

FOCUS

Derzeitiger Stand und Aussichten der Gentherapie

Kurt ZATLOUKAL

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfahrungen, die innerhalb der letzten 6 Jahre an ca. 800 Patienten mit Gentherapie gesammelt wurden, haben einerseits gezeigt, daß die verwendeten Verfahren sicher sind. Andererseits haben sich auch klar die Grenzen der derzeit zur Verfügung stehenden Techniken dargestellt. Es konnte zwar an einigen Beispielen wie den Gentherapieversuchen bei Adenosindeaminase-Mangel, familiärer Hypercholesterinämie und bei Krebs die prinzipielle Wirksamkeit der Gentherapie belegt werden, doch war generell die erzielte Effizienz zu gering, um entsprechende therapeutische Effekte zu erreichen. Mit Ausnahme der Immuno-Gentherapieverfahren bei Krebs sind für die meisten anderen Anwendungsgebiete noch grundlegende Verbesserungen der Gentransfersysteme und/oder der Zelltransplantationstechnologie notwendig, ehe ein therapeutischer Einsatz realistisch ist. In Anbetracht dessen, daß die Gentherapie derzeit noch ganz am Anfang ihrer Entwicklung steht, kann man aufgrund der bisherigen Erfahrungen jedoch annehmen, daß Gentherapie in der Zukunft zumindest bei einigen Indikationen eine wichtige Rolle spielen wird.

Schlüsselwörter: Somatische Gentherapie, Gentransfertechniken, Sicherheit, Erbkrankheiten, Krebsvakzine, Immuno-Gentherapie, AIDS, Grundlagenforschung, Vektoren, Zelltransplantationstechnologie

ABSTRACT

The experience after six years of genetic therapy, involving 800 patients, have shown on the one hand that the procedures used are safe. On the other hand, the limits of the techniques used at present have been revealed. In some cases, for example insufficiency of adenosindeaminase, hypercholesterolemia and cancer, it has been possible to demonstrate some measure of effectiveness, but this still does not allow to speak of a therapeutic benefit. With the exception of the (immunological gene-therapy) procedure, in the majority of the other cases it is necessary to improve the systems of gene transfer and/or the techniques of cell transplant further, before using them as a therapeutic method. Bearing in mind that gene therapy is still in its beginnings, and on the basis of the results obtained, it seems that at least in some indications it will play an important role.

keywords: somatic gene therapy, gene transfer, security, hereditary disease, immunological gene therapy, AIDS, basic research, carrier, techniques of cell transplant

*Anschrift des Autors: Univ.Doz.Dr.Kurt ZATLOUKAL, Institut für Pathologie, Universität Graz, Auenbruggerplatz 25,
A-8036 Graz*

Einleitung

Der erste Vorstoß zur Anwendung genetisch veränderter Zellen am Menschen wurde bereits Anfang der 80er Jahre gemacht (Übersicht über Entwicklung der Gentherapie^{1,2,3}). Dies hat zu umfangreichen Diskussionen über die Sicherheit derartiger Verfahren sowie über deren rechtliche Grundlagen und die damit verbundenen ethischen Aspekte geführt. Es dauerte bis 1989, ehe Wege gefunden wurden, mit diesen komplexen Fragen aus dem Umfeld der Gentherapie umzugehen. So wurde am National Institute of Health (NIH) in den USA das „Recombinant DNA Advisory Committee“ (RAC), das sich aus Spezialisten der diversen Fachgebiete zusammensetzt, mit der Beurteilung von Gentherapieversuchen am Menschen beauftragt. Generell werden Genveränderungen ausschließlich an somatischen menschlichen Zellen durchgeführt. Das bedeutet, daß die Genmanipulation nur die behandelten Zelltypen (z.B. Knochenmarkszellen oder Leberzellen) betrifft und auch nicht auf Nachkommen weitergegeben werden kann. Somit führt die somatische Gentherapie zu keinem Eingriff in das Erbgut des Menschen. Genmanipulationen an Zellen der Keimbahn (z.B. Eizellen oder Zellen der Spermio-genese) würden den ganzen aus diesen Keimzellen entstandenen Menschen betreffen und zu vererbaren Veränderungen führen. Eingriffe in die Keimbahn des Menschen werden weltweit zur Zeit nicht durchgeführt und sind in Österreich durch das Gentechnikgesetz verboten.

Die erste vom NIH genehmigte Anwendung von genetisch veränderten somatischen Zellen am Menschen im Jahr 1989, die von Steven ROSENBERG durchgeführt wurde, war der Startschuß für die rasant entwickelnde Gentherapie (siehe Tabelle 1). Die Erprobung von Gentherapieverfahren beschränkt sich nicht nur auf klassische Erbkrankheiten, die durch den Defekt eines spezifischen Gens verursacht werden, sondern umfaßt auch durch komplexe Gende-

defekte verursachte Erkrankungen, wie den Krebs und auch Erkrankungen, die nicht durch Gendefekte verursacht werden (z.B. Virusinfektionen, chronische Gelenksentzündung). Die sogenannten Genmarkierungsstrategien werden ebenfalls den Gentherapieverfahren zugeordnet, obwohl es sich hierbei um keine therapeutischen Ansätze handelt, sondern nur das Verhalten von genetisch veränderten Zellen im Menschen untersucht wird.

Bisherige Erfahrungen

Die erste durch einen Gendefekt verursachte Erkrankung, für die ein Gentherapieverfahren entwickelt wurde, war der *Adenosindeaminase-Mangel*. Durch den Defekt der Adenosindeaminase kommt es zu einer Akkumulation von Metaboliten des Nukleinsäurestoffwechsels, die für Lymphozyten toxisch sind. Die Schädigung der Lymphozyten hat einen schweren kombinierten Immundefekt zur Folge, der erkrankten Kindern ein Überleben nur in einer sterilen Umgebung erlaubt. Der Adenosindeaminase-Mangel ist selten mit nur wenigen hundert Erkrankten weltweit. Es handelt sich jedoch um eine sehr schwere Erkrankung, für die es mit Ausnahme der Knochenmarkstransplantation oder der äußerst teuren Enzymsubstitutionstherapie mit PEG-Adenosindeaminase (Kosten von mehr als 2 Millionen Schilling pro Patient/Jahr) keine konventionelle Therapie gibt. Diese Erkrankung bietet gute Voraussetzungen für die Durchführung einer Gentherapie. Die zur Korrektur des Defektes benötigte genetische Information (DNA-Menge) ist klein, so daß sie mit Hilfe von retroviralen Vektoren in Zellen eingeschleust werden kann. Außerdem kann die genetische Manipulation an Zellen durchgeführt werden, die leicht vom Patienten gewonnen und wieder dem Patienten verabreicht werden können, da die Zielzellen Lymphozyten oder Knochenmarksstammzellen sind. Die bisherigen Therapieversuche bei Kin-

Erkrankung	NIH							nicht NIH
	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1989-95
Markierung	1		5	8	8	3	1	5
ADA-Mang		1						2
Krebs		1	2	5	14	13	9	22
FH			1					
AIDS					2	3	2	
Mukovisz.					5	4	1	3
Gaucher					2	1		
Hämophilie B								1
Fanconi							1	
Alpha-1-AT						1		
Arteriosk.						1		
Granulomat.							1	
Arthritis							1	
Total	1	2	8	13	31	26	16	33

Tabelle 1: NIH: National Institute of Health(USA); nicht NIH: außerhalb des NIH durchgeführte Gentherapiestudien (überwiegend Europa);

Markierung: Genmarkierungsstudie (keine Therapie), ADA- Mang.: Adenosindeaminase-Mangel, FH: Familiäre Hypercholesterinämie, Mukovisz.: Mukoviszidose, Alpha-1-AT: Alpha-1-Antitrypsin Mangel, Fanconi: Fanconi Anämie, Arteriosk.: Arteriosklerose, Granulomat.: Progressive septische Granulomatose, Arthritis: Primäre chronische Polyarthritis. Quelle: Human Gene Therapy und European Working Group on Human Gene Transfer and Therapy.

der haben gezeigt, daß die angewandten Gentherapieverfahren sicher und prinzipiell erfolgreich sind. So exprimieren bei einem der behandelten Kinder drei Jahre nach Beginn der Gentherapie die Hälfte der Lymphozyten das eingeschleuste intakte Adenosindeaminase-Gen. Bei anderen behandelten Kindern war hingegen die Effizienz des Verfahrens wesentlich geringer. Der therapeutische Effekt der Gentherapieverfahren zu Korrektur des Adenosindeaminase-Mangels ist jedoch nicht sicher gezeigt, da die Kinder zusätzlich zur Gentherapie noch eine Enzymsubstitution erhalten².

Ein weiteres Beispiel einer Gendefekterkrankung, bei der ein Gentherapieverfahren erfolgreich erprobt wurde, ist die *familiäre Hypercholesterinämie*. Durch einen Defekt des Gens für den Low Density Lipoprotein-Rezeptor ist die Regulation der Cholesterinsynthese in der Le-

ber gestört, sodaß diese Patienten frühzeitig eine schwere Arteriosklerose entwickeln und an den Komplikationen (z.B. Infarkten) versterben. Zur Korrektur dieses Gendefektes ist es notwendig, dem Patienten ein Stück Leber zu entnehmen und in die kultivierten Leberzellen die richtige genetische Sequenz für den Low Density Lipoprotein-Rezeptor einzufügen. Danach werden die genetisch veränderten Leberzellen durch Infusion über die Portalvene wieder in der Leber angesiedelt. Auch bei diesem Verfahren konnte gezeigt werden, daß die verwendete Technologie sicher ist und daß die genetische Veränderung zu einer partiellen Korrektur des Cholesterinstoffwechseldefektes führt. Für einen therapeutisch relevanten Effekt müßten allerdings wesentlich mehr Zellen genetisch verändert werden. Weiters ergibt sich bei derartigen Verfahren das Problem, daß

die genetisch veränderten Zellen nur einige Jahre am Leben bleiben (die Überlebenszeit einer Leberzelle beträgt 1 bis 2 Jahre). Das bedeutet, daß die Gentherapie alle paar Jahre wiederholt werden müßte.

Recht günstige Voraussetzungen sind für die Therapie von *lysosomalen Speichererkrankungen* gegeben. In diesem Fall kann die genetische Manipulation in der Zellkultur durchgeführt werden. Die zur Korrektur des Defektes benötigte genetische Information (DNA-Menge) überschreitet in der Regel nicht die Transportkapazität von viralen Vektoren. Als Zielzelle kann jede Körperzelle fungieren, die vom Patienten entnommen und nach genetischer Manipulation als Zellsuspension oder in Form eines Organoids reimplantiert werden kann.⁴ Die einzige Voraussetzung ist, daß das von der Zelle produzierte lysosomale Enzym in die Zirkulation abgegeben und dann von den diversen Zellen, die das Enzym benötigen, über den Mannose-6-Phosphatrezeptor aufgenommen wird. Der therapeutischen Anwendung dieser Gentherapieverfahren steht jedoch noch die begrenzte Überlebenszeit der genetisch veränderten Zellen entgegen.

Bei den oben angeführten Gentherapieverfahren wird die genetische Manipulation der Zellen außerhalb des Organismus in der Zellkultur durchgeführt. Es gibt jedoch Erkrankungen, bei denen die genetische Manipulation direkt im Patienten erfolgen muß. Ein Beispiel hierfür ist die Gentherapie der *Mukoviszidose*. Bei der Mukoviszidose ist durch einen Gendefekt die Regulation des Chloridionen-Transportes gestört. Dies hat zur Folge, daß vom Bronchialepithel ein sehr zäher Schleim gebildet wird, der die Bronchien teilweise verschließt und rezidivierende Infektionen zur Folge hat. Bei den bisher erprobten Gentherapieansätzen zur Korrektur der Mukoviszidose wurde versucht, die korrekte genetische Information für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ entweder mit adenoviralen Vektoren oder mittels Liposomen in das

Epithel der Atemwege einzuschleusen. Es konnte bei den klinischen Studien gezeigt werden, daß durch diese Maßnahmen der Chloridionen-Transport in der Nasenschleimhaut korrigiert werden kann.⁵ Therapeutische Effekte waren jedoch in keinem Fall zu erzielen.^{2,3} Die derzeit in Erprobung befindlichen Gentherapieverfahren für Mukoviszidose haben nicht nur das Problem, daß die Gentransfereffizienz bei weitem nicht genügt, um einen therapeutischen Effekt zu erreichen, sondern daß auch der Effekt der genetischen Manipulation nur über sehr kurze Zeit erhalten bleibt.⁶ Dies beruht darauf, daß das Bronchialepithel innerhalb kurzer Zeit erneuert wird und die genetische Manipulation nicht die Reservezellen betrifft, von denen die kontinuierliche Regeneration des Bronchialepithels ausgeht. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren ist, daß die genetisch veränderten Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer begleitenden Immunsuppression, um einen langzeitigen Effekt zu erzielen.⁷

Die Hälfte der bisher durchgeführten Gentherapiestudien am Menschen betreffen jedoch nicht Erbkrankheiten, die durch einen Gendefekt verursacht werden, sondern *maligne neoplastische Erkrankungen* (Übersicht über bisher durchgeführte Gentherapiestudien in *Tabelle 1*). Diese werden durch sukzessive Defekte von mehreren Genen verursacht, die die Vermehrung und die Differenzierung von Zellen regulieren. Obwohl aus pathophysiologischer Sicht die Korrektur der mutierten Gene naheliegend wäre, ist diese Vorgangsweise bis auf wenige Ausnahmen technisch nicht realisierbar. Ein derartiges Konzept würde voraussetzen, daß die genetische Manipulation direkt im Patienten erfolgt und gezielt sämtliche Tumorzellen, auch in jenen Organen, in denen sich Krebsmetastasen entwickelt haben, erreicht. Keines der derzeit zur Verfügung stehenden Gentransfersysteme erfüllt diese Voraussetzungen. Auch in naher Zukunft werden derartige Konzepte

nicht realisierbar sein. Bei lokalisierten Tumoren besteht die Möglichkeit, mittels gentherapeutischer Verfahren die Tumorzellen spezifisch für Chemotherapeutika empfindlich zu machen. So wurden zum Beispiel Zellen, die retrovirale Vektoren mit dem Gen der Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase produzieren, stereotaktisch in Gehirntumore injiziert. Auf diese Weise werden selektiv nur sich teilende Tumorzellen genetisch verändert und somit empfindlich für das Medikament Ganciclovir gemacht (Übersicht über Gentherapiestrategien bei Krebs⁸). Die ersten klinischen Erprobungen haben gezeigt, daß es, obwohl die Gentransfereffizienz sehr niedrig war, doch bei einzelnen Patienten zu einer Regression der Tumoren gekommen ist. Ein anderes Gentherapiekonzept gegen Krebs beruht darauf, normale Körperzellen vor der toxischen Wirkung der Chemotherapeutika zu schützen. Hierfür wird zum Beispiel das „multidrug resistance“ (*mdr-1*)-Gen in Knochenmarksstammzellen eingeschleust. Dadurch sollte es möglich werden, Chemotherapeutika höher zu dosieren, um einen besseren Effekt zu erreichen. Inwieweit derartige Strategien zu einer Verbesserung in der Krebstherapie führen werden, ist zur Zeit noch offen.

Die meisten bisher am Menschen erprobten Gentherapieverfahren gegen Krebs sind jedoch eigentlich Immuntherapien. Das Grundprinzip ist, daß durch genetische Manipulation gezielt in die Immunantwort gegen Tumoren eingegriffen wird (Übersicht^{9,10}). Auf diese Weise soll die Immunantwort gegen den Tumor initiiert beziehungsweise reaktiviert werden, die dann zu einer Zerstörung der Tumorzellen führt. Diese Verfahren sollen nicht dazu dienen, große Tumormassen zu zerstören, sondern haben das Ziel, Mikrometastasen zu eliminieren, die chirurgisch nicht entfernt werden können und Ausgangspunkt für spätere klinisch manifeste Metastasen sind. Für derartige Therapiekonzepte sind die Anforderungen an das Gentransferverfahren relativ gering. Der

Gentransfer kann an Tumorzellen, die aus dem chirurgisch entfernten Tumor gewonnen wurden, in der Zellkultur durchgeführt werden. Die genetische Information (DNA-Menge), die zur gezielten Beeinflussung der Immunantwort gegen die Tumorzelle benötigt wird, ist in der Regel klein genug, um mit allen viralen (und nicht viralen) Vektorsystemen eingeschleust zu werden. Im Gegensatz zu allen anderen bisher angeführten Gentherapieverfahren, bei denen ein langzeitiges Überleben der genetisch veränderten Zellen Voraussetzung für den therapeutischen Effekt ist, müssen bei den Immuntherapieverfahren gegen Krebs die genetisch veränderten Zellen nur wenige Tage überleben. Die tierexperimentell gewonnenen Erfahrungen sind zum Teil sehr vielversprechend, können jedoch leider nicht direkt auf den Menschen übertragen werden (Beispiel für tierexperimentelle Ergebnisse¹¹). Obwohl die technischen Voraussetzungen hinreichend erfüllt sind, kann jedoch noch nicht abgeschätzt werden wieweit durch gezielte Aktivierung des Immunsystems ein therapeutischer Effekt bei Tumoren des Menschen zu erzielen ist. Es ist notwendig, die unzähligen Faktoren, die die Effizienz eines Immungentherapieverfahrens gegen Krebs beeinflussen, erst schrittweise in klinischen Studien zu erarbeiten, ehe man das therapeutische Potential abschätzen kann.

Ausblicke

Insgesamt sind innerhalb der letzten sechs Jahre in ca. 175 klinischen Studien mehr als 800 Patienten mit Gentherapieverfahren behandelt worden.¹² Alle Studien haben gezeigt, daß die verwendeten Gentransfertechniken biologisch sicher sind. Das heißt insbesondere, daß in keinem Fall replikationskompetente Vektoren nachzuweisen waren, die sich unkontrolliert im behandelten Patienten ausbreiten oder auf andere Personen übertragen werden können. Weiters ist bei keinem der mit retroviralen

Vektoren behandelten Patienten durch die Gentherapie als Folge einer Insertionsmutagenese ein Tumor induziert worden. An den Beispielen der Therapieansätze für Adenosin-deaminase-Mangel, familiäre Hypercholesterinämie und Krebs konnte zumindest die prinzipielle Wirksamkeit der angewendeten Verfahren belegt werden. Somit ist eindeutig erwiesen, daß es mit Hilfe der Gentechnologie heutzutage möglich ist, von Patienten entnommene Zellen genetisch zu verändern und dem Patienten wieder zu verabreichen. Dies ist die Grundvoraussetzung für Gentherapiestrategien für eine Vielzahl von Erkrankungen, von denen einige oben angeführt wurden. Weiters ergibt sich auch die Möglichkeit, Gentherapieverfahren zur Therapie von primär nicht genetisch bedingten Erkrankungen einzusetzen. Genetisch veränderte Zellen können auch dazu verwendet werden, ein beliebiges Hormon (unter Verwendung von geeigneten Promotoren auch in weitgehend regulierter Form), einen Wachstumsfaktor oder entzündungshemmende Faktoren direkt im Organismus zu produzieren. Die Gentherapie ermöglicht darüber hinaus einen gezielten Eingriff in die Vermehrung von Viren. Auf diese Weise wird zum Beispiel versucht, die Vermehrung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zu verhindern. Bevor jedoch Gentherapie für dieses breite Spektrum an Indikationen eingesetzt werden kann, müssen noch entscheidende Verbesserungen der Gentransfereffizienz und des Langzeitüberlebens der genetisch veränderten Zellen erreicht werden.

Bei der Beurteilung der zukünftigen medizinischen Bedeutung der Gentherapie sollte bedacht werden, daß sie noch am Anfang ihrer Entwicklung steht und daß innerhalb der letzten Jahre erst der Schritt vom Versuchstier auf den Menschen gewagt wurde. Diese erste Erfahrungsphase mit der Gentherapie ist einerseits sehr erfolgreich verlaufen, hat anderer-

seits aber auch klar die Grenzen der derzeitigen Verfahren aufgezeigt.

Referenzen:

1. F. WALTERSKIRCHEN, M. SCHWARZ, "Gentherapie", IMABE-Dokumentation (1993),4:1-8.
2. E. MARSHALL, Gene Therapy's Growing Pains. *Science* (1995), 269:1050-1055.
3. R. G. CRYSTAL, Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success. *Science* (1995),270:404-410.
4. P. MOULLIER, D. BOHL, J. CARDOSO, J. M. HEARD, O. DANOS, Long-term delivery of a lysosomal enzyme by genetically modified fibroblasts in dogs. *Nature Medicine*(1995) 1:353-357.
5. J. G. HAY, N. G. McELVANEY, J. HERENA, R. G. CRYSTAL, Modification of Nasal Epithelial Potential Differences of Individuals with Cystic Fibrosis Consequent to Local Administration of a Normal CFTR cDNA Adenovirus Gene Transfer Vector. *Hum Gene Ther*(1995), 6:1487-1496.
6. B. R. GRUBB, R. J. PICKLES, H. YE, J. R. YANKASKAS, R. N. VICK, J. F. ENGELHARDT, J. M. WILSON, L. G. JOHNSON, R. C. BOUCHER, Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature*(1994), 371:802-806.
7. B. FANG, R. C. EISENSMITH, H. WANG, M. A. KAY, R. R. CROSS, C. N. LANDEN, G. GORDON, D. A. BELLINGER, M. S. READ, P. C. HU, K. M. BRINKHOU, S. L. C. WOO Gene Therapy for Hemophilia B: Host Immunosuppression Prolongs the Therapeutic Effect of Adenovirus-Mediated Factor IX Expression. *Hum Gene Ther* (1995),6:1039-1044.
8. A. A. GUTIERREZ, N. R. LEMOINE, K. SIKORA, Gene therapy for cancer. *Lancet* (1992),339:715-720.
9. R. I. TEPPER, J. J. MULE, Experimental and Clinical Studies of Cytokine gene-Modified Tumor Cells. *Hum Gene Ther*(1994), 5:153-164.
10. K. ZATLOUKAL, W. SCHMIDT, M. COTTEN, E. WAGNER, G. STINGL, M. L. BIRNSTIEL, Somatic gene therapy for cancer: the utility of transferrinfection in generating "tumor vaccines".(1993), *Gene* 135:199-207.
11. K. ZATLOUKAL, A. SCHNEEBERGER, M. BERGER, W. SCHMIDT, F.KOSZIK, R.KUTIL, M.COTTON, E.WAGNER, G.STINGL, M.L.BIRNSTIEL, Elicitation of a Systemic and Protective Anti-Melanoma Immune Response by an IL-2-Based Vaccine.Assessment of Critical Cellular and Molecular Parameters. *J Immunol*(1995), 154:3406-3419
12. W.F. ANDERSON, End-of-the-year-Potpourri, *Hum Gene Ther*,(1995), 6:1505-1506