D., Freiberg M.B., Baltimore D. (1989) HIV-1 gag mutants can dominantly interfere with the replication of wild-type virus. *Cell* **59**:113-120.

Tuschong L., Soenen S.L., Blaese R.M., Candotti F., Muul L.M. (2002) Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **13**:1605-1610.

Valle M.T., Megiovanni M., Merlo A., Li Pira G., Bottone L., Angelini G., Bracci L., Lozzi L., Huycen K., Manca F. (2001) Epitope focus, clonal composition and Th1 phenotype of the human CD4 response to the secretory mycobacterial antigen Ag85. *Clin. Exp. Immunol.* **123**:226-232.

Vandendriessche T., Chuah M.K.L., Chiang L., Chang H.-K., Ensoli B., Morgan R.A. (1995) Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 isolates in primary CD4+ T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes. *J. Virol.* **69**:4045-4052.

Vanin E.F., Kaloss M., Broscius C., Nienhuis A.W. (1994) Characterization of replication-competent retroviruses from nonhuman primates with virus-induced T cell lymphomas and observations regarding the mechanism of oncogenesis. *J. Virol.* **68**:4241-4250.

Vocero-Akbani A.M., Heyden N.V., Lissy N.A., Ratner L., Dowdy S.F. (1999) Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activates caspase-3 protein. *Nat. Med.* **5**:29-33.

von Laer D., Brandenburg G. (2001) Gene therapy for HIV infection by 'intracellular immunization' with antiviral genes. *AIDS Rev.* **3**:61-69.

von Laer D., Hasselmann S., Hasselmann K. (2005) Impact of gene-modified T cells on HIV infection dynamics. *J. Theor. Biol.* [Epub ahead of print].

Walker R.E., Bechtel C.M., Natarajan J., Baseler M., Hege K.M., Metcalf J.A., Stevens R., Hazen A., Blaes R.M., Chen C.C., Leitman S.F., Palensky J., Wittes J., Davey R.T. Jr., Falloon J., Polis M.A., Kovacs J.A., Broad D.F., Levine B.L., Roberts M.R., Masur H., Lane H.C. (2000) Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood.* **96**:467-474.

Weidhaas J.B., Angelichio E.L., Fenner S., Coffin J.M. (2000) Relationship between retroviral DNA integration and gene expression. *J. Virol.* **74**:8382-8389.

Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. (2002) Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **46**:1896-1905.

Wild C., Oas T., McDanal C., Bolognesi D., Matthews T. (1992) A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: Correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10537-10541.

Wild C.T., Shugars D., Greenwell T.K., McDanal C.B., Matthews T.J. (1994) Peptides corresponding to a predicted α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9770-9774.

Woffendin C., Ranga U., Yang Z.-Y., Xu L., Nabel G.J. (1996) Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2889-2894.

Yang Q.-E. (2004) Eradication of HIV in infected patients: Some potential approaches. *Med. Sci. Monit.* **10**:155-165.

Zheng A., Niefirth K., Lang J.-M., *et al.* (2002) Pharmacokinetics of plasma enfuvirtide after subcutaneous administration to patients with human immunodeficiency virus: Inverse Gaussian density absorption and 2-component disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **72**:10-19.

Zhang D., Murakim A., Johnson R.P., Sui J., Cheng J., Bai J., Marasco W.A. (2003) Optimization of *ex vivo* activation and expansion of macaque primary CD4-enriched peripheral blood mononuclear cells for use in anti-HIV immunotherapy and gene therapy strategies. *J. Acquir. Immuno. Defic Syndr.* **32**:245-254.

Zhao X., Sing M., Malashkevich V.N., Kim P.S. (2000) Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14172-14177.

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., Hope T.J. (1999) Woodchuck hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**:2886-2892.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines HIV-Virions.	4
Abb. 2: Replikationszyklus des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1).	5
Abb. 3: Struktur des gp41-Glycoproteins und der davon abgeleiteten inhibitorischen Peptide.	8
Abb. 4: Verlauf der Membranfusion.	9
Abb. 5: Der retrovirale Vektor M87o exprimiert ein antivirales Gen der Klasse I. ...	18
Abb. 6: Retroviren die eine Zelle infizieren integrieren ihr Genom in das Zellgenom und exprimieren hiervon die Proteine, die zur Herstellung von Nachkommenviren gebraucht werden.	35
Abb. 7: Darstellung des retroviralen Vektors M87o.	41
Abb. 8: Zellen von PM-1 exprimieren das membranverankerte, inhibitorische Peptid C46 auf ihrer Oberfläche.	42
Abb. 9: M87o hemmt effizient die Replikation von HIV-1. PM-1 Zellen wurden mit M87o transduziert, sortiert und anschließend mit HIV-1NL4-3 infiziert (MOI = 0,001).	43
Abb. 10: Hemmversuch mit T-20-resistenten Pseudotypviren.	44
Abb. 12: Periphere Blutlymphozyten exprimieren nach Transduktion mit M87o das inhibitorische Peptid auf ihrer Oberfläche.	44
Abb. 13: M87o-positive Zellen reicherten sich in Anwesenheit von HIV-1D117II an.	45
Abb. 14: Verlauf der HIV-Replikation, bestimmt aus dem p24-Gehalt im Kulturmedium.	45
Abb. 15: M87o schützt CD4+-Zellen.	46
Abb. 16: Normale Rat-1-Zellen, bilden in Weichagar keine Kolonien.	48
Abb. 17: Rat-1-Zellen wurden durch Transduktion mit M87o nicht transformiert.	49
Abb. 18: Die prozentuale Zusammensetzung der CD3+-Subpopulationen blieb unbeeinflusst.	50
Abb. 19: M87o hatte keinen Einfluss auf die Proliferation primärer T-Zellen.	51
Abb. 20: Titration von anti-CD3 SP34 und FN-18.	53
Abb. 21: Vergleichende Darstellung der Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 SP34 (10 µg ml ⁻¹) in Anwesenheit von IL-2 (100 U ml ⁻¹) bzw. in Anwesenheit von anti-CD28 Leu28 (1 µg ml ⁻¹).	54
Abb. 22: Die Proliferation der Makakenzellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen autologen, hitzinaktivierten Serums folgte einer Sättigungskurve.	55

Abb. 23: Lymphozytenkulturen wurden mit dem etablierten Protokoll stimuliert und anschließend transduziert.	56
Abb. 24: Vergleichende Gegenüberstellung der Gentransferraten in An- bzw. Abwesenheit von RetroNectin..	57
Abb. 25: Nachweis von anti-M87o-Antikörpern in Seren der Versuchstiere mittels Western-Blot-Technik.....	61
Abb. 26: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von CD8-Depletionsversuchen mit CD8-Beads der Firmen Dynal und Miltenyi.	63
Abb. 27: Vergleichende Darstellung der mittleren Wachstumskurven (n = 3).....	65
Abb. 28: Vergleichende Darstellung der mittleren Verteilung (n = 3) der CD3+/CD4+ Zellen im Verlauf der Kultur.....	66
Abb. 29: Vergleichende Darstellung der Aktivierungsmarkerexpression der CD4+ Zellen nach elftägiger Kultur.....	66
Abb. 30: Gegenüberstellung der mittleren Gentransferraten (n = 2) nach Stimulation mit OKT-3/IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads/IL-2.....	67
Abb. 31: Vergleichende Darstellung der mittleren Transduktionseffizienz (n = 2) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von CD3/CD28-Beads.....	68
Abb. 32: Das Niveau der in vitro-Replikation korrelierte nicht mit der Ausgangsviruslast.	69
Abb. 33: Vergleichende Darstellung der HIV-1-Replikation mit und ohne antiviralen Medikamentencocktail.....	72
Abb. 34: Umsetzung des vorgeschlagenen Protokolls im Versuchsmaßstab. Wachstumsverlauf von T-Zellen HIV-1-positiver Spender.	74
Abb. 35: Gegenüberstellung der mittleren Expansionsfaktoren (n = 3).	75
Abb. 36: Vergleichende Darstellung der Zusammensetzung der Zellpopulationen (Mittelwerte, n = 3) am Erntetag (Tag 10).	75
Abb. 37: Zusammenstellung der mittleren Transduktionsraten.....	76
Abb. 38: Phänotypische Charakterisierung des Spenderapheresates.	78
Abb. 39: Wachstumsverläufe im large scale-Experiment (n = 3).	79
Abb. 40: Vergleichende Darstellung der Gentransferraten der drei untersuchten large scale-Experimente.....	79
Abb. 41: Vergleichende Darstellung der phänotypischen Zusammensetzung der Zellpopulationen zu Beginn des Prozesses und im Endprodukt.....	80
Abb. 41: Der retrovirale Vektor M87o exprimiert ein antivirales Gen der Klasse I. ...	82

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenstellung gentherapiespezifischer Nebenwirkungen, die grundsätzlich bei der Anwendung in primären Lymphozyten zu erwarten sind. (aus BAUM <i>et al.</i> , 2003, modifiziert).....	47
Tab. 2: Ergebnis der phänotypischen Charakterisierung der Zellpopulationen nach Transduktion. Wiedergegeben sind die mittleren prozentualen Anteile der jeweiligen Population. (n = 3).....	50
Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der Zellpopulation nach Transduktion. (n. b. = nicht bestimmt).....	58
Tab. 4: Chronologische Aufstellung der qPCR-Wiederfindungsraten. (n.d. = nicht detektierbar, (2/3) = zwei von drei qPCR-Ansätzen positiv, (1/3) = einer von drei Ansätzen positiv).....	60
Tab. 5: Zusammenstellung der ermittelten IC50-Werte der getesteten antiretroviralen Medikamente.....	70
Tab. 6: Zusammenstellung der ermittelten IC0-Werte ausgesuchter antiviraler Medikamente. In den angegebenen Konzentrationen tritt keine Hemmung der Transduktion mit M87o auf.....	71
Tab. 7: Aufstellung der p24-Konzentrationen, wie sie mittels ELISA in zellfreien Kulturüberständen am Erntetag bestimmt wurden. Die eingesetzten AT inhibierten die Virusreplikation vollständig. In den Kulturen von S 1 konnte keine HIV-1-Replikation nachgewiesen werden.....	76
Tab. 8: Aufstellung der Splittfaktoren in Abhängigkeit von der gemessenen Zelldichte.....	77
Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellzahlbestimmung, der Gentransferraten, der CD3/CD4-Bestimmungen und der Anzahl an Zielzellen, die generiert werden konnten.....	80
Tab. 10: Vergleichende Zusammenstellung der charakteristischen Kenndaten der drei large scale-Experimente. Die Spezifikation konnte in allen Experimenten erreicht werden. (n. n. = nicht nachweisbar, Nachweigrenze 8,7 pg ml ⁻¹).....	98

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	antigen presenting cell, antigenpräsentierende Zelle
AT	Antivirale Therapeutika, Medikamentencocktail zur Inhibierung der HIV-Replikation <i>in vitro</i> , bestehend aus Amprenavir (0,33 μM), Nelfinavir (1,0 μM) und T-20 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)
ATP	Adenosintrisphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute, Zerfallseinheiten pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometer
FKS	Fötales Kälberserum
GMP	Good Manufacturing Practice, Gute Herstellpraxis
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
ID-No.	Identification number, Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
LTR	Long terminal repeat, endständige Sequenzwiederholung der Retroviren
mg	Milligramm, $1 \cdot 10^{-3}$ Gramm
μg	Mikrogramm, $1 \cdot 10^{-6}$ Gramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Murines Leukämievirus
MOI	Multiplicity of infection, Maß für die Anzahl infektiöser Partikel
mRNR	messenger RNA, Boten-Ribonucleinsäure
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, periphere mononucleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Picogramm
RCR	replikationskompetentes Retrovirus
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV-40	Simian Virus Typ 40
Tab.	Tabelle
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit, enzymatische Aktivitätseinheit
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute

10.2 Publikationsliste

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

- EDELHOFER M, BRANDENBURG G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, MELIKYAN G, KUNERT R, BAUM C, CHOI I, ALEXANDROV A, VON LAER D (2004) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* **78**:568-575.
- HERMANN FG, MARTINIUS H, EDELHOFER M, GIROGLOU T, ZAHN R, SCHULT-DIETRICH P, ALEXANDROV A, DIETRICH U, BAUM C, VON LAER D (2005) Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored C-peptides derived from HIV-1 gp41. *In Vorbereitung.*

Vorträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen:

- EDELHOFER M, MARTINIUS H, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, THALER S, SCHNIERLE BS, VON LAER D (2001) Retroviral Vectors for Inhibition of HIV Entry and Replication. Oral presentation; 9th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy Antalya, 02.-04.11.2001.
- VON LAER D, ALEXANDROV A, BRANDENBURG G, BAUM C, EDELHOFER M, FEHSE B, KÜHLCKE K, VAN LUNZEN J, LI PIRA G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F (2002) Gene Therapy for HIV Infection. Oral presentation; 7th European Conference on Experimental AIDS Research, Genoa, Italy, 8.-11.06.2002.
- BRANDENBURG G, MARTINIUS H, EDELHOFER M, SCHULT-DIETRICH P, TARIMORADI S, CHOI I, HERMANN F, KOOPMANN G, SCHIEDLMEIER B, BAUM C, SCHILZ A, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Gene therapy for HIV infection with entry inhibitors. Oral presentation; 9. Deutscher und 14. Österreichischer AIDS-Kongress Hamburg, 14.-17.05.2003.

Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen:

- NOWOCK J, MARTINIUS H, EDELHOFER M, SCHULT-DIETRICH P, SCHNIERLE BS, THALER S, DITTMAR MT, VON LAER D (2001) A Membrane-Anchored Peptide Inhibits HIV Entry. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Dresden, 14.-17.03.2001.
- NOWOCK J, MARTINIUS H, EDELHOFER M, SCHULT-DIETRICH P, SCHNIERLE BS, DITTMAR MT, VON LAER D (2001) Inhibition of HIV Infection by a Membrane-

Anchored Peptide. Poster presentation; 4th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy Seattle, Washington, 30.05.-03.06.2001

- MARTINIUS H, EGELHOFER M, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, THALER S, SCHNIERLE BS, VON LAER D (2001) Retroviral Vectors for Inhibition of HIV Entry and Replication. Poster presentation; 3rd International Symposium on Transplantation & Gene Therapy Idar-Oberstein, 18.-20.10.2001.
- EGELHOFER M, MARTINIUS H, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F, VON LAER D (2002) Retroviral Vectors for Inhibition of HIV Entry and Replication. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Erlangen, 08.-11.04.2002.
- VON LAER D, BRANDENBURG G, BAUM C, EGELHOFER M, FEHSE B, KÜHLCKE K, VAN LUNZEN J, MARTINIUS H, NIKOLAEV A, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F, ALEXANDROV A (2002) Gene therapy for HIV infection with entry inhibitors. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Erlangen, 08.-11.04.2002.
- VON LAER D, BRANDENBURG G, EGELHOFER M, MARTINIUS H, BAUM C, ALEXANDROV A, VAN LUNZEN J (2002) Gene therapy for HIV infection with entry inhibitors. Poster presentation; 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, USA, 05.-09.06.2002.
- MARTINIUS H, EGELHOFER M, BRANDENBURG G, FEHSE B, KÜHLCKE K, BAUM C, ALEXANDROV A, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F, VON LAER D (2002) Retroviral Vectors for Gene Therapy of HIV Infection. Poster presentation; 7th European Conference on Experimental AIDS Research, Genoa, Italy, 8.-11.06.2002.
- LI PIRA G, MARTINIUS H, BOTTONE L, IVALDI F, PELIZZOLI R, KOOPMAN G, SAN JOSÉ E, ZALDIVAR I, ALARCON B, VON LAER D, Manca F (2002) Retroviral Vectors for the Introduction of New Genes into Antigen Specific CD4 Cells for Gene Therapy of HIV Infection. Poster presentation; 7th European Conference on Experimental AIDS Research, Genoa, Italy, 8.-11.06.2002.
- EGELHOFER M, MARTINIUS H, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F, VON LAER D (2002) Retroviral vectors for inhibition of HIV entry and replication. Poster presentation; 14th International AIDS Conference, Barcelona, Spain, 07.-12.07.2002.
- MARTINIUS H, EGELHOFER M, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, VORPAHL F, VON LAER D (2002) Retroviral vectors for inhibition of HIV entry and replication. Poster presentation; 10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antibes, France, 12.-16.10.2002.

- BRANDENBURG G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, EGELHOFER M, VORPAHL F, FEHSE B, BAUM C, KÜHLCKE K, ALEXANDROV A, VON LAER D (2002) Gene therapy for HIV infection with entry inhibitors. Poster presentation; 10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antibes, France, 12.-16.10.2002.
- VON LAER D, BRANDENBURG G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, EGELHOFER M, BAUM C, ALEXANDROV A, VAN LUNZEN J (2002) A comprehensive approach to gene therapy for HIV infection. Poster presentation; 10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antibes, France, 12.-16.10.2002.
- EGELHOFER M, BRANDENBURG G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, HERMANN F, BAUM C, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Development of a retroviral vector for protection of T cells from HIV infection. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Berlin, 26.-29.03.2003.
- MARTINIUS H, BRANDENBURG G, EGELHOFER M, CHOI I, SCHULT-DIETRICH P, BAUM C, KÜHLCKE K, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Inhibition of HIV entry and replication in cells expressing gp41-derived peptides. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Berlin, 26.-29.03.2003.
- BRANDENBURG G, MARTINIUS H, TARIMORADI S, KOOPMANN G, SCHIEDLMEIER B, SCHULT-DIETRICH P, CHOI I, EGELHOFER M, BAUM C, SCHILZ A, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Preclinical toxicity and efficacy studies in mice and rhesus macaques of a novel anti-HIV gene. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Berlin, 26.-29.03.2003.
- EGELHOFER M, BRANDENBURG G, MARTINIUS H, SCHULT-DIETRICH P, BAUM C, CHOI I, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Entry Inhibition in Gene Therapy of HIV Infection. Poster presentation; 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Washington, DC., USA, 04.-08.06.2003.
- MARTINIUS H, EGELHOFER M, BRANDENBURG G, SCHULT-DIETRICH P, BAUM C, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Development of a retroviral vector for protection of T cells from HIV infection. Poster presentation; 9th European AIDS Conference (EACS), 1st EACS Resistance & Pharmacology Workshop, Warsaw, Poland, 25.-29.10.2003.
- BRANDENBURG G, MARTINIUS H, EGELHOFER M, SCHULT-DIETRICH P, TARIMORADI S, KOOPMAN G, SCHIEDELMEIER B, BAUM C, SCHWEIZER M, SCHILZ A, ALEXANDROV A, VON LAER D (2003) Gene therapy for HIV infection with entry inhibitors. Poster presentation; 9th European AIDS Conference (EACS), 1st EACS Resistance & Pharmacology Workshop, Warsaw, Poland, 25.-29.10.2003.

10.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Holger Otto Martinius
Geburtsdatum: 30. Juli 1971
Geburtsort: Birkenfeld/Nahe
Familienstand: verheiratet
Anschrift: Hügelstr. 14, 82178 Puchheim

SCHULBILDUNG

1977 - 1981 Grundschule Baumholder
1981 - 1983 Hauptschule Baumholder
1983 - 1987 Staatliche Realschule Baumholder
1987 - 1990 Göttenbach-Gymnasium Idar-Oberstein, Abitur

ZIVILDienst

1990 - 1991 Übergangswohnheim für Aussiedler, Kirn

STUDIUM

1991 - 1992 Lehramtsstudiengang Biologie/Chemie an Realschulen
Universität des Saarlandes, Saarbrücken
1992 - 2000 Diplomstudiengang Biologie
Universität des Saarlandes, Saarbrücken
1992 - 1994 Grundstudium mit Diplomvorprüfung
1994 - 2000 Hauptstudium mit Diplomarbeit am Institut für Allgemeine
Mikrobiologie, Prof. Dr. Kaltwasser: "Charakterisierung des
Wachstums und des Abbaupotentials von *Ralstonia eutropha*
mit 2,4-Dichlorphenol als alleinige C-Quelle, in Anwesenheit
tensidmodifizierter Tonminerale"
Experimentelle Arbeit durchgeführt an der Forschungszentrum
Jülich GmbH; ICG 6: Institut für Biologie des Stoffaustauschs,
Prof. Dr. Söder
10.07.2000 Studienabschluss als Dipl. Biologe

PROMOTION

2000 - 2003 am Georg-Speyer-Haus, Abteilung Angewandte Virologie und
Gentherapie, Prof. Dr. von Laer
12/2001 - 02/2002 Centro di Biotecnologie Avanzate, Unit of Viral Immunology,
Dr. Manca, Genua
2003 - 2004 am Europäischen Forschungsinstitut für die Entwicklung von
Transplantationsstrategien, EUFETS GmbH, Idar-Oberstein
Seit Januar 2005 Fresenius Biotech GmbH, Gräfelfing

10.4 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich zu keiner Zeit an einer anderen Universität um die Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die erlaubten Hilfsmittel verwendet habe. Die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen stammenden Angaben habe ich als solche kenntlich gemacht, sowie die Inanspruchnahme persönlicher Hilfe namentlich erwähnt.

Puchheim, den

.....
(Holger O. Martinius)