

# Therapie mit Genen: Erfahrungen und Zukunftsperspektiven 10 Jahre nach ihrer klinischen Einführung

S. Nikol und M. Hallek

Kaum ein anderes biomedizinisches Forschungsgebiet hat in den letzten Jahren so viel Aufmerksamkeit erregt wie die Gentherapie. Die Voraussetzungen für diese schnelle Entwicklung schufen die bahnbrechenden Entdeckungen der Molekularbiologen in der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts. Die von dem Nobelpreisträger Nirenberg 1967 geäußerte Prognose „*My guess is that cells will be programmed with synthetic messages within 25 years*“ hat sich erfüllt. Mit raffinierten Methoden gelingt es heute, Gene in Zellen einbringen und dadurch neu programmieren. In der Öffentlichkeit hat der Gentherapie-Boom zu einer hohen und manchmal unrealistischen Erwartungshaltung bei der Therapie von Patienten mit hohem Leidensdruck geführt, bei denen konventionelle Therapien bisher versagten. Nach der ersten therapeutischen Anwendung 1990, hat sich das große Potential der Gentherapie bestätigt, wenn auch der Weg zur routinemäßigen Anwendung länger als erwartet ist.

Die wesentlichen Entdeckungen, die heute die Therapie mit Genen realisierbar werden lassen, liegen meist nur wenige Jahrzehnte zurück: 1944 bewies Avery, daß Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Speichersubstanz der Erbinformation ist. 1955 schlugen Watson und Crick die Doppelhelix-Struktur der DNA vor. 1961 wurde die Triplet-Struktur des genetischen Codes entschlüsselt. Die im gleichen Jahr gemachte Entdeckung der Boten-Ribonukleinsäure enthüllte einen prinzipiellen Mechanismus der Übersetzung von Genen in Proteine. 1974 wurden erstmals eukaryotische Gene in bakteriellen Plasmiden kloniert; dadurch wurde die Vermehrung und Untersuchung von Genen revolutioniert. 1977 wurden Techniken zur Sequenzierung von DNA entwickelt. 1979 wurden die ersten Krebsgene (Onkogene) entdeckt. Heute weiß man, daß Krebserkrankungen stets durch genetische Veränderungen (Mutationen) entstehen. 1990 wurde die erste Gentherapie an Patienten durchgeführt: Die damals vierjährige Ashanthi DeSilva, geboren mit einem schweren, meist tödlichen Immundefekt, dem Adenosindeaminase (ADA)-Mangel, erhielt von amerikanischen Wissenschaftlern am National Institute of Health die erste Infusion autologer T-Lymphozyten, in die ein normales funktionsfähiges ADA-Gen eingebracht worden war. Ashanthi DeSilva lebt heute fast wie ein normales gleichaltriges Kind.

Potentielle Vorteile der Gentherapie sind die Langzeitwirkung, die systemische oder lokale Regulierbarkeit der Genexpression, die relativ milde Einflußnahme auf physiologische Prozesse und die geringen Nebenwirkungen. Die Gentherapie ist definiert als die Einbringung von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens therapeutischen Nutzen zu erlangen. Die

Gentherapie verändert das klassische Paradigma der systemischen Arzneimittel-Therapie: Statt der Verabreichung eines Medikaments, das anschließend in relativ hoher Konzentration den gesamten Körper durchströmt, erlaubt das gezielte Einbringen von Genen in bestimmte Zellen die Produktion eines Wirkstoffes (Proteins) an einem genau bestimmbar Ort des Körpers. Unangenehme Nebenwirkungen, die durch die systemische Gabe des Medikaments entstehen, werden verringert. Stattdessen werden die erwünschten Effekte vorwiegend im Zielorgan hergestellt. Die Kopplung der therapeutischen Gene an eine genaue, zeitlich begrenzbare Steuerung erhöht die Attraktivität dieser neuen Therapieform weiter. Eine derartige Steuerung kann beispielsweise durch die Wahl geeigneter Promotoren erreicht werden. Die Gentherapie stellt gleichsam eine intelligente Form der Arzneimittel-Therapie dar, die Störungen am Ort ihrer Entstehung zu korrigieren versucht. Es ist deshalb zu erwarten, daß die Gentherapie die Behandlungsmöglichkeiten der Medizin revolutionieren wird.

Eine solche Technologie erfordert allerdings auch einen intelligenten und verantwortungsvollen Umgang. Durch die Gentherapie werden ethisch-moralische Fragen aufgeworfen, die im gesellschaftlichen Konsens geklärt werden müssen. Es besteht ein Bedarf an offen, konstruktiv und informiert geführter öffentlicher Diskussion. Folgende Problemkreise lassen sich definieren: 1. Die Risikoabwägung: Welche Erkrankungen dürfen mittels Gentherapie behandelt werden; welche Risiken sind dafür in Kauf zu nehmen? Konsens ist, daß derzeit nur durch andere Behandlungsverfahren nicht heilbare Erkrankungen durch gentherapeutische Verfahren behandelt werden sollten. 2. Die Sicherheit: Wie kann die Expression eines Therapie-Gens im Zielorgan zuverlässig erreicht werden, ohne es in andere Organe oder gar in andere Patienten zu verbreiten? Sicherheitsüberlegungen führten in den USA zur Gründung des „Recombinant DNA Advisory Committee“ (RAC), eines öffentlichen Gremiums, welches Gentherapie-Studien am Menschen hinsichtlich ihrer ethischen und wissenschaftlichen Berechtigung prüfen sollte. Die Arbeit dieses RAC war sehr erfolgreich und stellte bisher einen hohen Sicherheits-Standard der entsprechenden Studien sicher. Seine Arbeit wurde deshalb vor kurzem eingestellt. 3. Die Art der Gentherapie: Welche Gewebe bzw. Zellen dürfen genetisch umprogrammiert werden: nur somatische Zellen, was den Therapie-Effekt auf ein Individuum begrenzt (somatische Gentherapie) oder auch Keimbahn-Zellen, was das therapeutische Gen auf die Folgegenerationen übertragen würde (Keimbahn-Gentherapie)? Letztere Möglichkeit ist wohl relativ einfach mit „nein“ zu beantworten, zumal sie das Embryonengesetz in Deutschland verbietet. In einem gerade erschienenen Bericht hat sich das interdisziplinäre Institut Technik-Theologie-Naturwissenschaften unserer Universität dieser Frage im Rahmen eines interdisziplinären Diskurses angenommen.

## 1

**Voraussetzungen für den Gentransfer**

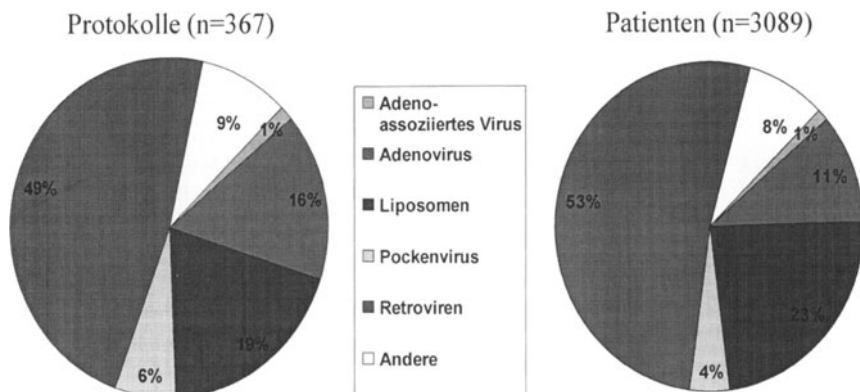
## 1.1

**Vektoren zur Genübertragung**

Bei der Genterapie wird genetisches Material in Zellen eingebracht. Dieser Vorgang wird Gentransfer genannt. Hierfür wird ein Vehikel benötigt, welches das Gen trägt, einen sogenannten Vektor (Abb.1). Die Wahl geeigneter Vektoren ist für die Effizienz der Genterapie entscheidend. Dabei können unterschiedliche Therapie-Ziele verschiedenartige Vektoren erfordern. Die Auswahl hängt zum Beispiel davon ab, ob der Gentransfer im Patienten oder im Reagenzglas stattfindet, was unterschiedliche Anforderungen an die Sicherheit und Zielgenauigkeit des Vektors stellt.

Ein optimaler Vektor sollte idealerweise folgende Eigenschaften haben:

- Ausreichende Effizienz (Einbringen des Therapie-Gens in genügend viele Zielzellen).
- Hohe Selektivität (Einbringen des Therapie-Gens ausschließlich in die Zielzellen, aber nicht in andere Zellen; dies gilt vor allem bei Durchführung des Gentransfers am Patienten, *in vivo*).
- Möglichkeit des Gentransfers in nicht-teilende Zellen (in fast allen menschlichen Geweben ist die Teilungsaktivität gering).
- Ausreichende hohe Gen-Aufnahmekapazität (vor allem bei gleichzeitigem Transfer mehrerer Gene).
- Erzielen einer ausreichend langen Gen-Expression (besonders bei Erbkrankheiten ist ein stabiler Gentransfer zur dauerhaften Korrektur des Erbdefekts erwünscht).
- Hohe Sicherheit (eine direkte krankmachende Wirkung des Vektors ist auszuschließen, schädliche Langzeitwirkungen sollen fehlen).



**Abb. 1.** Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Vektoren (Wiley, Stand 1.12.98)

Es gibt virale und nicht-virale Vektoren. Die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale sind in Tabelle 1 dargestellt. Virale Vektoren werden derzeit in mehr als 85 % aller klinischen Gentherapie-Studien eingesetzt (Abb. 2, Abb. 3). Die Mehrzahl verwendet Retroviren und Adenoviren. Die Verwendung von Viren als Vektoren macht sich deren evolutionär erworbene Fähigkeit zunutze, Gene in infizierte Wirtszellen einzubringen. Zur Vektorherstellung werden aus dem Gen-Repertoire des Virus mit molekularbiologischen Techniken die Gene entfernt oder zerstört, die zur Virusvermehrung notwendig sind. Die Viren werden dadurch vermehrungsunfähig. In die freigewordenen Bereiche wird dann das Therapie-Gen eingesetzt. Es entsteht ein rekombinantes Virus, das zum Gentransfer verwendet wird. Die wesentlichen Arten der in der Gentherapie eingesetzten Virus-Vektoren sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1.** Vergleich von Vektorsystemen

Vektor	Vorteil	Nachteil
Retrovirus	1%–30% Transduktionseffizienz permanente Modifikation infiziert hämatopoetische Zellen und epitheliale Zellen Erfahrung aus vielen klinischen Studien	Virus instabil integriert nur in replizierende Zellen 9–12 kb Insertions-Limit
Adenovirus	hohe Infektionsfrequenz für epitheliale Zellen Zellproliferation nicht erforderlich	infiziert nicht Knochenmark immunogen temporärer Effekt
adeno-assoziiertes Virus	Virus stabil integriert in geringer Frequenz in nicht-proliferierende Zellen	geringe Kapazität für DNA (5 kb) nur Ansätze mit geringen Virusmengen
Herpes simplex Virus Typ I	infiziert viele Zelltypen sehr hohe Virustiter relativ lange Expression von transfizierten fremden Genen	keine Integration in das Genom infizierter Zellen zytotoxisch komplexe Biologie, schwierige Entwicklung
„nackte“ DNA	Viren nicht involviert einfach zu verwenden einfach zu entwickeln	geringe Integrationsfrequenz temporäre Expression schneller intrazellulärer Abbau
Liposomen+DNA	Viren nicht involviert	für bestimmte Zellen zytotoxisch
adenovirales Hüllprotein	nicht-infektiöses Agens zell-spezifische Anwendung möglich	begrenzte Anwendung schwierig zu konstruieren

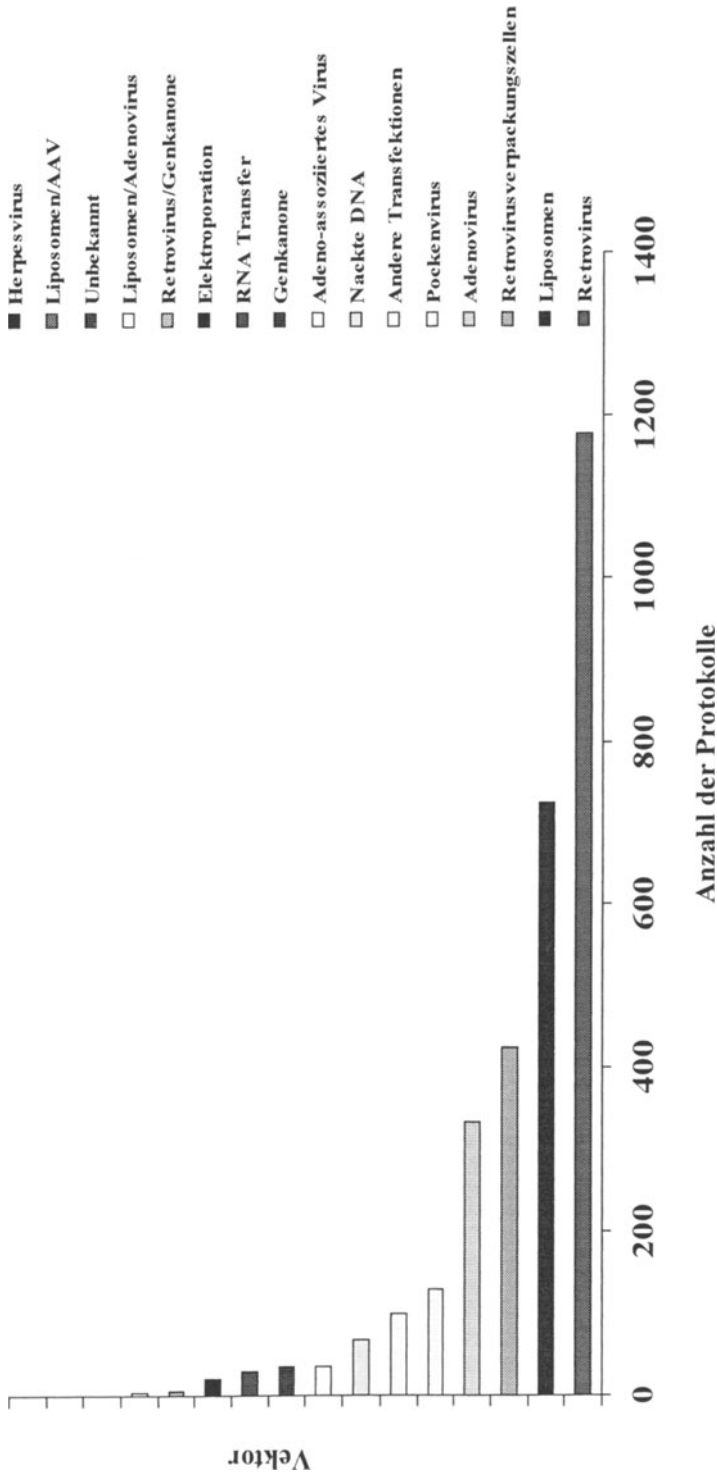


Abb. 2. Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Vektoren (Wiley, Stand 1.12.98)

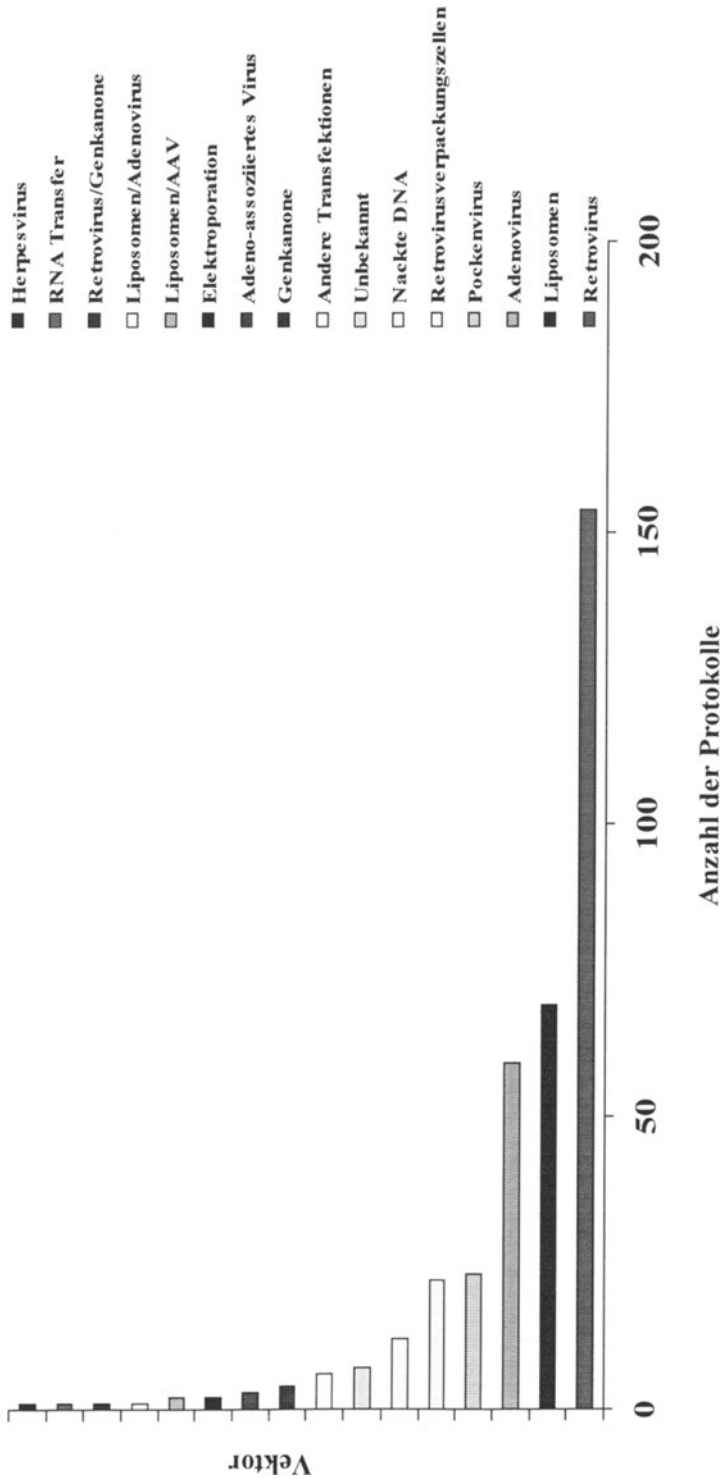
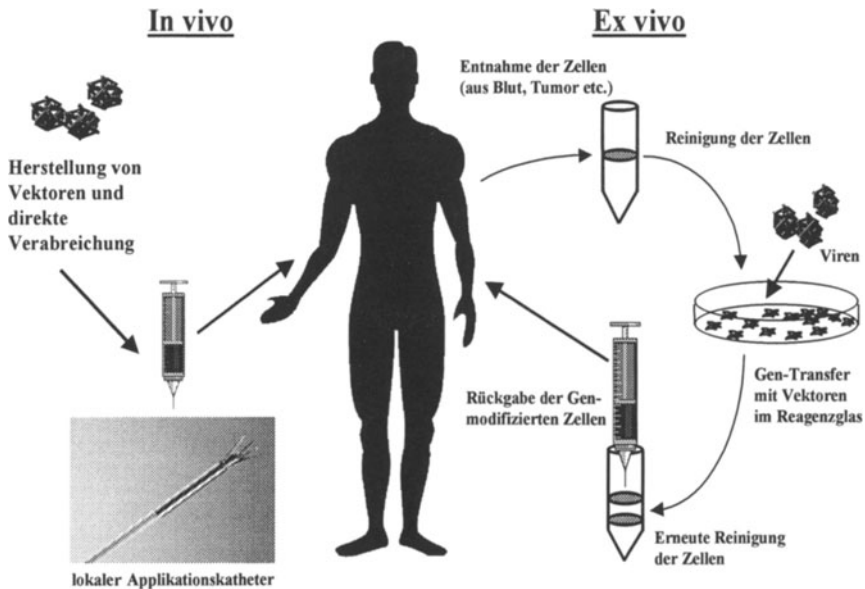


Abb. 3. Protokolle im klinischen Gentransfer weltweit: Vektoren (Wiley, Stand 1.12.98)

### 1.2 Transferwege

Neben der Effizienz des Gentransfers ist vor allem auch die Sicherheit der Therapie von Bedeutung. Hier bieten sich mit dem *in vivo* und dem *ex vivo* oder *out of the body approach* zwei verschiedene Verfahren an. Historisch gesehen war zu Beginn der klinischen Versuche das *ex vivo* Verfahren vorherrschend (Abb. 4). Meist werden hierbei autologe Zellen aus den jeweils betroffenen Organen oder aus dem Blut gewonnen (Abb. 5), in Kultur mit dem gewünschten Gen transfiziert und anschließend re-injiziert. Der Gentransfer findet so unter kontrollierten Bedingungen statt. Voraussetzung für die Überprüfbarkeit des Gentransfers ist allerdings ein erheblicher technischer Aufwand, ein eventuelles Verletzungsrisiko bei der Zellgewinnung und das Risiko einer Infektion der *ex corpore* durch das Immunsystem ungeschützten Körperzellen. Deshalb entstanden zunehmend Bestrebungen, Gene oder Gen-Fragmente *in vivo* direkt zu applizieren.

Bei der Markierung von Tumorgenen und der Applikation von Genen, die Resistenz gegen Chemotherapeutika vermitteln sollen (*multi-drug resistance genes*) ist die systemische Anwendung erwünscht. Bei der Behandlung von bestimmten Gendefekten und proliferativen Erkrankungen wird dagegen die lokale Therapie bevorzugt (Abb. 6, Abb. 7). So werden Aerosole bei der Behandlung der Mukoviszidose verwendet, transfizierte Leberzellen beim LDL-Rezeptor-Mangel und die



**Abb. 4.** Die verschiedenen Möglichkeiten der Gentherapie. Gene können außerhalb des Körpers (*ex vivo*) in Zellen eingebracht werden, indem sie in der Zellkulturschale mit einem Vektor behandelt werden. Die veränderten Zellen werden anschließend gereinigt und in den Körper zurückgebracht, beispielsweise durch Injektion. Eine andere Methode ist das direkte Einbringen von Vektoren in den Patienten, als Injektion oder über lokale Applikationskatheter

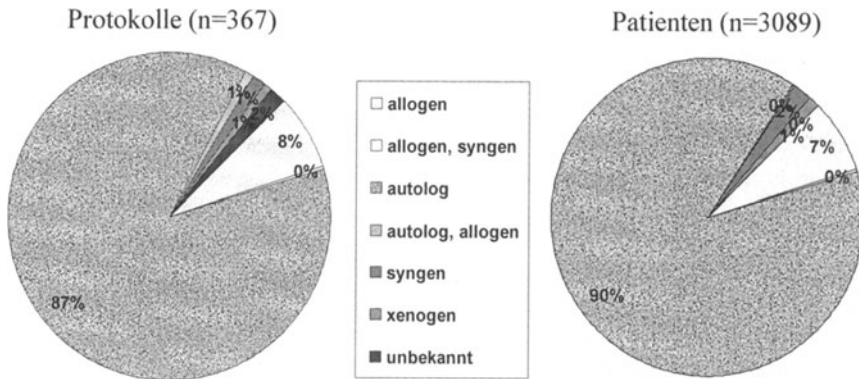


Abb. 5. Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Target-Zellen (Wiley, Stand 1.12.98)

lokale oder regionale Genthherapie bei der Restenose nach Angioplastie oder zur Angiogeneese bei der chronischen arteriellen Verschlusskrankheit. Die Sicherheit des Transfers kann verbessert werden, indem besondere Antriebsaggregate (Promotoren) verwendet werden, die die Transkription der DNA in RNA steuern. Sie können durch körpereigene Substanzen oder extern zugeführte Medikamente angeschaltet (induziert) werden. Die Selektivität des Gentransfers kann durch Promotoren, die lediglich in bestimmten Zelltypen oder Geweben aktiv sind, verbessert werden oder gar eine lokale Applikation unnötig machen (Hatzoglou et al. 1990, als Übersicht Harris u. Lemoine 1996). Auch die Anwendung eines Rezeptor-vermittelten Gentransfers ermöglicht eine lokale Therapie bei systemisch Applikation: Es werden Polyplexe mit Liganden kombiniert, die selektiv an Gewebespezifische Rezeptoren auf der Target-Zell-Oberfläche binden. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt dann über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose (Wagner et al. 1990; Kircheis et al. 1997).

Soll eine besonders hohe Transfektions-Effizienz erreicht werden, werden die unselektiven Adeno-, Lenti- und Sendaiviren bevorzugt (Salmons u. Günzburg 1993). Ist eher eine Limitierung auf proliferierende Zellen gewünscht, wie bei Tumorerkrankungen und anderen proliferativen Erkrankungen, werden die selektiven Retroviren und adeno-assoziierten Viren verwendet (Salmons u. Günzburg 1993, Hallek et al. 1998). Je nach betroffener Zellart kann die Selektivität des Gentransfers durch bestimmte Übertragungshelfer (Vektoren) gesteigert werden (Tab.1). Man macht sich hier vor allem den Tropismus verschiedener Viren zunutze, wie zum Beispiel die Vorliebe der Herpesviren für Zellen des ZNS oder der Adenoviren für Lungenzellen. Neben den viralen Vektoren gibt es chemische und mechanische Möglichkeiten der Verbesserung der Transfer-Effizienz wie die Liposomen (Abb. 1) oder der bisher fast ausschließlich experimentell verwendete „Beschuß“ mit beschichteten Partikeln oder die Kombination verschiedener Methoden, wie z.B. den Liposomen-Sendaivirus-Komplex.

Wird nun das geeignetste Transferverfahren mit dem individuell günstigsten Vektor mit einem induzierbaren und im Idealfall sogar zelltyp-spezifischen Promotor kombiniert und durch eine spezielle lokale Applikationstechnik verab-





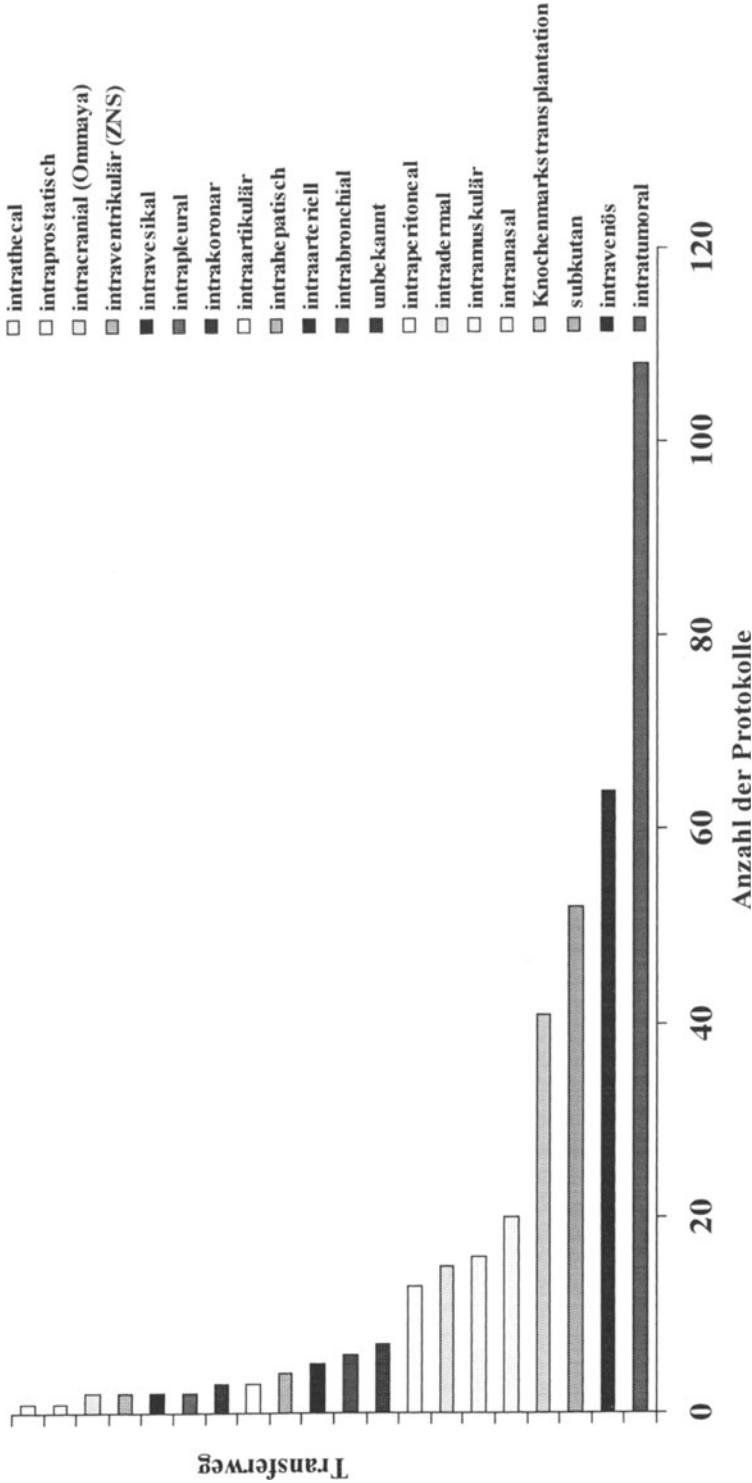


Abb. 7. Protokolle im klinischen Gentransfer weltweit: Transferwege (Wiley, Stand 1.12.98)

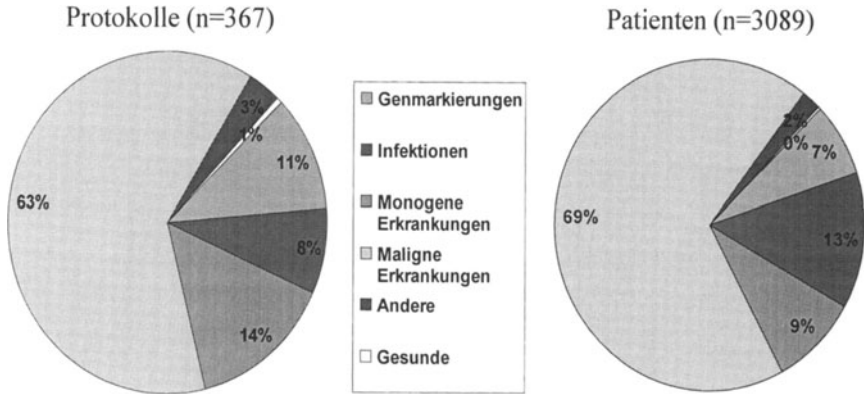


Abb. 8. Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Krankheiten (Wiley, Stand 1.12.98)

reicht, lässt sich maximale Sicherheit schaffen, ohne auf größte Effizienz verzichten zu müssen.

### 1.3 Wahl des transferierten Gens

Die Wahl des therapeutischen Gens hängt im wesentlichen von der Grundkrankheit ab (Abb. 8): fehlende oder defekte Gene können bei singulärem Genmangel oder -Defekt ersetzt werden; bei proliferativen Erkrankungen können körperfremde, therapeutische Gene (z.B. Suizid-Gene, Resistenz-Gene) oder bereits vorhandene Gene zusätzlich eingeschleust werden, die in die Regulation natürlich vorkommender Gene eingreifen (z.B. Zellzyklus-regulierende Gene oder Immunmodulation mit Zytokinen). Es besteht die Wahl, auf DNA-Ebene durch DNA-Transfer oder Transkriptionshemmung mittels kompetitiv wirkender DNA-Fragmente wie *tripel-helix*-formende Oligonukleotide einzugreifen, oder auf RNA-Ebene mit Hilfe von *antisense*-Oligonukleotiden, katalytischen Oligonukleotiden oder Ribozymen die Translation der genetischen Information in das biologisch aktive Protein zu verhindern.

## 2 Erste Ergebnisse der klinischen Genthherapie

Mittlerweile sind einzelne Ergebnisse aus 367 klinisch-therapeutischen Studien weltweit (Stand 1.12.1998, Wiley 1998) bekannt geworden (Abb. 9, Abb. 10), wobei die Anzahl in den ersten Jahren exponentiell zunahm (Abb. 11). Während sich zuerst der größte Teil der Programme mit der gentechnologischen Markierung von Zellen zum besseren Verständnis von Tumorausbreitung und frühzeitigen Diagnostikstellung beschäftigte, überwiegen heute die therapeutischen Studien. Schwer-

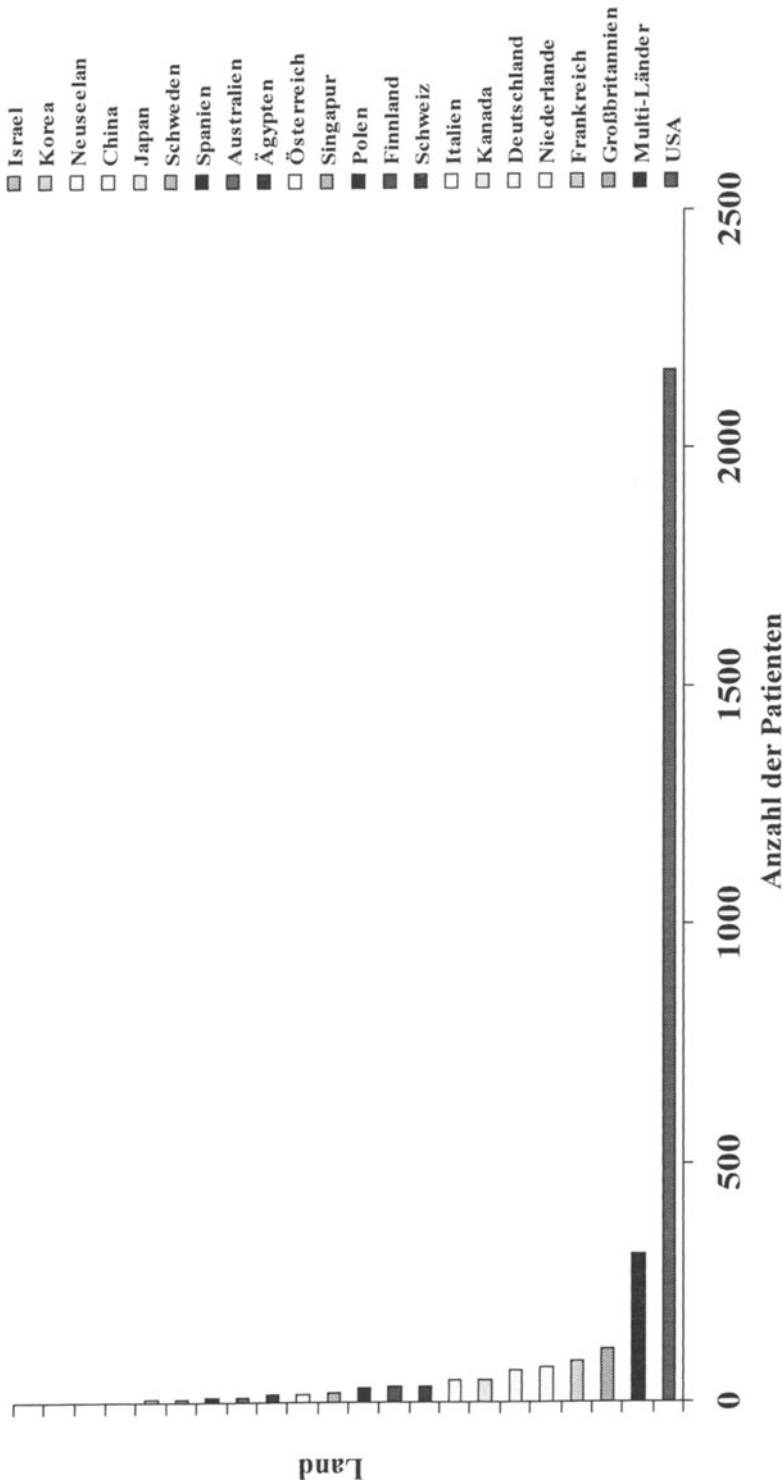


Abb. 9. Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Länder (Wiley, Stand 1.12.98)

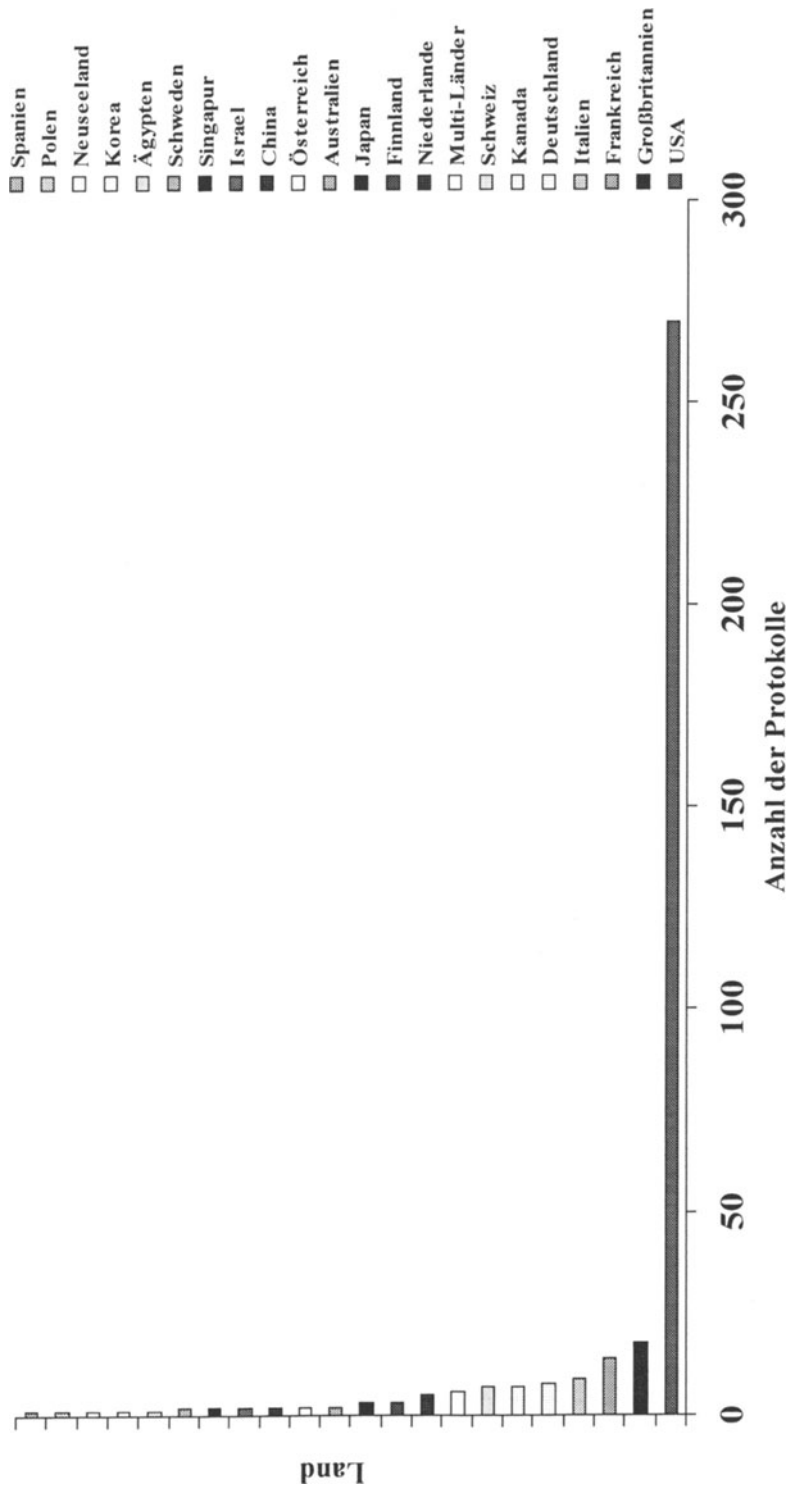


Abb. 10. Protokolle im klinischen Gentransfer weltweit. Länder (Wiley, Stand 1.12.98)

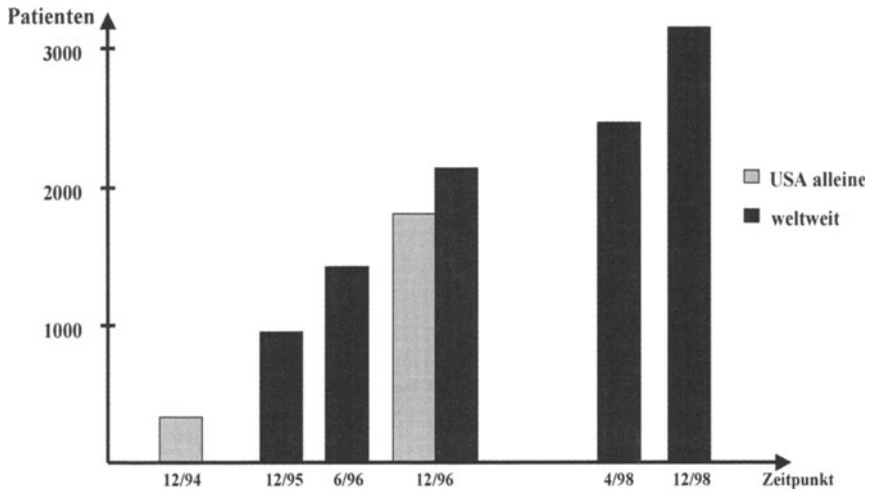


Abb 11. Patienten, die Gentherapie erhielten (TCM-Report 12/1996, Wiley 4/1998 und 12/1998)

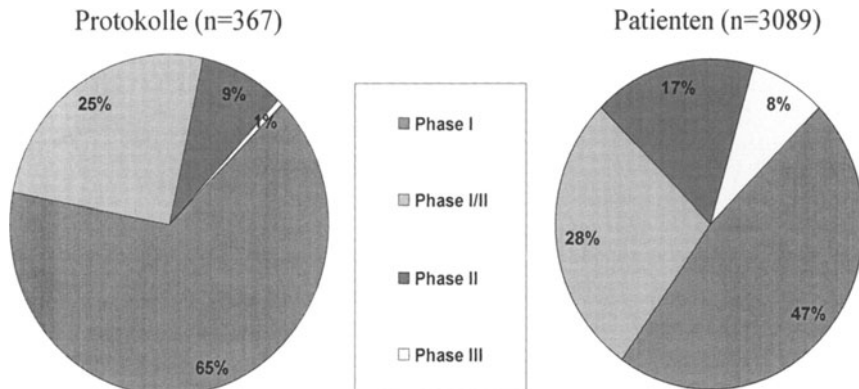


Abb. 12. Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit: Klinische Phasen (Wiley, Stand 1.12.98)

punkte bilden die Behandlungsversuche von malignen, monogenen und infektiösen Erkrankungen, neuerdings finden sich jedoch auch Therapieansätze bei chronischen Erkrankungen aus dem kardiovaskulären und rheumatischen Formenkreis. Bis zum 1.12.1998 wurden weltweit 3089 Patienten in die klinischen Studien eingeschlossen, wobei sich die klinischen Studien bereits in unterschiedlichen Stadien befinden (Abb. 12). Die meisten Behandlungen erfolgte erst seit Anfang 1995 und dementsprechend wenige Daten sind über bisherige Erfolge verfügbar.

## 2.1 Monogene Erkrankungen

Bis 1.12.1998 wurden 286 Patienten im Rahmen von 53 Protokollen gentherapeutisch behandelt. Besonders bedeutend ist der Einsatz beim Adenosin-Deaminase-Mangel (*severe combined immunodeficiency disease*, SCID), beim CFTR-Mangel (Mukoviszidose), beim LDL-Rezeptor-Mangel (familiäre Hypercholesterinämie), beim Faktor IX-Mangel (Hämophilie B) und bei der Chronischen Granulamatösen Krankheit. Ergebnisse liegen weiterhin bei der Fanconianämie, beim Glucocerebrosidase-Mangel (Morbus Gaucher = Glucosylceramid Lipidose) und bei der Aspartoazyklase-Mangel (Canavan-Krankheit) vor. Im folgenden werden diese Erkrankungen einzeln abgehandelt. Weiterhin wurde die Gentherapie auch beim Iduronosulfat-Sulfatase-Mangel (Morbus Hunter = Mucopolysaccharidose Typ II) (1 Studie, 1 Patient), bei der Hämophilie B (1 Studie, 4 Patienten), beim  $\alpha$ -Antitrypsin(AAT)-Mangel (1 Studie, 3 Patienten), bei der Chronischen Granulamatösen Krankheit (3 Studien, 8 Patienten), beim Ornithin-Transcarbamylase(OTC)-Mangel (1 Studie, 5 Patienten) und beim *adult respiratory distress syndrome* (ARDS) aufgrund eines congenitalen Mangels (mindestens 3 Patienten) eingesetzt. Für den Morbus Hurler, das Hunter Syndrom, den Leukozyten-Adhärenz-Mangel, den Purinnukleosid-Phosphorylase(PNP)-Mangel (schwerer selektiver T-Zell-Funktionsmangel), den  $\alpha$ -Iduronidase-Mangel (Morbus Hurler bei Kindern bzw. Scheie-Keratopathie bei Erwachsenen), den Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Mangel (Hereditäre Tyrosinämie) und die Mutation eines Gens der gewöhnlichen Gamma-Globulinkette (X-chromosomale Immundefizienz, *X-linked SCID*) wurden Protokolle entwickelt und genehmigt, in die jedoch bisher wahrscheinlich keine Patienten eingeschlossen wurden.

### 2.1.1 Adenosin-Deaminase-Mangel

Am besten dokumentiert ist die Behandlung des Adenosin-Deaminase-Mangels beim schweren kombinierten Immunmangel (*severe combined immunodeficiency disease*, SCID). Dieses relative seltene Syndrom (1/100.000) ist durch eine weitreichende Funktionseinschränkung des humoralen und Zell-vermittelten Immunsystems gekennzeichnet. Die Folge ist eine erhebliche Anfälligkeit der betroffenen Kinder für gravierende bakterielle, virale und Pilzinfektionen mit oft tödlichem Ausgang. Die Krankheit ist in 25% der Fälle auf ein abnormales Adenosin-Deaminase-Gen zurückzuführen, wobei sie entweder als ein autosomal rezessiver Defekt vererbt wird, sporadisch kommt es auch zu Spontanmutationen. Ohne Behandlung überleben betroffene Kinder meist das erste Lebensjahr nicht.

Die SCID-Krankheit hat zwar schwerwiegende und vielseitige klinische Aspekte, ist jedoch aus genetischen Gesichtspunkt vergleichsweise einfach. Aus diesem Grunde wurde vermutet, daß die Transduktion eines funktionierenden humanen ADA-Gens in die Lymphozyten des betroffenen Patienten ausreichen könnte, eine signifikante klinische Verbesserung oder gar Heilung zu erzielen. Historisch gesehen handelte es sich hierbei auch um die erste Gentherapie-Studie überhaupt, die auf die Heilung einer Krankheit abzielte. Die vorangegangenen Genmarkierungs-

Studien hatten lediglich die Machbarkeit eines somatischen Gentransfers im Menschen gezeigt.

Der Beginn der Behandlung der ersten von insgesamt 16 SCID-Patienten im Rahmen von 7 Protokollen mittels retroviraler Gentherapie erfolgte am 14. September 1990. Ausgewählt wurden ADA-defiziente Kinder, bei denen alternative Therapien, wie die PEG-ADA-Verabreichung, bei der Wiederaufrichtung eines adäquaten Immunsystems versagt hatten. Die 4-jährige Ashanti DeSilva war somit die erste Patientin, die am 14. September 1990 in den USA mittels Gentherapie behandelt wurde (Blaese et al. 1990, Culver et al. 1991). Sie und die anderen Neonaten und Kinder erhielten wöchentliche Injektionen von *ex vivo* gentechnologisch veränderten, autologen Lymphozyten und/oder Knochenmarkszellen. Diese klinischen Studien sind inzwischen in Phase I/II mit unterschiedlichen Target-Optionen: Lymphozyten, CD34+Zellen Blutstammzellen von Neugeborenen.

Für die Therapie der ersten langzeitbeobachteten Kinder von Blaese et al. (1995) wurden periphere Blutlymphozyten gewonnen und *ex vivo* expandiert, mit einem retroviralen Vektor, der das humane ADA-Gen exprimiert und re-infundiert. Dieser Vorgang wurde monatlich wiederholt. Die frühere alternative Therapie mit PEG-ADA wurde mit 50% der ursprünglichen Dosis fortgeführt. Auf ähnliche Weise wie in der amerikanischen Studie erfolgte am 1.8.1995 auch die Behandlung eines Kindes mit ADA-SCID in Japan (Sakiyama 1996a, Sakiyama 1996b, Onodera et al. 1998). Trotz hoher Dosen wurde keine Toxizität beobachtet. Kohn et al. (1993) transduzierten und infundierten Plazenta und Nabelschnurzellen, die natürlicherweise relativ reich an Blutstammzellen sind. Bordignon et al. (1995) verwendeten zwei verschiedene retrovirale Vektoren, wobei ein Vektor für die Transduktion peripherer Blutzellen und der andere Vektor für die Transduktion von Knochenmarkszellen eingesetzt wurde. Somit konnte der Ursprung der transduzierten Zellen später im Patienten verfolgt werden. Auch Hoogerbrugge et al. (1996) zogen die Transduktion von Knochenmarkszellen vor.

Die Expression des transduzierten Gens konnte in bis zu 50 Prozent der Lymphozyten und 10 Prozent der Knochenmarkszellen nachgewiesen werden. Während die Expression in Lymphozyten aufgrund der begrenzten Lebensdauer der Lymphozyten teilweise nur ein Jahr anhielt (Bordignon et al. 1995b) und teilweise auf einem Niveau von 10–20% ADA-positiver Zellen konstant blieb (Onodera et al. 1998), war die Expression in den Knochenmarkszellen noch nach mindestens 18 Monaten (Kohn, 1995) bzw. mindestens drei Jahren stabil (Blaese, 1995; Bordignon et al. 1995b). Als günstig erwies sich die kombinierte Transduktion von peripheren Blutlymphozyten und Knochenmarkszellen, da ein schneller therapeutischer Erfolg durch Veränderung der Blutlymphozyten, die langanhaltende therapeutische Wirkung jedoch nur durch Integration des ADA-Gens in die Knochenmarkszellen erreicht werden kann. Tatsächlich konnte in klinischen Studien gezeigt werden, daß während des ersten Therapiejahres fast alle ADA-exprimierenden Lymphozyten von transduzierten peripheren Blutlymphozyten abstammen, später jedoch durch Lymphozyten ersetzt werden, die aus dem transduzierten Knochenmark abstammen (Bordignon et al. 1995b).

Zwei Jahre nach der Behandlung von Neonaten mit Nabelschnur- und Plazenta-Zellen exprimierten unterschiedliche Zelllinien die ADA-Sequenzen. Vier Jahre nach Infusion von Nabelschnurzellen war die Zahl der ADA-positiven T-Lympho-



zyten auf 1–10% gestiegen, während andere hämatopoetische und lymphozytäre Zellen nur bei 0,01–0,1% lagen (Kohn et al. 1998).

Nicht bei allen Patienten sprach diese Therapie an. Allerdings, während bei einem Kind mit über 50% ADA-positiven Lymphozyten eine Normalisierung des Immunstatus erreicht werden konnte (Blaese et al. 1995), konnte bei 10–20% ADA-positiven Zellen eine vermehrte T-Zellzahl und verbesserte Immunfunktion wie bei heterozygoten ADA+/ADA-Trägern (Onodera et al. 1998) oder in einem anderen Fall selbst bei nur 0,1–1% ADA-positiven Lymphozyten noch ein zufriedenstellender klinischer Zustand erreicht werden (Blaese et al. 1995). Meist konnte die Dosis von PEG-ADA unter Kontrolle der humoralen und zellulären Immunantwort deutlich reduziert werden (Hoogerbrugge et al. 1995; Bordignon et al. 1995b; Kohn et al. 1993). Berichte über toxische Nebenwirkungen liegen bislang nicht vor. Bei keinem der Patienten wurde Helfervirus nachgewiesen. Alle Kinder sind heute bei relativ guter Gesundheit.

### 2.1.2

#### LDL-Rezeptor-Mangel

Durch eine Mutation des Gens für den *Low density lipoprotein*(LDL)-Rezeptor kommt es in etwa 1 von 500 Personen zu der weit verbreiteten, autosomal dominant vererbten familiären Hypercholesterinämie. Bei heterozygoten Trägern manifestiert sich dieser Gendefekt mit einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des Gesamtcholestrinspiegels im Serum, die auf eine Erhöhung des Serum-LDL-Spiegels zurückzuführen ist. Patienten mit zwei mutierten LDL-Rezeptor-Genen (Homozygote für familiäre Hypercholesterinämie) haben sechs- bis achtfach erhöhte LDL-Cholesterinspiegel. Zu Symptomen kommt es typischerweise jedoch nicht vor der dritten oder vierten Lebensdekade. Das wichtigste Kennzeichen ist das Auftreten einer vorzeitigen und erheblich akzelerierten Koronarsklerose, assoziiert mit einer abnormal hohen LDL/HDL Ratio. Myokardinfarkte beginnen in den betroffenen Männern ab der dritten Dekade aufzutreten mit einem Gipfel in der vierten und fünften Lebensdekade. Etwa 1 von 1 Million Personen der Gesamtbevölkerung ererbt zwei Kopien des Gens für die familiäre Hypercholesterinämie und ist somit homozygot für diese Fehlbildung. Die Koronarsklerose beginnt sich oft bereits vor dem 10. Lebensjahr klinisch bemerkbar zu machen, und über Myokardinfarkte im Alter von 18 Monaten wurde berichtet. Außerdem kann es durch Cholesteroleinlagerungen in der Aortenklappe zu symptomatischen Aortenklappenstenosen kommen. Homozygote versterben oft bereits vor dem 20ten Lebensjahr an den Komplikationen von Myokardinfarkten.

Bei bisher 5 Patienten mit homozygotem LDL-Rezeptormangel erfolgte seit dem 11.1.1991 die Behandlung der familiären Hypercholesterinämie mittels Transfer des Gens für den LDL-Rezeptor. Grossmann et al. (1994) publizierten den Fall eines 29jährigen Patienten ohne funktionstüchtigem LDL-Gen. Autologe Hepatozyten werden durch partielle Hepatektomie gewonnen und für den Gentransfer kultiviert. Die Zellen wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor, der das Wildtyp-Gen für den LDL-Rezeptor unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus-*enhancer* und des Beta-Aktin-Promotors des Hühnchens exprimiert. Drei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen in die *Vena mesenterica inferior* re-injiziert. Dieser Patient war der erste von 5 Patienten, die auf diese Art und Weise behandelt

wurden (Grossmann et al. 1995). Die Vektor-DNA wurde 4 Monate nach dieser einmaligen Behandlung mittels *in situ* Hybridisierung in Leberbiopsien nachgewiesen. Es wurde keine immunologische Reaktion gegen diesen Autograft nachgewiesen.

Als Zeichen der partiellen Korrektur konnte im ersten Patienten eine Senkung des LDL-Cholesterinspiegels und der LDL/HDL-Ratio stabil über 18 Monate bewirkt werden, wobei die LDL/HDL-Ratio von vor der Behandlung 10 auf danach 5 zurückging (Grossman et al. 1994, Wilson 1995). Klinisch kam es zu keinerlei Progress der koronaren Herzkrankheit während der 18monatigen Nachbeobachtungszeit. Leberbiopsien mehrere Monate nach Reinfusion der modifizierten Hepatozyten in die Patienten zeigte, daß höchstens 5% der gesamten Leberzell-Population das normale Gen *in vivo* exprimiert (Grossman et al. 1994, Wilson 1995). Trotz dieser minimalen Korrektur konnten in einigen der Gen-Empfängern Veränderungen in LDL-abhängigen Parametern beobachtet werden, die darauf schließen lassen, daß die LDL-Rezeptor-Funktion der Leber teilweise wiedergewonnen wurde.

### 2.1.3

#### Mukoviszidose

Die Mukoviszidose, auch Zystische Fibrose genannt, ist eine autosomal rezessive Störung von exokrinen Drüsen, die typischerweise in der Lunge zu einer Ansammlung von zähflüssigem Schleim, bakteriellen Infektionen und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung mit ausgeprägten Bronchiektasen und parenchymalen Umorganisationen führen. Es handelt sich um die häufigste tödlich-verlaufende genetische Störung, die die kaukasische Rasse betrifft: bei etwa 1 von 2.500 Lebendgeborenen von Kaukasiern, 1 von 17.000 Schwarz-Amerikanern und 1 von 90.000 hawaiianischen Asiaten wird Mukoviszidose diagnostiziert. Das betroffene Gen ist das *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gen lokalisiert innerhalb von ca. 300 kb innerhalb der q21-31 Region von Chromosom 7. Extensive Analysen des CFTR-Gens führte zur Identifizierung von mehr als 200 Mutationen, die meisten davon in den 27 enkodierenden Exonen des 250 kb Gens. Eine Mutation, eine in-Phasen Deletion des Codons für Phe<sup>508</sup> ist für 50–80% aller Mukoviszidosen-Allele verantwortlich.

Bei bisher 230 Patienten wurde im Rahmen von 24 Studien der Transfer des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gens zur Behandlung der Mukoviszidose durchgeführt (European Working Group of Gene Therapy 1996, Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der NIH 1995, Wiley 1998). Die Applikation erfolgt in der Regel lokal über Ärossole oder Bronchoskopie. Der adenovirale Gentransfer wurde bevorzugt (11 Protokolle mit 99 Patienten), da Adenoviren bei der Transfektion einen Tropismus für Lungenzellen (und Leberzellen) haben, oder erfolgte fast so häufig liposomal (10 Protokolle mit 75 Patienten), neuerdings auch mittels adeno-assoziiertem Virus (3 Protokolle mit 36 Patienten).

Die Machbarkeit des adenoviralen Gentransfers wurde erstmals am 17. April 1993 an 4 Patienten im Rahmen einer US-amerikanischen klinischen Studie getestet (Crystal et al. 1994). Hierfür wurden 2 Milliarden Ad-CFTR Vektor *plaque forming units* (pfu) über die nasalen bzw. bronchialen Epithelien verabreicht.

Sieben Tage nach der Behandlung konnten RNA und Protein von CFTR in 14% der Epithelzellen eines der Patienten und CFTR-RNA alleine in einem anderen Fall nachgewiesen werden. Nach 10 Tagen war die Expression des transferierten Gens nicht mehr nachweisbar. In einer anderen Studie verabreichten Zabner et al. (1993) gelösten Ad-CFTR-Vektor durch Kontakt mit Nasenepithelien. Vorübergehend kam es zu einer partiellen Korrektur in allen 3 behandelten Patienten. Die vor der Behandlung gemessene erhöhte transepitheliale Spannung verringerte sich nach der Behandlung gegen Normal. Bei diesen Untersuchungen war es nicht möglich, die genaue Wirkdauer der Therapie zu bestimmen, da zu wenige Zellen mittels Biopsien gewonnen wurden, um CFTR-Protein oder -RNA nachweisen zu können. In einer ähnlichen Untersuchung, in die 12 Patienten eingeschlossen wurden, konnte durch Boucher et al. (1994) die Expression durch den Nachweis von CFTR-RNA bestätigt werden. Transepitheliale Spannungs-Normalisierung wurde ebenfalls beobachtet. Im Rahmen einer Phase I-Studie, die in Frankreich von Bellon et al. (1997) durchgeführt wurde, wurde erneut der von Crystal et al. verwendete Ad-CFTR-Vektor eingesetzt, diesmal in steigenden Dosen über 2 Tage und in 3 verschiedenen Dosierungs-Schemata, wobei alle Patienten mit dem Kontroll-Puffer vorbehandelt wurden. Im Rahmen der Behandlung wurde der Vektor zuerst auf die nasale Mukosa aufgebracht und anschließend über ein Aerosol in die Lunge verteilt. Während der Nachbeobachtung wurden Schleimhautveränderungen mittels Bronchoskopie ausgeschlossen. Interessanterweise erhöhten sich im Rahmen der Virusvektor-Administration die adenoviralen Antikörperspiegel nicht, auch die bronchoalveoläre Lavage war frei von diesen Antikörpern. Während vor der Therapie weder Ad-CFTR-DNA mittels PCR, mRNA mittels RT-PCR und Protein mittels Immunzytochemie nachweisbar waren, fand sich nach der Behandlung DNA über mindestens 21 Tage lang in Nasenbürstbiopsien bzw. über mindestens 15 Tage lang in bronchialen Proben. Ad-CFTR-mRNA fand sich in den Nasen aller Patienten mindestens 15 Tage nach der Behandlung und in den bronchialen Bürstenpräparaten eines Patienten 14 Tage danach. Das CFTR-Protein ließ sich ebenfalls in allen nasalen Proben über 15 Tage und in bronchialen Proben von 2 Patienten nach 7 Tagen nachweisen. Interessanterweise fand sich keine Korrelation zwischen der verabreichten Vektor-Dosis und der Anzahl CFTR-positiver Zellen. In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studien ließ sich adenoviral in einigen Fällen über kurze Zeit (7–10 Tage) eine komplette Korrektur des Proteinmangels, meist jedoch nur eine Verbesserung des Chlorid-Transports auf etwa 25 Prozent der Norm erreichen. Niedrige Dosen erwiesen sich oft als ineffizient und hohe Dosen führten teilweise zu massiven lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen. Hierbei wurde über Fieber, Tachykardie, Hypotonie, Hypoxämie und Lungeninfiltrate aufgrund einer alveolären Entzündung auf der Seite der Vektor-Administration mit Verminderung der vitalen und der totalen Lungkapazität berichtet (Crystal 1995, McElvaney u. Crystal 1995) die allerdings trotz hoher Dosen nicht von allen Gruppen beobachtet wurden (Bellon et al. 1997, Welsh et al. 1995, Zabner et al. 1993). Virale Replikation oder Virus-assoziierte Toxizität wurde nicht beobachtet. Andere Arbeitsgruppen berichten über den molekularen Nachweis des erfolgreichen Gentransfers ohne funktionelle Korrektur im Sinne einer Veränderung des Chlorid-Transports, gerade bei denjenigen Patienten, die die höchsten Virus-Dosen erhielten. Diese Patienten hatten starke lokale Entzün-

dungsreaktionen mit dem Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen Adenoviren im Serum (Boucher, et al. 1994, Knowles et al. 1995). Die Wirkdauer war mit maximal 9 Tagen relativ kurz (Crystal et al. 1994, Hay et al. 1995, McElvaney u. Crystal 1995), so daß wiederholte Applikationen erforderlich sind, die zu einer Sensibilisierung gegen diese ohnehin humanpathogenen Viren führen können. Hohe primäre und sekundäre Antikörperspiegel gegen Adenoviren können wiederum die Effektivität des adenoviralen Gentransfers verringern. Primäre Antikörper gegen Adenoviren wurden bei 50 Prozent der 2-jährigen Patienten und 95 Prozent der 16- bis 34-jährigen nachgewiesen (Huebner et al. 1954). Sekundäre Antikörperspiegel sind weniger gegen die therapeutische Genexpression als vielmehr gegen adenovirale Capsid-Proteine gerichtet (Ginsberg et al. 1984, Horowitz et al. 1990). Der wiederholte adenovirale Gentransfer des CFTR-Gens in 6 Patienten wurde gut vertragen (Zabner et al. 1996, Bellon et al. 1997). Alle Patienten waren initial seropositiv, entwickelten jedoch eine zusätzliche humorale Immunantwort. In einigen der Patienten konnte wiederum eine partielle Korrektur des Chlorid-Transportes im Epithel der Luftwege erreicht werden, allerdings war der therapeutische Effekt mit wiederholter Gabe weniger wirkungsvoll, wohl am ehesten aufgrund einer verstärkten Immunantwort.

Um eine ausreichende Effizienz des Gentransfers unter Vermeidung immunologischer Reaktionen zu erreichen, wandte sich verschiedene Gruppen verstärkt auch dem liposomalen Transfer des CFTR-Gens zu. In einer doppelblinden Studie, die in England von Caplen et al. (1995) durchgeführt wurde, erhielten 15 Patienten intranasal DC-Chol/DOPE kationische Liposomen entweder alleine als Kontrolle oder als Komplex mit dem Expressionsvektor-Plasmid von CFTR unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Bei neun Patienten konnte eine partielle bis hin zu nahezu komplette Korrektur von transepithelialer Spannung und Ionentransport mit einem Maximum nach 3 Tagen und einem Rückgang zum Ausgangsspiegel nach 7 Tagen beobachtet werden. Die Kontrollpatienten besserten sich hingegen nicht. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (Caplen et al. 1995). Interessanterweise wurde bei den meisten Patienten zwar Plasmid-DNA und *messenger* RNA detektiert ohne daß dieser Nachweis mit dem funktionellen Ergebnis korrelierte. Gill et al. (1997) untersuchten weitere 12 Patienten ebenfalls im Rahmen einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie. Acht der Patienten erhielten CFTR-Vektor-DNA unter der Kontrolle eines RSV Promotors und 4 Patienten erhielten Placebo-Vektor, bei dem das CFTR-Gen deletiert war. Der Vektor wurde jeweils als Komplex mit DC-Chol/DOPE Liposomen intranasal eingebracht. Nasale Biopsien 7 Tage nach Transfer waren unauffällig. Ein spezieller Fluoreszenzmikroskopischer Assay zeigte die CFTR-Funktion in 5 von 8 behandelten Patienten und in keinem der Placebo-Patienten. Weiterhin hatten 2 Patienten nach Therapie eine funktionelle Korrektur bei der Messung nasaler Potentiale, einer von Ihnen über 15 Tage. Elektrophysiologische Messungen, die *ex vivo* durchgeführt wurden, zeigten sogar eine Verbesserung in insgesamt 6 Patienten. Die Therapie wurde insgesamt gut vertragen, insbesondere ohne Erhöhung von Antikörper- oder Komplement-Spiegeln (Gill et al. 1997). Auch die dritte liposomale Studie von Porteous et al. (1997) erfolgte doppelblind und Placebo-kontrolliert, sowie randomisiert. Von 16 Patienten erhielten 8 Patienten eine einzige nasale Aerosol-Verabreichung eines CMV Promotor-CFTR/DOTAP-Komplexes, die übrigen 8 Patienten lediglich

Pufferlösung. Wiederum wurde die Therapie entsprechend den klinischen und biologischen Sicherheitsparametern gut vertragen. CFTR-DNA fand sich in den PCR-Untersuchungen nasaler Biopsien 3 und 7 Tage nach der Behandlung in 7 von 8 behandelten Patienten und CFTR-mRNA in der RT-PCR in 2 von den 7 DNA-positiven Patienten. Eine partielle, jedoch anhaltende Korrektur des genetischen Defektes konnte in 2 der 7 DNA-positiven Patienten im Rahmen einer *in vivo* Messung der transepithelialen Potentiale und Fluoreszenz-Assays von Bürsten-Biopsien beobachtet werden.

Um eine längeranhaltende Expression des CFTR-Gens zu erreichen, wurden inzwischen zwei Protokolle mit dem adeno-assoziierten Virus (AAV) als Vektor zugelassen (Flotte et al. 1996). Erste Ergebnisse zeigten keine Inflammations-Reaktionen (Flotte et al. 1995). Limitierend könnte allerdings der Umstand werden, daß nach Applikation über die Luftwege zumindest in Affen auch Vektoren außerhalb der Lungen, insbesondere in der Leber zu finden waren (Flotte et al. 1995).

#### 2.1.4

##### **Fanconi-Anämie**

Die Fanconi-Anämie ist die wahrscheinlich am besten charakterisierte angeborene Knochenmarksfehlfunktion. Sie wurde zum ersten Mal in 3 Brüdern mit einem Syndrom aus physischen Anomalien, Anämie und fettigem aplastischem Knochenmark beschrieben. Es handelt sich um einen autosomal-rezessive Gendefekt, der zu dieser aplastischen Anämie führt. Zellen von Fanconi-Patienten sind besonders empfindlich gegenüber Substanzen wie z.B. Mitomycin C oder Diepoxybutan, die DNA vernetzen können. Hierauf basiert auch die moderne Diagnostik, bei der chromosomale Bruchstellen nach Inkubation von Patientenzellen mit den oben beschriebenen chemischen Klastogenen identifiziert werden. Bei gleichem laborchemischem Defekt können die klinischen Ausprägungen bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich sein. Für Patienten, für die es keine histokompatiblen Stammzell-Spender gibt, bleiben nur supportive Maßnahmen, die einen Tod im frühen Erwachsenenalter nicht verhindern können. Werden Fanconi-Zellen mit dem normalen Gen transfiziert kommt es zu einem Verlust der Hypersensitivität gegenüber Substanzen wie Mitomycin C und zu einem verlängerten Überleben *in vitro*.

Autologe hämatopoetische Stammzellen von 3 Fanconi-Patienten wurden retroviral mit dem normalen Gen transduziert und in 3 bis 4 Zyklen in die Patienten reinfundiert (Liu et al. 1997, Liu et al. 1998). Es konnte eine transiente Vermehrung hämatopoetischer Zellkolonien, hierdurch eine erhöhte Zellularität des Knochenmarks mit vermehrten Vorstufen beobachtet werden. Auch in peripheren Blutzellen war die Korrektur vorübergehend festzustellen (persönliche Kommunikation).

#### 2.1.5

##### **Aspartozyklase-Mangel**

Beim Aspartozyklase-Mangel, der zur Canavan-Krankheit führt, handelt es sich um eine fortschreitende Krankheit, die schließlich zur Zerstörung der Myelin-Ummantelung der Nerven des Gehirns führt. Die seltene Erkrankung war unter anderem Gegenstand im Kinofilm „Lorenzos Öl“.

Diese erstmalige gentherapeutische Behandlung einer neurologischen Erkrankung (neben Hirntumoren) erfolgte bisher innerhalb eines einzigen Protokolles die Injektionsbehandlung von 2 Mädchen, beide unter 2 Jahre alt (During 1996a, During 1996b, Marshall 1996). Die Studie erfolgte in Neuseeland. Verwendet wurde ein adeno-assoziiertes Virus als Vektor in Verbindung mit Liposomen und Polymeren. Bis auf geringes Fieber sei die Therapie gut vertragen worden.

### 2.1.6

#### **Glucocerebrosidase-Mangel**

Der Glucocerebrosidase-Mangel (auch als  $\beta$ -Glucosidase bekannt) führt zu einer Glucosylceramid Lipidose, die auch unter dem Namen Morbus Gaucher bekannt ist. Es ist eine monogene Erkrankung, bei der ein Defekt des Glucocerebrosidase-Gens besteht, was zu einer metabolischen Störung führt. Eine Anhäufung von Glucosylceramid in den Glucocerebrosidase-defizienten hämatopoetischen Zellen, insbesondere den Makrophagen führt klinisch zu Läsionen im Skelett und schwerer Hepatosplenomegalie, neurologischerseits werden mentale Retardierung, Spastik und Ataxie bei Jugendlichen beobachtet. Gravierender ist die Auswirkung bei der kindlichen Form, die durch einen frühen Beginn, ausgeprägte Hepatosplenomegalie und schwere neurologische Progression bis hin zum frühen Tod gekennzeichnet ist. Daneben existiert eine juvenile Form mit einer milderer neurologischen Ausprägung. Der Typ I oder auch non-neuropathische Morbus Gaucher der Erwachsenen ist die am weitesten verbreitete lysosomale Speicherkrankheit. Die Diagnose des Morbus Gaucher sollte durch eine Enzymanalyse und durch eine Mutationsanalyse erfolgen. Alle Formen des Morbus Gaucher haben einen autosomal rezessive Vererbungsmodus und sind Allel-bezogene Störungen. Der Typ I ist 30mal häufiger in Ashkenaze-Juden, mit einer Inzidenz von mindestens 1 Fall pro Tausend Lebendgeburten in dieser Volksgruppe. Die Abwesenheit von neurologischen Beeinträchtigungen ist das Einschlußkriterium für die Typ 1 oder Erwachsenen-Form. Vier Mutationen verursachen 96% aller Glucocerebrosidase-Mutationen in der Ashkenaze-Population.

Bisher erfolgte Gentherapie in mindestens 9 Patienten im Rahmen von 3 Protokollen. Zwei Phase I-Studien erproben die Re-Infusion von Knochenmarkszellen, die mit dem Glucocerebrosidase-Gen transfiziert wurden, (Dunbar et al. 1996). Eine Kombination des dominant selektiven *multi-drug resistance* (MDR)-Gen mit dem nicht-selektiven therapeutischen Glucocerebrosidase-Gen könnte die Therapie durch die Anreicherung *ex vivo* erfolgreich transduzierter Zellen noch effektiver machen.

### 2.1.7

#### **Faktor IX-Mangel**

Der Faktor IX-Mangel bzw. -Dysfunktion, auch als Hämophilie B oder *Christmas disease* bekannt, tritt bei der Geburt von 1 von 100.000 Jungen auf. Faktor IX ist ein einkettiges, 55kDa schweres Proenzym, das durch den Faktor XIa oder den Gewebefaktor-Komplex VII in die aktive Protease IXa konvertiert wird. Die cDNA von Faktor IX wurde kloniert und es wurde das Gen auf dem Chromosom X gemappt, damit verbundene RFLPs identifiziert. Viele Patienten mit Deletionen und Mutationen wurden beschrieben. Erwartungsgemäß beinhaltet die herkömmliche Sub-

stitutions-Therapie die Risiken von Hepatitis, chronischer Lebererkrankung, AIDS, und als Besonderheit der Faktor IX-Substitution, die Aktivierung des Gerinnungssystems durch Spuren von aktivierten Gerinnungsfaktoren im Prothrombin-komplex, die zu Thrombosen und Embolien führen.

Die ersten klinischen Ergebnisse stammen aus Asien. Hautfibroblasten von 2 Patienten mit Hämophilie B wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor transduziert, der für die cDNA des Blutgerinnungsfaktors IX encodiert (Lu et al. 1993). Vor der autologen subkutanen Injektion wurden die Fibroblasten in eine Kollagen-Matrix verpackt. Die Faktor-IX-Spiegel stiegen auf das Doppelte bis Dreifache und stabilisierten sich schließlich in beiden Patienten bei 220 ng/ml während einer 6-monatigen Nachbeobachtungsphase. Die ursprünglich unzureichende Gerinnbarkeit des Blutes verdoppelte sich in nur einem der beiden Patienten und erreichte dabei 6,3%. Auch die klinischen Symptome dieses Patienten besserten sich deutlich. Toxische Zeichen wurden bei dieser Therapieform nicht beobachtet. Die beiden Patienten wurden über 3 Jahre nach der Behandlung beobachtet (Qiu et al. 1996). Es fanden sich in beiden Patienten über 420 Tage erhöhte Plasmaspiegel für humanen Faktor IX im ELISA. Die Blutgerinnungsaktivität erhöhte sich in beiden Patienten signifikant und die Blutungsneigung war teilweise korrigiert. Nach 420 Tagen wurde einer der 2 Patienten erneut behandelt, wobei ein weiterer Anstieg der Faktor-IX-Spiegel erreicht werden kann. Mittlerweile wurden 2 weitere Patienten von derselben Gruppe behandelt. Weitere Ergebnisse liegen noch nicht vor.

### 2.1.8

#### Chronische Granulomatöse Krankheit

Bei der Chronischen Granulomatösen Krankheit handelt es sich um eine seltene Störung von Phagozyten, die mit rezidivierenden lebensbedrohlichen Infektionen verbunden ist. Die Ursache ist ein Defekt der Phagozyten. NADPH-Oxidase (*phox*), die normalerweise ein Superoxid bildet. Die genetische Basis der Chronischen Granulomatösen Krankheit ist heterogen. Die häufigste Form (etwa zwei Drittel der Fälle) ist X-chromosomal mit einer Mutation des *gp91phox*-Genes. Die nächsthäufige Form (ein Drittel der Fälle) ist autosomal rezessiv und aufgrund einer Mutation des *p47phox*-Gens auf Chromosom 7 und die verbleibenden 5% der Fälle haben eine Mutation der Gene für *p22phox* (Chromosom 16) oder *p67phox* (Chromosom 1). Die Knochenmarkstransplantation kann die Chronische Granulomatöse Krankheit heilen, was Hinweis dafür gibt, daß Knochenmarks-Stammzellen für Granulozyten und Monozyten geeignete Ziele für eine Gentherapie sein könnten. Leider war die Knochenmarkstransplantation für diese Erkrankung jedoch mit unakzeptabel hohen Morbiditäts-, Mortalitäts- und Transplantatversagens-Raten assoziiert, ausgenommen Fälle mit HLA-übereinstimmenden Geschwistern als Spendern.

Periphere Blutzellen von 5 Erwachsenen mit auf *p47phox*-Mangel basierender Chronischer Granulomatöser Krankheit wurden *ex vivo* CD34+ selektioniert und mit Hilfe eines retroviralen Vektors für normale *phox47* cDNA transduziert (Malech et al. 1997). Die transduzierten Stammzellen wurden dann den Donoren zurückinfundiert. Es wurde kein myoablatives *conditioning* durchgeführt. Funktionell korrigierte periphere Blut-Granulozyten fanden sich in allen 5 Patienten über durchschnittlich 3 Monate, und bis zu 6 Monate in einem Fall. Die maximale

Korrektur konnte 3–6 Wochen nach der Infusion beobachtet werden, wobei sie zwischen 0,004% und 0,05% der gesamten peripheren Blut-Granulozyten erreichte. Durchschnittlich fand sich in einer von 5000 Zellen *phox*-Aktivität. Inzwischen wurden von dieser Gruppe bereits 8 Patienten mittels Gentherapie behandelt. Obwohl die Autoren erwähnen, daß wahrscheinlich 150mal mehr Zellen korrigiert werden müßten, um einen ausreichenden Schutz gegen die Infektionen zu erreichen, mit der die Chronische Granulomatöse Krankheit assoziiert ist, zeigte diese Studie doch die Dauerhaftigkeit einer solchen Behandlung mit autologen peripheren Blutstammzellen ohne Konditionierung. Mit entsprechenden Perspektiven für die Zukunft. Technisch ist die Verwendung von Tierprotein-freien Seren und der Blutbank-kompatible Standard mit geschlossenen, Gas-permeablen Plastikbehältern erwähnenswert, die möglicherweise für die Praxis der Gentherapie bedeutsam sein könnten.

## 2.2

### Tumorerkrankungen

Singuläre Genmangelerkrankungen sind relativ selten. Aufgrund der Häufigkeit von Tumorerkrankungen ruhen auf der Gentherapie besondere Hoffnungen. Es ist deshalb nicht überraschend, daß die meisten genehmigten Gentransfer-Protokolle maligne Erkrankungen betreffen (230 therapeutische Protokolle mit 2099 Patienten) (Wiley 1998). Bei singulärem Gendefekt oder Genmangel ist die therapeutische Strategie der Transfer intakter Gene. In der Onkologie werden hingegen eine Reihe grundsätzlich verschiedener Therapieansätze unterschieden: Bei der Immuntherapie werden Zytokine und Lymphokine exprimiert bzw. Gene für Histokompatibilitäts-Antigene verabreicht. Weiterhin können Tumorzellen spezifisch gegen bestimmte Medikamente empfindlich (z.B. Suizidgene) bzw. die gesunden Zellen gegen Chemotherapie unempfindlich gemacht werden (Medikamentenresistenzgene). Schließlich können auch mutierte Tumor-Suppressor-Gene ersetzt und Onkogene inaktiviert werden.

Im Rahmen der Immuntherapie wurden bis 19. Juni 1996 im Rahmen von 60 weltweiten Protokollen insgesamt 376 Patienten eingeschlossen. Größere Tumorregressionen, definiert als entweder komplette oder partieller Antwort, wurde in 15 von 237 auswertbaren Patienten beobachtet (Roth u. Cristiano, 1997a).

Die Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber therapeutischen Substanzen, zum Beispiel durch Suizidgene, erfolgte im Rahmen von 21 Protokollen, wobei 104 Patienten eingeschlossen wurden. Eine deutliche Tumorregression war in 8 von 62 Patienten festzustellen (Roth u. Cristiano 1997a).

Eine vermehrte Resistenz gegen Chemotherapeutika zum Schutz gesunder Zellen (vor allem Knochenmarks-Stammzellen) bei der Verwendung höherer therapeutischer Dosen war das Ziel von 8 Protokollen. Derzeit liegen noch unzureichend Daten vor, um eine Aussage über potentielle Erfolge machen zu können (Roth u. Cristiano 1997a).

In 13 Protokollen wurden bis Juni 1996 mutierte Tumor-Suppressor-Gene ersetzt bzw. Onkogene inaktiviert. 78 Patienten wurden insgesamt eingeschlossen, wobei in 6 von 26 auswertbaren Patienten eine größere Tumorregression zu beobachten war (Roth u. Cristiano 1997a).



Problematisch ist, daß sich besonders bei der Erprobung der Immuntherapie nicht immer die Ergebnisse aus den Tierversuchen auf den Menschen übertragen lassen. So z.B. sind die als Target verwendeten humane Tumorantigene bekannt, jedoch nicht immer die des verwendeten Tiermodells, so wie auch die Immunogenität von Onkogenen abstammender Proteine häufig nicht für die Tiermodelle demonstriert wurde.

Besonders häufig erfolgte der Einsatz der Genterapie bei multiplen, metastasierten und somit sehr weit fortgeschrittenen Carcinomen, beim Melanom, Glioblastom, Bronchialcarcinom, colorektalem Carcinom, Leberzellcarcinom, Mammacarcinom, Ovarialcarcinom, Nierencarcinom, sowie bei Leukämien, Lymphomen und beim Multiplen Myelom. Diese Krankheiten werden im folgenden einzeln abgehandelt. Geringere Fallzahlen ohne publizierte Ergebnisse liegen derzeit noch für das Neuroblastom (22 Patienten in 5 Protokollen) und andere Tumore des Zentralen Nervensystems (28 Patienten in 5 Protokollen), Kopf- und Hals-Plattenepithelcarcinom (55 Patienten in 7 Protokollen) und Prostatacarcinom (50 Patienten in 16 Protokollen) vor. Für das Blasenkarzinom, Pancreascarcinom und Keimzelltumoren liegen zwar Protokolle vor, Patienten wurden bisher jedoch nicht eingeschlossen.

### 2.2.1

#### **Melanom**

Das Melanom entsteht in Melanozyten, Pigmentzellen, die normalerweise in der Epidermis, gelegentlich auch in der Dermis vorkommen. Dieser Tumor befällt pro Jahr etwa 32.000 Patienten alleine in den USA, die in 6.700 Fällen zum Tode führt. Die Inzidenz des Melanoms ist dramatisch angestiegen, alleine um 300% in den letzten 40 Jahren. Falls die Inzidenz weiter wie bisher ansteigt, wird das Risiko, im Laufe des Lebens ein Melanom zu bekommen, ungefähr 1% oder mehr betragen. Der Grund für die steigende Inzidenz ist nicht klar, könnte jedoch auf eine vermehrte Sonnen-Exposition im Rahmen von Urlaubsreisen insbesondere im frühen Lebensalter zurückzuführen sein. Individuen mit besonders hohem Melanomrisiko sind jene mit heller Hautfarbe, rotem oder blondem Haar, blauen Augen, Sommersprossen und jene, die nur schwer gebräunt werden und leicht Sonnenbrände erleiden. Andere Faktoren, die mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert sind, umfassen eine Familienanamnese für Melanom, die Präsenz eines atypischen Leberflecks, eines riesigen kongenitalen melanozytären Naevus, eines kleinen bis mittel-großen melanozytären Naevus, einer größeren Anzahl von gewöhnlichen melanozytären Naevi und Immunsuppression. Über ein 64-fach erhöhtes Risiko für Individuen mit mehr als 50 Muttermalen von mehr als 2mm Größe wurde berichtet. Bei stark pigmentierten Menschen kommt das Melanom relativ selten vor.

Das maligne Melanom war eine der ersten Erkrankung, die mittels Genterapie behandelt wurden. Seit dem 22. Mai 1989 erfolgte erstmalig die Infusion von retroviral mit einem Markergen transduzierten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Rosenberg 1992, Rosenberg et al. 1990). In diesem ersten klinischen Protokoll, das 10 Patienten umfaßte, konnte die Durchführbarkeit und Sicherheit einer solchen genterapeutischen Strategie gezeigt werden, die die Basis für das Design weiterer Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mit verbesserter anti-Tumor Wir-

kung zur Behandlung des Melanoms und anderer Tumorerkrankungen werden sollte. Seither erfolgte die gentherapeutische Behandlung in mindestens 523 Melanom-Patienten innerhalb von 50 Protokollen.

Am 29. Januar 1991 wurden die ersten beiden von 4 Melanompatienten mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten retroviral modifiziert mit dem Gen für Tumornekrosefaktor (TNF) behandelt. Günstiger war das Ergebnis offensichtlich, wenn die Patienten gleichzeitig mit Interleukin 2 behandelt wurden (Rosenberg 1992), wobei der Effekt möglicherweise alleine auf den bereits nachgewiesenen Anti-Tumor-Effekt von Interleukin 2 zurückzuführen sein könnte (Rosenberg et al. 1994). Mit Hilfe eines Marker-Gens konnte nach retroviraler Modifikation Tumor-infiltrierender Lymphozyten eine Transfektionseffizienz von 1–26% gezeigt werden, wobei die Gen-modifizierten Lymphozyten noch mindestens 260 Tage nach Reinjektion in den 5 behandelten Patienten nachweisbar waren. Die erhoffte selektive und langanhaltende Retention in den Tumoren blieb jedoch aus (Merrouche et al. 1995). In anderen Protokollen wird auf spezifische und unspezifische Immunantworten auf *ex vivo* Interleukin-transduzierte Tumorzellen abgezielt. Diese Studien basieren auf frühere Untersuchungen, die gezeigt hatten daß durch die Injektion von Interleukin-2 in etwa 20% der Patienten eine komplette Remission erzielt werden konnte (als Übersicht Gänsbacher et al. 1993). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit jedoch mußten hohe Dosen verabreicht werden, die zu ernststen Nebenwirkungen führten. Ziel war es, durch die stabile Expression nach Gentransfer die Nebenwirkungen zu verringern. Nach dem Transfer des Interleukin-4-Gens in Fibroblasten wurde über die Tumor-Infiltration durch CD3<sup>+</sup> und Tumor-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen berichtet (Lotze et al. 1994, Lotze u. Rubin 1995). Nach Behandlung mit dem Interleukin-2-Gen kam es zu einer konsekutiven Vermehrung von CD16<sup>+</sup> natürlichen Killerzellen und tumor-spezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (Belli et al. 1997). Angewendet in 12 weiteren Patienten wurde eine variable und inhomogene Vermehrung der immunophänotypisch unterschiedlichen Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>) beobachtet (Belli et al. 1997). In 4 Patienten kam es zu einer Stabilisierung der Krankheit über 2 bis 6 Monate, in 2 Patienten teils zur Regression und teils zu einem Nichtansprechen der Tumoren im gleichen Patienten. In den übrigen 6 Patienten waren keine Zeichen eines Therapieerfolges zu erkennen. Insgesamt war der therapeutische Effekt somit nur schwach, ebenso wie die lokalen und systemischen Nebenwirkungen. In einem ähnlichen Protokoll, bei dem eine Immunotherapie mit Interleukin-2-transfizierten immortalisierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen erfolgte, konnte im Rahmen einer Phase I Studie in 2 von 6 Melanompatienten eine erhebliche lytische Wirkung der vom Patienten gewonnenen T-Zellen gegen autologe Tumorzellen *in vitro* gezeigt werden. Klinisch kam es während der Behandlungsdauer bei 2 Patienten zu einer vorübergehenden Stagnation der Krankheit (Veelken et al. 1997). Von 12 weiteren Patienten, die mit Interleukin 2 -transduzierten allogenen Melanomzellen behandelt worden waren, zeigten nur zwei einen partiellen therapeutischen Effekt mit Regression von einzelnen Hautknoten, wobei andere Manifestationen von der Therapie unberührt blieben. In 2 Patienten fand sich als Immunantwort ein Anstieg an zytotoxischen T-Lymphozyten. Toxische Nebenwirkungen waren nur gering (Parmiani et al. 1996).

Sun et al. (1998) verwendeten eine Immunisierungsstrategie mit Interleukin-12 genmodifizierten autologen Melanomzellen. In dieser Phase I-Studie wurden 6 Patienten mit terminalem metastasierendem Melanom mit zwei Plasmiden behandelt, die für die p35- und p40-Ketten von Interleukin-12 kodieren. Autologe Tumorzellen wurden hierfür aus Metastasen explantiert, *in vitro* mittels Genkanonen-Behandlung mit beiden Plasmiden transduziert und anschließend bestrahlt. *In vitro* wurde bereits biologisch aktives Interleukin-12 sezerniert. Durch magnetische Anreicherung vor der Bestrahlung ließen sich in den transduzierten Zellen hohe Spiegel erreichen. Die Bestrahlung selbst erhöhte die Sekretions-Spiegel um das zweifache, wodurch im Durchschnitt 987 pg/Tag/Millionen Zellen erreicht werden konnten. Die transduzierten, bestrahlten autologen Zellen wurden 5 bis 6-mal innerhalb einer 6wöchigen Behandlung subkutan re-injiziert. Machbarkeit und Sicherheit dieser Strategie konnten ohne wesentliche Toxizität gezeigt werden, es kam lediglich zu geringem Fieber. In 2 Patienten konnte nach der Immunisierung ein Anstieg Tumor-aktiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) nachgewiesen werden. Zwei Patienten zeigten eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ gegen die transduzierten Zellen. Weder eine komplette noch eine partielle Reaktion konnte erreicht werden, obwohl es bei 3 Patienten zu einer Stabilisierung des Krankheitszustandes kam und ein Patient nach mehreren Monaten eine gemischte klinische Antwort zeigte. Die Metastasen-Biopsien wiesen eine erhebliche Zellinfiltrierung mit CD4+ und CD8+ auf.

Die therapeutische Wirkung von Interleukin-7, und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) wird derzeit noch untersucht (Schadendorf et al. 1995).

Neben der Verabreichung von Zytokinen besteht die Möglichkeit einer Immuntherapie mit Histokompatibilitätsantigenen. Durch die Expression des Klasse I Histokompatibilitäts-Antigen HLA-B7 kann eine erhöhte Immunogenität der Tumorzellen, und damit die Möglichkeit ihrer physiologischen Elimination bewirkt werden (Fenton et al. 1995, Nabel E et al. 1992, Nabel E et al. 1994, Nabel G et al. 1992, Nabel G et al. 1994). Bis jetzt wurde bei mindestens 93 Patienten mit fortgeschrittenem Melanom im Rahmen von 12 Protokollen über eine direkte intratumorale Injektion eines Plasmid-Liposomen-Gemisches des Gens für das HLA-B7-Glykoproteins des Klasse I Histokompatibilitäts-Antigen-Komplexes berichtet. Alle Patienten waren HLA-B7 negativ. In 80–89% der Patienten konnte eine erfolgreiche Gen-Expression nachgewiesen werden (Stopeck et al. 1997, Waddill et al. 1997). Die Injektionen erfolgten teilweise gesteuert durch Computertomographie (Waddill et al. 1997) und in einem Fall als lokale Behandlung mittels eines speziellen Katheters in eine entfernt gelegene Metastase (Nabel E et al. 1994). Berichtet wird von Nabel et al. (1993) über einen deutlichen Rückgang des Tumorzustands, in einem von 5 Patienten sogar über die komplette Elimination zweier injizierter Tumorknoten und weiterer distaler nicht-injizierter Metastasen. Drei bis 7 Tage später konnte dabei in Tumorbiopsien durch Immunhistochemie das HLA-B7 Protein und die dazugehörige transferierte Plasmid-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. In allen 5 Patienten fand sich eine autologe Antitumor- und allogene zytotoxische Lymphozyten-Immunantwort. Stopeck et al. (1997) verabreichten 17 ebenfalls HLA-B7 negativen Patienten mit metastasierendem Melanom aufsteigende Dosen von kationischem Lipid-Vektor als intratumorale Injektionen,

wobei die Dosen 10, 50 und 250 mg DNA zur einmaligen Injektion, und 10 mg zur zwei- bis dreifachen Injektion in 14tägigen Intervallen betragen. Tumorbiopsien wurden vor der ersten Injektion, 2 Wochen und 4 Wochen nach der Injektion in Hinblick auf Plasmid-Präsenz (PCR), Transkription (RT-PCR) und Oberflächenexpression von HLA-B7 Protein mittels Durchfluß-Zytometrie und Immunhistochemie untersucht. Die Proben nach Injektion waren in 93% der Fälle positiv. Als Komplikationen konnten Toxizität, Blutung, Pneumothorax und Hypotension beobachtet werden, wobei diese Komplikationen hauptsächlich auf die technische Durchführung von Injektionen und Biopsien zurückgeführt wurden. Er berichtet über eine meßbare Tumorverkleinerung in 50% der Fälle, mit einer Größenabnahme von mehr als 25% in 7 von 17 Patienten und mehr als 50% in 5 der 7 Patienten. In einem Patienten mit einem einzelnen Tumorknoten kam es zur kompletten Remission. Waddill et al. (1997) sahen eine signifikante Verkleinerung (25%) in 6 von 10 Patienten, wobei ein Patient mit einem solitären Tumor noch 19 Monate nach der Behandlung rezidivfrei war. Über Nebenwirkungen wurde nicht berichtet. In einer nachfolgenden Phase I Studie werden derzeit neue Liposomen, ein Vektor mit verstärkter HLA-B7 Expression und der regelmäßige Einsatz von Kathetern zur lokalen Applikation getestet (Nabel et al. 1995).

## 2.2.2

### **Glioblastom (malignes Astrozytom)**

Maligne Astrozytome oder Glioblastome (auch bekannt als maligne Gliomata oder Stadium III oder IV Astrozytome) und die weniger malignen anaplastischen Astrozytome machen etwa ein Viertel der 5000 in den USA pro Jahr diagnostizierten intrakraniellen Gliomata aus; bei Erwachsenen sogar 75% der Gliomata. Aufgrund der tiefgreifenden und uniformen Morbidität trägt dieser Tumor auf einer Pro-Kopf-Basis mehr als alle anderen Tumoren zu den Behandlungskosten bei. Die Patienten, die in der Regel in der fünften Lebensdekade von dieser Krankheit befallen werden, treten ein in einen Zyklus wiederkehrender Hospitalisationen und Operationen mit zunehmenden Komplikationen und relativ ineffektiver Bestrahlungs- oder Chemotherapie. Es wird vermutet, daß in bestimmten Fällen maligne Zellen aus einer eher benignen Proliferation der Glia entstehen. Weiterhin gibt es seltene Fälle einer familiären Häufung, was auch auf eine genetische Komponente schließen läßt. Wenigstens vier humane Onkogene (*sis*, *myc*, *src*, *n-myc*) wurden aus Zelllinien aus primären Hirntumoren identifiziert., weiterhin werden die Rezeptoren für *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *epidermal growth factor* (EGF) überexprimiert. Geringe Häufungen von Tumoren fanden sich auch in bestimmten Berufsgruppen, insbesondere der Öl-verarbeitenden Industrie.

Insgesamt wurde inzwischen bei mindestens 377 Patienten mit Glioblastomen im Rahmen von 24 Protokollen die Gentherapie eingesetzt. Ergebnisse liegen bei Patienten vor, denen *Herpes simplex* Virus-Thymidinkinase (HSV-*tk*)-Gen-tragende Retrovirus-produzierende Zellen in die Tumore injiziert wurde (Culver u. Blaese 1994). In der Regel erfolgte nach 14 Tagen die systemische Behandlung mit Ganciclovir. In zwölf Läsionen von acht Patienten wurde eine über 25 prozentige Reduktion des Tumolvolumens in der posttherapeutischen Frühphase beobachtet. Bei sechs Läsionen von vier Patienten konnte ein therapeutischer Effekt über vier bis 18 Monate nachgewiesen werden, obwohl das HSV-*tk* Gen nur in sehr wenigen

Zellen detektiert werden konnte (<0,17 Prozent) (Ram et al. 1995). Izquierdo et al. (1997) zeigten an 2 Patienten, daß für Tumoren größer als 100cm<sup>3</sup> eine Suizid-gentherapie alleine mit Thymidinkinase (TK) und Ganciclovir nicht ausreichend ist. Die Überlebenszeit nahm deutlich zu, wenn eine neurochirurgische Tumorverkleinerung zusätzlich zur Suizidgentherapie vorgenommen wurde. Die 2 Patienten wurden deshalb teilreseziert und erhielten eine wiederholte TK/Ganciclovir Gentherapie über ein Ommaya-Reservoir, das über einen Katheter mit der Tumorköhle verbunden war. Elf bzw. 17 Monate nach der Behandlung waren die Patienten noch am Leben. Die Magnetresonanztomographie zeigte ein verbleibendes Tumorwachstum entlang des Tumorbettes. Somit konnten zwar Chirurgie und Gentherapie die Tumorproliferation nicht komplett kontrollieren, sie waren jedoch in Kombination effektiver als jede Therapie für sich alleine. In einem deutschen Zentrum (Weber et al. 1997) wurden deshalb im Rahmen einer Phase II-Studie retrovirale Verpackungszellen mittels stereotaktischer Injektion oder während offener Tumorchirurgie in die Tumoren von Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen nach Tumorverkleinerungsoperation injiziert. Die Mauszelllinie produzierte retrovirale Vektoren, die für das Thymidinkinase-Gen kodieren. Vierzehn Tage nach der Verabreichung von 10<sup>9</sup> Zellen in 50 Einzelinjektionen wurde mit der zweiwöchigen Ganciclovir-Therapie begonnen. Es wurden keine Nebenwirkungen in Bezug auf die intrazerebrale Verabreichung der Mauszellen beobachtet und die Therapie wurde gut vertragen. Über einen Nachbeobachtungszeitraum von 1 Jahr konnte in einem von 10 Patienten eine komplette Remission beobachtet werden und in 5 weiteren überlebenden Patienten immerhin eine noch signifikante Lebensqualität trotz Tumorprogression. Die Kernspangiographie zeigte, daß das Tumorwachstum sich dort fortsetzte, wo eine inkomplette Resektion erfolgt war oder die therapeutische Injektion unzureichend war.

Oldfield et al. (1995) rekrutierten im Dezember 1994 insgesamt 15 Erwachsene mit leptomeningealer Carcinomatose aufgrund von malignen Hirntumoren, wie Glioblastomen, Melanometastasen und Mammacarcinommetastasen, bei denen Vorbehandlungen mittels Chirurgie, Bestrahlung oder Chemotherapie versagt hatten. Ihnen wurden jeweils 1 Milliarde murine PA317 Fibroblasten, die einen TK-retroviralen Vektor produzierten, stereotaktisch *in vivo* in die Tumoren injiziert. Eine Woche nach der Injektion konnte mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, daß Tk sowohl in der Verpackungszelllinie als auch in einigen Tumorzellen exprimiert wurde. Zur Induktion von Zellsuizid wurde wie üblich Ganciclovir für 14 Tage verabreicht. Außer einer transienten Infammationsreaktion in einigen Patienten fanden sich weder Zeichen der Toxizität noch der Enzephalitis. In einigen Patienten kam es zu einer sichtbaren Verkleinerung des Tumolvolumens.

Ein anderer Ansatz, der derzeit in einer Phase I-Studie in Hinblick auf das Glioblastom, sowie fortgeschrittene Ovarial- und Mammacarcinom untersucht wird, ist der Einsatz des *multi-drug resistance* (MDR) Gens in Knochenmarks-Stammzellen (Hesdorffer et al. 1994, Hesdorffer et al. 1998). Hiermit werden wirkungsvollere Dosierungen von Chemotherapeutika möglich, da das Knochenmark gegen die Medikamenten-induzierte Myelodepression geschützt werden kann. Bei insgesamt 5 Patienten, bei denen eine autologe Knochenmarkstransplantation durchgeführt wurde, wurden bis zu einem Drittel hämatopoetische Stammzellen und Knochenmarks-Progenitorzellen MDR-cDNA enthaltenden retrovira-

len Vektor *ex vivo* transduziert und anschließend zusammen mit den nicht-manipulierten Zellen nach der Chemotherapie re-infundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Re-Infusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behandlung. Wahrscheinlich wurden die Zytokin-stimulierten transduzierten Zellen von den anderen gleichzeitig infundierten und nicht-manipulierten Zellen überwuchert. Der Virusüberstand der MDR-Retroviren und alle Patienten-Proben nach Transplantation waren frei von Replikations-kompetenten Retroviren. Es traten weiterhin keine Nebenwirkungen in Bezug auf die Knochenmarkstransplantation auf.

In einem Patienten, bei dem ebenfalls vorangegangene Therapieversuche fehlgeschlagen hatten, wurde bisher Gentherapie mit Interleukin 2 (IL-2) durchgeführt (Sobol et al. 1995). Der Patient erhielt 10 subkutane Immunisierungen mit autologen Tumorzellen und Fibroblasten, die durch retroviralen Gentransfer genetisch modifiziert worden waren, um IL-2 zu sezernieren. Nach der Immunisierung mit Anstieg an CD8+ zytotoxischen T-Zellen fand sich ein anti-Tumor-Effekt mit Tumornekrose-Zeichen in einer Magnetresonanztomographie 4 Wochen nach Behandlung mit der höchsten Therapiedosis.

### 2.2.3

#### **Bronchialcarcinom**

In jedem Jahr werden alleine in den USA mehr als 100.000 Männer und 50.000 Frauen durch das primäre Lungencarcinom befallen. Im Jahre 1997 waren es insgesamt 178.000 neue Fälle und mehr als 160.000 Todesfälle durch das Lungencarcinom. Die meisten von ihnen versterben innerhalb von einem Jahr nach Diagnosestellung, wodurch es mit etwa 30% an erster Stelle der Todesursachen aufgrund von Krebserkrankungen zu stehen kommt. Die Inzidenz des Lungencarcinoms ist zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr am höchsten. Insgesamt ist die Häufigkeit mit der Zeit ansteigend, wodurch sich die Alters-angepaßte Sterberate durch Bronchialcarcinom alle 15 Jahre verdoppelt. Erst durch die Anti-Raucher-Kampagne, die vor 10 bis 20 Jahren begann, kam es zu einer Abflachung der Inzidenz des Lungencarcinoms bei weißen Männern, während die Inzidenz bei Frauen weiter zunahm. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben nur 20% der Patienten ein örtlich begrenztes Carcinom, bei 25% besteht bereits eine Metastasierung in regionale Lymphknoten und 55% haben Fernmetastasen. Selbst bei Patienten mit vermutlich örtlich begrenztem Tumor beträgt das 5-Jahres-Überleben nur 30% für Männer und 50% für Frauen. Diese Überlebensrate hat sich in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich geändert. Somit ist das Lungencarcinom eines der größten Gesundheitsprobleme mit generell besonders schlechter Prognose trotz Einsatzes aller bisher verfügbaren chirurgischen, chemotherapeutischen und alternativen Therapiemöglichkeiten.

Es werden vier Zelltypen bei 95% aller primären Lungentumore unterschieden: Platten- oder epidermoides Carcinom, kleinzelliges Carcinom, Adenocarcinom (einschließlich bronchioloveoläres Carcinom) und großzelliges, anaplastisches Carcinom. Die übrigen umfassen kombinierte epidermoide Adenocarcinome, Carcinoide, Tumoren bronchialer Drüsen (einschließlich Zylindrome und mucocpidermoide Tumore), Mesotheliome und andere seltene Formen.

Neunzig Prozent aller Patienten mit Lungencarcinom aller histologischen Typen sind Raucher, während sich bei den seltenen Nicht-Rauchern mit Lungencarcinom gewöhnlich ein Adenocarcinom findet. Vermutet wird ein co-carcinogener Effekt von Rauchen sowie anderer industrieller oder Umweltgifte wie Radon-gas, das aus natürlichen Ressourcen stammt. Bei Nichtraucherern mit Adenocarcinom der Lunge müssen immer Primärtumore in einer anderen Körperregion ausgeschlossen werden.

Molekular-genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß Lungencarcinomzellen 10 bis 20 genetische Läsionen akkumulieren, die eine Aktivierung von dominanten Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder rezessive Protoonkogene verursachen. Was die dominanten Onkogene betrifft, sind Punktmutationen in der kodierenden Region der *ras*-Familie unter den Onkogenen (insbesondere das *K-ras* Gen beim Adenocarcinom der Lunge) und die Amplifizierung, das Re-Arrangements und/oder Verlust der transkriptionellen Kontrolle der *myc*-Familie unter den Onkogenen (*c*-, *N*- und *L-myc*) gefunden wurden, wobei Veränderungen von *c-myc* beim nicht-kleinzelligen Lungencarcinom und Veränderungen aller *myc*-Familienmitglieder beim kleinzelligen Carcinom bestanden. Tumormutationen von *ras*-Genen sind mit einer schlechten Prognose von nicht-kleinzelligen Tumoren assoziiert und Tumor-Amplifizierungen von *c-myc* mit einer schlechten Prognose kleinzelliger Tumore. Zytopogenetische und Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus(RFLP)-Analysen rezessiver Onkogene (Tumorsuppressorgene) zeigten Deletionen (Allelverlust) der chromosomalen Regionen 1p, 1q, 3p14, 3p21, 3p24-25, 3q, 5q (Gen-cluster der familiären Polyposis), 9p (Gen-cluster von Interferon), 11p, 13q14 (Retinoblastom = *rb*-Gen), 16q, 17p13 (*p53*-Gen) und anderer Lokalisationen. Es gibt offensichtlich mehrere Kandidaten rezessiver Onkogene im Bereich von Chromosome 3p, die nahezu in allen Lungencarcinomen beteiligt sind. Das *p53*- und *rb*-Gen sind in 90% aller kleinzelliger Lungencarcinome mutiert, während *p53* in 50% und *rb* in 20% aller nicht-kleinzelligen Tumore mutiert sind. Mutationen des Gen-clusters für die familiäre Polyposis sind ebenfalls häufig. Zellbiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Lungencarcinomzellen eine große Menge Peptid-Hormone und ihrer Rezeptoren produzieren, die das Tumorzellwachstum autokrin stimulieren können. Nikotin spielt potentiell eine sehr zentrale Rolle in der Pathogenese des Lungencarcinoms. Stark carcinogene Derivate von Nikotin bilden sich im Zigarettenrauch. Alle Typen von Lungencarcinomzellen exprimieren Nikotin-Rezeptoren, die nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptoren gleichen. Somit ist es möglich, daß Nikotin direkt an die Pathogenese des Lungencarcinom beteiligt ist. Das Lungencarcinom weist zwar keinen klaren Mendelschen Vererbungsmodus auf, es gibt jedoch einige Hinweise für eine potentielle familiäre Assoziation. Diese schließen vererbte *rb*- (Patienten mit Retinoblastomen, die bis ins Erwachsenenalter überleben) und *p53*-Mutationen (Li-Fraumeni-Syndrom) ein. Untersuchungen zeigten weiter, daß Verwandte ersten Grades von Lungencarcinom-Patienten ein signifikant (2-3fach) höheres Risiko für Lungencarcinom oder andere Carcinome haben, die häufig nicht mit Rauchen assoziiert sind. Außerdem ist die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung mit einem erhöhten Carcinomrisiko behaftet. Schließlich weisen einige Studien darauf hin, daß es eine Assoziation zwischen dem P450-Enzym-Phänotyp oder -Genotyp und der Entwicklung von Lungencarcinom gibt.

In 9 Protokollen wurden bisher mindestens 73 Patienten mittels Gentransfer behandelt. Target-Gene sind meist p53 und Interleukin-2, sowie Granulozyten/Makrophagen-*colony stimulating factor* (GM-CSF), CD80, Kras und TK. Es liegen Ergebnisse aus 4 Studien vor. In 6 Patienten konnte gezeigt werden, daß ein Reporter gen mittels adenoviralem Gentransfer sicher in Lungentumoren eingebracht und das Gen in den Tumorzellen der Wirte über mindestens 90 Tage exprimiert werden kann. Alle biologischen Flüssigkeiten, die mittels PCR untersucht wurden, waren frei von rekombinantem Virus (Tursz et al. 1996). Gahery-Segard et al. (1997) untersuchten in einer Phase I-Studie die Immunantwort auf Transgen und Virusprodukten nach adenoviralem Gentransfer bei Lungencarcinom.

Zehn Patienten mit Bronchialcarcinom, die bereits maligne Pleuraergüsse aufwiesen, wurden nach Versagen aller konventionellen Therapien mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten behandelt, in die *ex vivo* Interleukin-2 retroviral transfiziert worden war. Die Toxizität war mit transientem geringem Fieber nur sehr gering. In 6 der 10 Patienten kam es innerhalb von mindestens 4 Wochen nicht nur zur Ausbildung von Pleuraergüssen und in einem Patienten kam es nicht mehr zur Rückbildung des Pleuraergusses, sondern zusätzlich zu einer Tumor-Verkleinerung im Computertomogramm (Tan et al. 1996). In einer anderen Studie konnte nach einer „Vakzinations“-Behandlung unter Verwendung von Interleukin-2 transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen bei einem Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom keine Veränderung des Krankheitsverlaufes erreicht werden (Veelken et al. 1997). Am günstigsten waren bisher die Ergebnisse nach direkter Injektion eines retroviralen Vektors mit dem Wildtyp p53 Gen in nicht-kleinzellige Bronchialcarcinome (Roth et al. 1996a, Roth et al. 1996b). Die Phase I-Studie begann 1995 mit der Behandlung eines 60jährigen Mannes mit einem nicht-metastasierten, jedoch nicht-resezierbaren Lungencarcinom. Bestrahlung und Chemotherapie waren ineffektiv gewesen. Er erhielt eine bronchoskopische intratumorale Injektion eines retroviralen Vektors mit dem Neomycin-Resistenz(NeoR)-Gen und dem p53-Tumorsuppressionsgen. Die Vektorpräsenz wurde durch die NeoR-Expression in Biopsien 24 Stunden nach Behandlung bestimmt und betrug etwa 40%. Am Tag 5 begannen sich beide vorbestehende Läsionen in eine entzündliche nicht-carcinöse Fibrose zurückzubilden, wobei bereits 80% am Ende des ersten Monats verschwunden waren. Toxizität durch die Therapie fand sich nicht. Insgesamt wurden 9 Patienten behandelt, bei denen die konventionelle Therapie versagte hatte. Die direkte intratumorale Applikation erfolgte über Bronchoskopie oder kontrolliert durch die Computertomographie. Mindestens 30 Tage nach Transfer ließ sich das therapeutische Gen nachweisen, wobei über 5 Monate keine signifikante Vektor-bezogene Toxizität festzustellen war. Nach der Behandlung ließ sich häufiger als in den unbehandelten Geweben programmierter Zelltod (Apoptose) nachweisen. In 3 Patienten kam es zur Tumorregression und in weiteren 3 Patienten zum Sistieren des Tumorwachstums (Roth et al. 1996b). Inzwischen führte Roth auch eine Studie mit adenoviralem Transfer von p53 durch. Bis zum Abschluß im Juli 1997 wurden bereits 53 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialcarcinom eingeschlossen (Wiley 1998).



#### 2.2.4

##### Mesotheliom

Das maligne Mesotheliom ist ein primäres Neoplasma der mesothelialen Auskleidungen der Pleura- (80%) oder Peritonealhöhlen (19,5%), selten auch der *Tunica vaginalis* des Skrotums. Es wurde ein Zusammenhang mit vorhergehender Exposition mit Asbest gezeigt. Weiterhin kann es mit bestimmten genetischen Prädispositionen und vorangegangenen Virusexpositionen (z.B. *Simian virus 40*) assoziiert sein. Obwohl die Inzidenz relativ selten ist, ist das Mesotheliom für etwa 3.000 Tote pro Jahr in den USA verantwortlich, vergleichbar mit den durch das Hodgkin-Lymphom verursachten Todesfällen. Die Inzidenz ist ansteigend mit einer Rate von 13% in US-amerikanischen Männern und noch schneller in anderen Regionen der Welt, wo die Exposition gegenüber Asbest nicht gut geregelt und überwacht ist. Das mittlere Überleben für Patienten mit Mesotheliom beträgt ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 1 und 2 Jahren, wobei das Überleben für Patienten mit diesem Tumor sehr variabel sein kann. Als Behandlung stehen 3 Standard-Tumortherapien zur Verfügung, die entweder alleine oder in Kombination eingesetzt werden: die chirurgische Resektion, die Bestrahlung und die Chemotherapie. Keine dieser Therapien hat leider bis heute eine effiziente Lebensverlängerung bewirkt. Ein Vorteil ist die einzigartige Zugänglichkeit des Tumors über den Pleuraraum für die Vektorapplikation, und die nachfolgenden Untersuchungen einschließlich Biopsien. Eine Kombination mit einer vorangehenden Tumorverkleinerung erscheint dabei vielversprechender. Ein weiterer Vorteil ist die flächenhafte lokale Ausbreitung, die für die Morbidität und Mortalität der Erkrankung verantwortlich ist, anstelle einer frühen Metastasierung in entlegene Organe. Somit könnten kleine lokale Effekte bereits einen erheblichen Einfluß auf die Prognose haben.

Bisher wurden 33 Patienten in 3 Protokollen eingeschlossen. Eine Phase I-klinische Studie wurden inzwischen abgeschlossen, bei der ein adenoviraler Vektor mit dem *Herpes simplex Virus* Thymidinkinase(HSV-*tk*)-Gen eingesetzt worden war (Albelda 1997). Vorläufige Berichte erwähnen eine nur geringe Toxizität und den molekularen Nachweis es erfolgreichen *in situ* Gentransfers. Auch Serman et al. (1998a) verwendeten in einer Phase I-Studie die Kombination eines adenoviralen Vektors mit dem HSV-*tk*-Suizidgen. Aufsteigende Dosen wurden als intrapleurale Applikationen verwendet, um maximal veträgliche Dosen für diese lokale Therapie herauszufinden. Insgesamt wurden 21 bis dahin unbehandelte Patienten eingeschlossen, wobei Virusdosen von  $1 \times 10^9$  pfu bis zu  $1 \times 10^{12}$  pfu eingesetzt wurden. Es handelte sich um Replikations-inkompetente adenovirale Vektoren mit dem HSV-*tk*-Gen unter der Kontrolle eines *Rous sarcoma Virus*(RSV)-Promotor. Zwei Wochen nach intrapleuraler Applikation erfolgte die systemische Therapie mit Ganciclovir. Die ersten 15 Patienten wurden thorakoskopischen Pleurabiopsien vor und 3 Tage nach Vektor-Applikation unterzogen. Bei den letzten 6 Patienten wurde nur eine Biopsie nach der Vektor-Instillation durchgeführt. Es wurde keine Toxizität erreicht, die die Dosis limitiert hätte. Die Nebenwirkungen waren minimal, mit Fieber, Anämie, transienten Erhöhungen der Leberenzyme, bullösen Hauteruptionen und vorübergehenden systemischen Entzündungsreaktionen bei den Patienten, die die höchsten Dosen erhielten. Erhebliche intrapleurale und intratumorale Immunreaktionen wurden ausgelöst. Insgesamt wurde diese intrapleurale Therapie gut toleriert. Mittels RNA-PCR, *in situ* Hybridisierung, Immun-

histochemie und Immunblots konnte der erfolgreiche Gentransfer zumindest in den hohen Therapiedosen nachgewiesen werden. Die Therapie war dabei allerdings durch die oft fleckförmige und oberflächliche Verteilung des Gentransfers im Bereich des Tumors limitiert. Eine klinische Beurteilung der Patienten in dieser Phase I-Studie war aufgrund der Heterogenität der Patienten bezüglich Alter, Stadium, Histologie und Vektor-Dosis schwierig. Mehrere Patienten mit Carcinomen im frühen Stadium und ein Patient in fortgeschrittenem Stadium zeigten eine Verlangsamung des klinischen und/oder radiologischen Progresses. Allerdings ist die Beurteilung der Tumorprogression beim Mesotheliom schwierig.

Als immunmodulatorische Maßnahme führte eine australische Gruppe eine Phase I-Studie unter Verwendung des rekombinanten Vacciniavirus mit dem humanen Interleukin-2(IL-2) Gen durch (Davidson et al. 1997, Mukherjee et al. 1997). Hierfür wurde ein partiell immun-kompetentes Vacciniavirus verwendet und wiederholt als VV-IL-2-Konstrukt intratumoral in tastbare Tumormassen von Patienten mit fortgeschrittenem malignem Mesotheliom injiziert. Biospien der Tumormassen der Brustwand wurden vor der Therapie und an den Tagen 1–3 sowie 6–8 nach der Vektorinjektion jedes Behandlungs-Zyklus gewonnen. Kulturen von Tumorbiopsien und Blutproben wurde in Hinblick auf Virus-Präsenz und VV-IL-2 Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Das Serum wurde zusätzlich auf Antikörper gegen Vacciniavirus untersucht. Familienmitglieder, Krankenhauspersonal in Kontakt mit den behandelten Patienten und der erste behandelte Patient erhielten Impfungen gegen Vacciniavirus bevor die Gentherapien durchgeführt wurden. Es wurden 4 Patienten mit Brustwandtumormassen durch Mesotheliom in die Studie eingeschlossen. Sie erhielten insgesamt 13 Injektionen von  $1 \times 10^7$  pfu VV-IL-2-Vektor. VV-IL-2-mRNA wurde in den seriellen Tumorbiopsien 3 bis 6 Tage nach Injektion nachgewiesen, wobei die Spiegel reproduzierbar bis zum Tag 8 bis an die Nachweisgrenze abnahmen. In allen Patienten wurden durch die intratumoralen Vacciniavirus-Injektionen signifikante Serumantikörperspiegel induziert. Diese Antikörperspiegel hatten allerdings interessanterweise keinen Einfluß auf das Erscheinungsbild oder die Dauer der VV-IL-2-mRNA-Expression, sie verhinderten lediglich eine Kultur des Virus aus den Tumorbiopsien. Lediglich aus dem Tumor des einzigen Patienten, der keine Impfung erhalten hatte und keine vorbestehenden Antikörpertiter hatte, ließ sich Virus kultivieren. Die Toxizität war bis auf geringes Fieber minimal und es gab keine klinischen oder serologischen Zeichen einer Ausbreitung dieses partiell Replikations-kompetenten Virus als Folge des Patienten-Kontaktes. Bis jetzt wurde in keinem der Patienten eine signifikante Tumorregression beobachtet, lediglich geringe intratumorale zelluläre Immunantworten. Als nächster Schritt ist eine Änderung der Dosis und der zeitlichen Planung bei den Behandlungen vorgesehen.

Eine andere Phase I-Studie kombiniert als Elemente toxische Medikamentenvorstufen mit Immunverstärkungs-Gentherapie (Sternan et al. 1998b). Hier werden allogene bestrahlte Zellen einer Ovarialcarcinomzelllinie nach retroviraler Transfektion mit HSV-*tk* (PA1-STK-Zellen) intrapleural injiziert und anschließend eine systemische Behandlung mit Ganciclovir durchgeführt. Die Rationale hinter dieser Studie ist, daß die PA1-STK-Zellen nach der Instillation in den Bereich des intrapleuralen Tumors migrieren werden und dann als Abtöten der Mesotheliom-Zellen durch einen *bystander*-Effekt nach den Ganciclovir-Infusionen er-

leichtern soll. Das gleiche Behandlungsprinzip wird derzeit von Freeman et al. (1992) bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialcarcinom eingesetzt. Ziel der intrapleurale Therapie ist es, mit aufsteigenden Dosen die maximal tolerierbare Dosis an PA1-STK-Zellen herauszufinden. Für die Applikation wird ein kleiner intrapleuraler Katheter eingelegt. Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor.

### 2.2.5

#### Nierenzellcarcinom

Das Nierenzellcarcinom, auch renales Adenocarcinom oder früher Hypernephrom genannt, macht 85% aller primären Nierenmalignome aus. Ungefähr 25.000 neue Fälle mit etwa 10.000 Todesfällen werden jährlich alleine in den USA diagnostiziert. Der Altersgipfel liegt zwischen 55 und 60 Jahren, wobei die Geschlechterverteilung Männer:Frauen 2:1 beträgt. Risikofaktoren sind Zigarettenrauchen und die Exposition gegenüber Cadmium. Eine vererbare Form des Nierenzellcarcinoms findet sich mit einem hohen Anteil bei Patienten mit Morbus Hippel-Lindau (Hämangiome der Netzhaut und des Zentralnervensystems mit autosomal-dominanter Übertragung). Der genetische Defekt, der mit dieser Erkrankung assoziiert ist, wurde identifiziert. Marker mit chromosomalen Lokalisationen zwischen Chromosom 3 und 8 sowie Chromosom 3 und 11 wurden in einigen Familien mit gehäuftem Nierencarcinom gefunden. Andere zytogenetische Abnormalitäten umfassen veränderte Chromosomen 1,11 und 17. Dialyse-Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz können Nierenzysten und damit assoziierte Nierencarcinome entwickeln. Das Nierenzellcarcinom entsteht in den Epithelien der proximalen Tubuli. Das 5-Jahres-Überleben beträgt je nach Stadium zwischen 60–75% und weniger als 5%. Das Ansprechen auf Chemotherapie beträgt nur etwa 15%.

Bisher wurden mindestens 79 Patienten innerhalb von 6 Protokollen gentherapeutisch behandelt. In 5 Patienten mit Nierenzellcarcinom bzw. metastasierendem Melanom wurden Tumor-infiltrierende Lymphozyten mit Hilfe eines Marker-Gens retroviral transduziert. Die Transfektionseffizienz betrug 1–26%, wobei die Gen-modifizierten Lymphozyten noch mindestens 260 Tage nach Reinjektion nachweisbar waren. Die erhoffte selektive und langanhaltende Retention in den Tumoren fand sich ähnlich wie in den Melanompatienten nicht (Merrouche et al. 1995). In einer Phase I-Studie konnte unter Verwendung von Interleukin-2 transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen gezeigt werden, daß in einem von 3 behandelten Patienten eine preferentielle Lyse autologer und partiell allogener Nierenzellcarcinomzellen bestand. Klinisch konnte bei einem Patienten über 5 Monate während und nach der Immunisierung eine Stabilisierung des Krankheitszustandes erreicht werden (Veelken et al. 1997). Eine weitere Studie zur Immuntherapie mit Interleukin-2 sezernierenden retroviral transduzierten Nierencarcinomzellen wird derzeit von Gänsbacher et al. durchgeführt (Wiley 1998). Weitere Target-Gene sind Interleukin-4, HLA-B7 und GM-CSF, wobei Retroviren und Liposomen als Vektoren Verwendung finden.

### 2.2.6

#### Coloncarcinom

Das Dickdarmcarcinom ist nach dem Lungencarcinom das zweithäufigste Malignom in den USA. Ungefähr 152.000 Neuerkrankungen mit 57.000 Todesfällen

wurden in den USA für das Jahr 1993 vorausgesagt. Die Inzidenz und Mortalität dieses extrem weit verbreiteten Malignoms haben sich in den letzten 40 Jahren nicht wesentlich geändert. Das colorektale Carcinom kommt gewöhnlich in Patienten mit 50 Jahren oder älter vor. Risikofaktoren für die Entstehungen sind bestimmte Ernährungsweisen, vor allem der pro-Kopf-Verbrauch von Kalorien, fleischlichem Protein, Fett und Öl und hereditäre Faktoren und Syndrome im Sinne von hereditären Prädisposition wie die relativ seltenen Polyposis-Syndrome und die wesentlich häufigeren non-Polyposis-Syndrome. Die molekularbiologische Untersuchungen konnte die Deletion des langen Armes von Chromosom 5 (APC Gen) mit der *Polyposis coli* assoziiert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß der Verlust des Genmaterials zu einem Fehlen von Tumorsuppressorgenen führt, deren Genprodukt die Inhibition von Tumorwachstum bewirken würde. Bei nicht-Polyposis Prädispositionen liegt wahrscheinlich eine Abnormalität des Chromosoms 2 zugrunde. Das Dickdarmcarcinom stellt eine nicht seltene Komplikation über viele Jahre bestehender entzündlicher Darmerkrankungen, wie der ulzerativen Colitis und der granulomatöse Colitis, sowie von Polypen dar.

Ein Reihe von molekularen Veränderungen wurden für die DNA adenomatöser Polypen, dysplastischer Läsionen und für Polypen, die mikroskopische Foci von Tumorzellen enthielten (z.B. Carcinoma *in situ*), beschrieben. Vereinbar mit einem viele Schritte umfassenden Prozeß, der schließlich zum Carcinom führt, wurden eine Reihe von Veränderungen beobachtet, die meist mit einer spezifischen Mutation des *ras* Proto-Onkogens beginnen, gefolgt von Deletionen der Chromosome 5, 18 und 17 Abb. 18. Der Verlust von genetischem Material des kurzen Arms von Chromosom 17 ist offensichtlich mit der Aktivierung eines Gens assoziiert, das zu einer Produktion von Transfomations-assoziiertem *p53* führt. Auf diese Weise kann die Alteration des Proliferationsmusters der Colon-Mucosa, die zur Entwicklung eines Polypen und schließlich zu einem Carcinom führt, die Mutationsbedingte Aktivierung eines Onkogens verursachen, gefolgt von und verbunden mit dem Verlust von Genen, die normalerweise die Tumorentstehung unterdrücken. Basierend auf diesem Modell wird angenommen, daß sich das Neoplasma ausschließlich in solchen Polypen entwickeln kann, in denen alle diese Mutationen stattfinden. Vor jeder Resektion sollte *carcinoembryonic antigen* (CEA) bestimmt werden. Kommt es im Verlauf zu einem Anstieg des Markers, besteht der Verdacht auf ein Rezidiv. Die Anwesenheit eines abnormalen DNA Gehaltes (z.B. Aneuploidität) und spezifische chromosomale Deletionen (z.B. sogenannter Allelverlust) von Tumorzellen, wie sie mit Flußzytometrie und Restriktionslängen-Polymorphismus Analyse bestimmt werden können, scheinen mit einem höheren Metastasierungsrisiko verbunden zu sein.

Mindestens 32 Patienten wurden bisher im Rahmen von 11 genterapeutischen Protokollen behandelt. In einer Phase I-Studie konnte unter Verwendung von Interleukin-2 transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen bei zwei Patienten keine Veränderung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden (Veelken et al. 1997). Rubin et al. (1994) verwendeten in ihrer Phase I-Studie eine Immunisierungs-Strategie mit direktem Gentransfer von HLA-B7 in Lebermetastasen des colorektalen Carcinoms. Beim Abschluß der Studie im Jahre 1995 konnte die *in vivo* Expression von HLA-B7 und eine Immunantwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bestätigt werden. Eine Tumorregression fand sich in 6 von 15

behandelten Patienten, 4 Patienten starben jedoch im Rahmen der Tumorprogression. Die Erprobung einer anderen Immunisations-Strategie erfolgt derzeit in zwei weiteren klinischen Protokollen. Carcinoembryonales Antigen (CEA)-exprimierendes rekombinantes Vaccinia-Virus (Tsang et al. 1995) bzw. ein entsprechendes CEA-exprimierendes Polynukleotid (Conry et al. 1996) wird in Tumorpatienten injiziert, wodurch die Produktion von Antikörpern gegen Colonicarcinom angeregt wird, das CEA als Antigen tragen.

### 2.2.7

#### **Leberzellcarcinom (Hepatozelluläres Carcinom)**

Das primäre hepatozelluläre Carcinom ist einer der häufigsten Tumoren der Welt. Es kommt vor allem in Asien und Teilen Afrikas vor, wo die Inzidenz pro Jahr bis zu 500 Fälle pro 100.000 Einwohner beträgt. In Westeuropa und in den Vereinigten Staaten ist es weit weniger vertreten und macht nur 1–2% aller maligner Tumore bei Autopsie aus. Das hepatozelluläre Carcinom ist in Männern bis zu viermal häufiger als in Frauen und entsteht meist in der zirrhotischen Leber. Die höchste Inzidenz ist in der westlichen Welt in der 5. bis 6. Lebensdekade, jedoch 1 bis 2 Dekaden früher in den Regionen Afrikas und Asiens, die eine hohe Prävalenz für das Lebercarcinom aufweisen. Der Hauptgrund für die hohe Inzidenz des hepatozellulären Carcinoms in Teilen Afrikas und Asiens liegt in der Häufigkeit chronischer Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV). Diese chronischen Infektionen führen oft zur Leberzirrhose, was wiederum ein hoher Risikofaktor für das hepatozelluläre Carcinom darstellt; 60–90% dieser Tumore treten in Patienten mit makronodulärer Zirrhose auf. In Patienten mit HBV-Infektionen und hepatozellulärem Carcinom kann die HBV-DNA sowohl in Tumorzellen als auch in umliegenden normalen Hepatozyten in die genomische DNA der Gastzellen integriert sein. Zusätzlich kann es durch insertionelle Mutagenese, chromosomales Rearrangement oder transkriptionelle Transaktivierungs-Aktivitäten des X-Chromosoms und der prä-52/S-Regionen des HBV-Genoms zu Veränderungen der zellulären Genexpression kommen. Diese Veränderungen treten wahrscheinlich begünstigt durch den Prozeß der Leberverletzung- und Reparatur auf. Der Zeitpunkt des Auftretens des hepatozellulären Carcinoms wird durch die Art des Virus beeinflusst: in Asien wird die Hepatitis B bereits bei der Geburt durch eine perinatale Übertragung erworben, während Hepatitis C meist durch Bluttransfusionen im Erwachsenenalter aquiriert werden. Dementsprechend tritt das Lebercarcinom bei den lebenslangen HBV-Infektionen durchschnittlich 1 bis 2 Lebensdekaden früher auf als bei HCV-Infektionen. In Afrika und Südchina ist das Aflatoxin B<sub>1</sub> ein weitverbreiteter Schadstoff. Dieses Mykotoxin scheint eine ganz spezifische Mutation des Codon 249 im Tumorsuppressorgen *p53* zu induzieren. Verlust, Inaktivierung und Mutation des *p53*-Genes wurde mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht und ist die häufigste genetische Störung menschlicher Tumore. Die Krankheit verläuft sehr schnell, ohne Behandlung versterben die Patienten innerhalb von 3–6 Monaten. In einzelnen Fällen kann eine Therapie das Überleben verlängern und gelegentlich bietet die chirurgische Resektion die Chance einer Heilung. Nur wenige Patienten haben jedoch resektable Tumoren oder sie haben bereits entferntgelegene Metastasen, meist in Lunge, Gehirn, Knochen oder Nebennieren. Die Lebertransplantation ist eine alternative

Therapieoption, jedoch limitiert durch Rezidive oder Metastasen, die nach der Transplantation unter Immunsuppression begünstigt auftreten.

Bis zum Studienabschluß wurden 15 Patienten mit primärem hepatozellulären Carcinom im Rahmen einer ägyptischen Studie eingeschlossen (Wiley 1998). Habib et al. (1996) verwendeten perkutane Injektionen von nackter DNA bzw. DNA-Liposomen-Komplex mit dem Gen für das Wildtyp-p53. Ergebnisse aus der Behandlung der ersten 5 Patienten wurden publiziert, wobei sich in 3 der 5 Patienten in der Computertomographie eine Tumorreduktion gezeigt hatte. Gleichzeitig kam es zu einem signifikanten Rückgang der Alpha-Fetoprotein-Spiegel.

### 2.2.8

#### Ovarialcarcinom

Das Ovarialcarcinom liegt in seiner Inzidenz an 5. Stelle aller Tumoren von Frauen und an 3. Stelle der gynäkologischen Tumoren. Unter den malignen gynäkologischen Tumoren verursacht das Ovarialcarcinom die meisten Todesfälle. In den Vereinigten Staaten beträgt das Risiko einer Frau im Laufe ihres Lebens ein Ovarialcarcinom zu entwickeln 1 zu 70. 1992 alleine wurden 21 000 Fälle festgestellt, wobei 13 000 Frauen an dieser Erkrankung verstarben. Keimzelltumoren treten meist innerhalb der ersten 3 Lebensdekaden auf, während sich Stromazelltumoren vom Alter unabhängig entwickeln. Die geringen Symptome im Anfangsstadium führen dazu, daß sich 70% der betroffenen Frauen erst in einem fortgeschrittenen Stadium vorstellen. Die Prognose hängt vor allem von der Histologie ab. Mehr als 85% der Ovarialcarcinome stammen aus dem Epithel, das die Oberfläche der Ovarien bedeckt oder eingeschlossene Zysten umgrenzt, während sich weniger als 15% aus dem Stroma und den Keimzellen der Ovarien entwickeln. Trotz chirurgischer Maßnahmen und konventioneller Chemotherapie überleben langfristig selten mehr als 15–30% der Patientinnen. Die meisten Fälle des epithelialen Ovarialcarcinoms sind sporadisch. Weniger als 5% von Patientinnen mit Ovarialcarcinom gehören zu Familien mit autosomal dominant vererbtem Auftreten von Ovarial-, Mamma-, Endometrium- und Coloncarcinom. Auch beim epithelialen Ovarialcarcinom handelt es sich, wie bei vielen allen Neoplasmen, um einen klonalen Prozeß, der von einer einzelnen Zelle ausgeht. Vier oder 5 Alterationen von Wachstumsfaktoren, Onkogenen oder Tumorsuppressoren können notwendig sein, um das Wachstum zu dysregulieren. Normale oberflächliche Epithelzellen der Ovarien exprimieren *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF  $\beta$ 1), das regelhaft ihr Wachstum inhibiert. Ein Teil der ovariellen Tumorzellen scheint diesen autokrinen inhibitorischen Regulationskreis verloren zu haben. Dagegen exprimieren die meisten ovariellen Carcinome *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF  $\alpha$ ) und *epidermal growth factor receptor* (EGF-R), die sich an die Zellen binden und somit eine autokrine Wachstumsstimulation erlauben. Mit dem Ovarialcarcinom assoziierte Onkogene können ebenfalls für Wachstumsfaktoren oder ihre Rezeptoren kodieren. Das HER-2/*neu* (*c-erbB-2*)-Genprodukt, ein transmembranöser Tyrosinkinase-Wachstumsfaktorrezeptor, wird in einem Drittel der Ovarialcarcinome überexprimiert. Sowohl normale als auch maligne Ovariälepithelzellen sezernieren *macrophage colony stimulating factor* (CSF-1), jedoch nur maligne Zellen scheinen den Rezeptor für diesen Wachstumsfaktor zu exprimieren, enkodiert durch das *fms* Onkogen. CSF-1 ist auch ein starker Chemoattraktor für Makrophagen. Zytokine,

die aus Makrophagen stammen, einschließlich *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1, und Interleukin-6 können das Wachstum von Ovarialcarcinomen stimulieren. Dementsprechend können Tumor-assoziierte Makrophagen eher eine parakrine Stimulation als eine Inhibition von Tumorwachstum bewirken. Bisher wurden keine Abnormalitäten des Retinoplastoma (Rb) oder des Wilmstumor-assoziierten Suppressorgens beobachtet, jedoch ungefähr die Hälfte der Ovarialcarcinome hat die normale Funktion von p53 verloren, bei dem es sich um ein DNA-bindendes Phosphoprotein handelt, das für die normale Wachstumsregulation notwendig ist. Weitere Suppressor-Loci innerhalb der Tumorzellen werden im Rahmen von Studien verlorengangener Heterozygotie verschiedener Loci von Tumorzellen gesucht. Wie in vielen anderen Neoplasmen wird die genetische Instabilität durch aneuploide Karyotypen vieler fortgeschrittener Ovarialcarcinome reflektiert. Unter Verwendung von molekularen Techniken wurde eine Heterozygotie der Chromosomen 1, 3, 6, 11 und 17 beobachtet, wobei jedoch keine einzelne karyotypische Abnormalität charakteristisch für das Ovarialcarcinom festgestellt wurde.

Bisher wurde bei mindestens 38 Patientinnen im Rahmen von 14 Protokollen die Gentherapie eingesetzt. Genehmigte Gentherapie-Protokolle umfassen unterschiedliche Strategien (als Übersicht Barnes et al. 1997) die molekulare Chemotherapie mittels Suizidgenen, die Verstärkung der Immunantwort, die Resistenz gegen Chemotherapeutika und die Neutralisation spezifischer Tumor-eigener Mutationen. Das Suizidgen *Herpes simplex* Virus Thymidinkinase (HSV-*tk*)-Gen wird entweder *ex vivo* in Ovarialcarcinom-Zelllinien retroviral transferiert, die dann intraperitoneal injiziert werden (Link et al. 1995, Freeman et al. 1992) oder mittels adenoviralem Gentransfer direkt appliziert. Bei der Applikation transduzierter Ovarialcarcinomzellen (PA1-STK) wird eine bessere Zellverteilung mit Migration in die Tumoreareale erhofft und damit ein besseres Erreichen der Tumorzellen. Die anschließende systemische Ganciclovirtherapie soll als *bystander*-Effekt neben den transduzierten Zellen auch die Tumorzellen abtöten. Bisher wurden 16 Patientinnen mit bis zu  $10^{10}$  PA1-STK-Zellen behandelt. Innerhalb von 48 Stunden wurden Fieber, Nausea und Adomenscherzen beobachtet (Freeman nicht-publizierte Daten, zitiert in Sterman et al. 1998b).

Als Immunotherapie wird in einem weiteren Protokoll das Gen für einen chimerischen T-Zell-Rezeptor-Antikörper in periphere Blutlymphozyten retroviral transferiert, die dann den Patientinnen verabreicht werden. Dieser Antikörper erkennt ein stark-exprimiertes Antigen ovarialer Adenocarcinom-Zellen, was zu T-Zell-Aktivierung, Zellyse und Zytokinfreisetzung führt. Ebenfalls durch Immuntherapie, über die vermehrte lokale Expression von Zytokinen, wird ein weiterer Therapieversuch unternommen. Hierdurch kann die Tumor-Zytotoxizität vermehrt werden. Ovarialcarcinomzellen werden chirurgisch reseziert, liposomal mit dem Interleukin-2 Gen transfiziert und schließlich nach Bestrahlung und Kryopräservierung nach postoperativer Rekonvaleszenz in ausgewählte Patientinnen injiziert. Experimentell konnte gezeigt werden, daß Cisplatin als einziges getestetes Chemotherapeutikum zur Behandlung des Ovarialcarcinoms die Sensitivität der Tumorzellen für den liposomalen Gentransfer und somit die Transfereffizienz erhöhen kann (Son u. Huang 1994).

Tait et al. (1997) führten in 12 Patientinnen mit rezidivierendem oder metastasierendem Ovarialcarcinom, das bisher nicht auf andere Therapien ansprach, eine Phase I-Studie mit dem Mammacarcinom-Gen BRCA1 durch. Jede Patientin erhielt über einen Katheter an 4 hintereinanderfolgenden Tagen intra-abdominale Infusionen eines BCRA1 retroviralen Vektors. Danach wurde die Behandlung für einen Monat unterbrochen beendet und die Patientinnen in Hinblick auf Tumorprogression nachuntersucht. Bei Tumorprogression wurden weitere Therapiezyklen in 4wöchigen Abständen und maximal 3fach durchgeführt. Hierbei wurden aufsteigende Dosen eingesetzt. Da in die Bauchhöhle große Flüssigkeitsmengen verabreicht werden können, konnte der BRCA1 retrovirale Vektor in Dosen zwischen  $10^8$  und  $10^{10}$  Virionen in bis zu 30 ml verabreicht werden, was in klinischen Studien eine ungewöhnliche Menge ist. Anschließend wurde mit mehr als einem Liter Pufferlösung die Verteilung in der Bauchhöhle sichergestellt, um somit die Chance zu erhöhen, auch kleine Tumor-Foci zu erreichen. Geringe Nebenwirkungen wurden beobachtet; 3 von 12 Frauen erlebten eine Immunreaktion mit erheblichen abdominellen Schmerzen, die innerhalb von 2 Tagen wieder verschwanden. Der Vektor wurde durch das Immunsystem des Körpers nicht sofort zerstört und eine therapeutische Antikörper-Produktion war nur in der höchsten getesteten Dosis zu beobachten. Das BRCA1-Gen und seine Expression wurden in Carcinomzellen detektiert. In 3 von 12 Patientinnen konnte eine Tumorverkleinerung beobachtet werden.

Die Erkenntnis, daß die Transduktion verschiedener Zelllinien mit dem *multi-drug resistance*(MDR)-Gen zu einer Resistenz gegen die bei soliden Tumoren einschließlich Ovarialcarcinom häufig verwendeten myelodepressiven Chemotherapeutika Actinomycin-D, VP-16, Velban, Vincristin, Adriamycin und Taxol führt, legte einen Einsatz bei der Tumorbehandlung nahe. Somit wurden Protokolle zur retroviralen Modifikation von Knochenmarkszellen bei Patientinnen mit Therapie-refraktärem Ovarialcarcinom entwickelt (Deisseroth et al. 1994). Durch die verringerte Myelotoxizität kann die Dosierung von Chemotherapeutika gesteigert werden, so daß bessere therapeutische Chancen bestehen. In einer Phase I-Studie wurde beim Mammacarcinom, sowie fortgeschrittenen Ovarialcarcinom und Glioblastom der Einsatz des MDR-Gens in Knochenmarks-Stammzellen untersucht (Hesdorffer et al. 1994, Hesdorffer et al. 1998). Bei insgesamt 5 Patienten, bei denen eine autologe Knochenmarkstransplantation durchgeführt wurde, wurden bis zu einem Drittel der hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarks-Progentitorzellen mit einem MDR-cDNA enthaltenden retroviralen Vektor *ex vivo* transduziert und anschließend zusammen mit den nicht-manipulierten Zellen nach der Chemotherapie re-infundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Re-Infusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behandlung (siehe auch Kapitel Glioblastom).

Weiterhin besteht noch die Möglichkeit, die Tumor-typische und eng mit der Prognose korrelierende Expression von *erbB-2* durch die adenovirale Transfektion eines Antikörpers (Deshane et al. 1997) oder durch den liposomalen Transfer des den *erbB-2*-Promotor hemmenden *E1a*-Gens zu supprimieren.



### 2.2.9

#### Mammacarcinom

Entsprechend epidemiologischen Daten sind genetische und endokrine Faktoren sowie Umweltbedingungen für seine Entstehung verantwortlich, in 70 bis 80% der Fälle können jedoch keine Risikofaktoren identifiziert werden. In den Vereinigten Staaten beträgt das kumulative Risiko 12%, im Laufe des Lebens ein Mammacarcinom zu entwickeln und 3,5%, daran zu versterben. Besonders hoch ist das Risiko nach dem 50. Lebensjahr und erreicht seinen Gipfel nach dem 75. Lebensjahr. Alle Verwandten von Mammacarcinom-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, selbst ein Mammacarcinom zu bekommen, wobei das Risiko bei Verwandten ersten Grades 2–3fach gegenüber der restlichen Bevölkerung erhöht ist. Bis zu 5% der Mammacarcinom-Patienten haben wahrscheinlich eine spezifische genetische Abnormalität geerbt, die zur Entwicklung des Mammacarcinoms beiträgt. Punktmutationen des *p53*-Suppressorgens im Chromosom 17 zeigen, welche Mitglieder in Li-Fraumeni-Familien einen oder mehr von 6 verschiedenen Carcinomen, einschließlich Mammacarcinom, entwickeln werden. Weiterhin gibt es eine Assoziation zwischen Heterozygotie von Chromosom 17q und dem Mamma-Ovarial-Carcinom-Syndrom. Dieses *BRCA1*-Gen, ist zwar weniger gut charakterisiert, seine Penetranz beträgt jedoch bis zu 85%. Wahrscheinlich sind 1 von 200 bis 400 Frauen der USA Träger dieses Gens. Zusammengenommen kommen diese 2 Genanomalien nur in sehr wenigen Mammacarcinom-Fällen vor, so daß ein routinemäßiges Screening in Frauen ohne deutliche familiäre Belastung in jungem Lebensalter nicht gerechtfertigt erscheint. Die erst vor kurzem gelungene Identifizierung dieser Gene gibt jedoch Hoffnung auf die Auffindung anderer Gene von höherer Prävalenz in den derzeit durchgeführten Untersuchungen.

Eine Reihe von Faktoren und Wachstumsfaktoren ist am Tumorwachstum beteiligt. Hierzu gehören der Anteil mitotischer Zellen und der DNA-Index, sowie erhöhte Spiegel an Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor receptor* (EGF-R) *insulin-like growth factor receptor* (IGF-R), *somastotatin receptor* (SS-R) und *transforming growth factor alpha* (TGF $\alpha$ ), *basic fibroblast factor* (bFGF) und Cathepsin D, *urokinase-plasminogen activator*, das Genprodukt von nm23 und Adhäsionsmoleküle. Für das Mammacarcinom wurden multiple genetische Alterationen beschrieben, einschließlich Allel-Deletionen auf Chromosom 11 oder 13 und Amplifikationen der *c-myc* und *int-2* Gene. In manchen Familien mit hohem Risiko für das Mammacarcinom ist das Tumorsuppressor-Gen *p53* mutiert, außerdem ist die Prognose von Mammacarcinomen schlechter, wenn *p53* überexprimiert ist. Am besten untersucht ist das HER-2/*neu* (oder C-*erbB-2*)-Gen. Die Amplifizierung und Überexpression dieses Gens auf Chromosom 17 ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dies ist insofern nicht überraschend, als der HER-2/*neu* Ligand und Rezeptor mit EGF und EGF-R eng verwandt sind. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die schlechte Prognose von Patientinnen mit Überexpression von Her-2/*neu* ist die Beobachtung, daß die Tumoren dieser Patienten gegenüber bestimmten Formen der Chemotherapie resistent sind. Interessanterweise können diese Tumoren oft besser auf andere Chemotherapieschemata ansprechen, insbesondere solche, die Doxorubicin beinhalten. Bei Her-2/*neu* handelte sich um den ersten Faktor, für den eine Assoziation mit einer Ansprechbarkeit für Chemotherapie gezeigt werden konnte.

Bevor ein Marker routinemäßig in der klinischen Praxis verwendet werden kann, müssen die Nachweis-Methoden in mehr als einem Zentrum nach verschiedenen statistischen Kriterien validiert werden. Dies trifft allerdings auf keinen der neueren prognostischen Faktoren zu, so daß es derzeit noch nicht gerechtfertigt ist, therapeutische Entscheidungen von Ihnen abhängig zu machen.

Bisher wurde bei mindestens 58 Frauen mit Mammacarcinom im Rahmen von 12 Protokollen die Gentherapie eingesetzt. Ähnlich wie für das Ovarialcarcinom werden auch hier Phase I-Studien unter Verwendung des MDR-Gens durchgeführt, um die Sicherheit des Verfahrens und den potentiellen Transfer- und Expressions-Erfolg zu untersuchen. Indikation ist das metastasierende Mammacarcinom (O'Shaughnessy et al. 1994). In einer Phase I-Studie, in die 5 Patienten mit Ovarialcarcinom, Mammacarcinom und Glioblastom eingeschlossen wurden, untersuchten Hesdorffer et al. (1998) den Einsatz des MDR-Gens in Knochenmarks-Stammzellen. Es wurde eine autologe Knochenmarkstransplantation durchgeführt und bis zu einem Drittel der hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarks-Progentitorzellen mit einem MDR-cDNA enthaltenden retroviralen Vektor *ex vivo* transduziert und anschließend zusammen mit den nicht-manipulierten Zellen nach der Chemotherapie re-infundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Re-Infusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behandlung (siehe auch Kapitel Glioblastom). Weitere Target-Gene sind die Gene für Thymidinkinase (TK), Interleukin-2, CD80 und p53 (Wiley 1998). Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor.

### 2.2.10

#### **Hämatologische Tumore: Myeloische Leukämien, Lymphome**

Leukämien sind Neoplasmen, die von hämatopoetischen Zellen abstammen und zuerst im Knochenmark proliferieren, bevor sie in ins periphere Blut, die Milz, Lymphknoten und schließlich andere Gewebe disseminieren. Die Klassifikation der Leukämien erfolgt entsprechend der Zellen ihrer Abstammung (lymphatisch vs. myeloisch) und entsprechend der Geschwindigkeit des klinischen Verlaufes (akut vs. chronisch). Als Ursache für das Auftreten der Leukämie sind genetische und Umweltfaktoren wichtig. Die akute Leukämie tritt mit einer erhöhten Frequenz in einer Reihe von kongenitalen Störungen auf, wie Down-, Bloom-, Klinefelter-, Fanconi- und Wiskott-Aldrich-Syndrome und hat eine erhöhte Konkordanz bei Zwillingen. Bestrahlungsexposition, Patienten mit Bestrahlungstherapien und japanische Überlebende der Atombombenexplosionen haben eine vorhersagbare, Dosis-abhängig erhöhte Leukämie-Inzidenz. Die Bestrahlung erhöht das Risiko für eine chronische myeloische Leukämie (CML), akute myeloische Leukämie (AML) und wahrscheinlich auch akute lymphatische Leukämie (ALL), es gibt jedoch keine bekannte Beziehung zur chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) oder Haarzelleukämie. Die Exposition gegenüber Chemikalien wie Benzole oder anderen aromatischen Hydrokohlenstoffen oder die Behandlung mit alkylierenden Agentien oder anderen Chemotherapeutika führt ebenfalls zu einer erhöhten Inzidenz von einer AML. Die Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie, wie sie bei Patienten mit Morbus Hodgkin eingesetzt wird, hat ein additives Leukämie-Risiko. Wie in anderen Tumoren gibt es auch bei den Leukämien eine

Reihe von genetischen Alterationen, die Entwicklung der Krankheit erforderlich sind. Weiterhin gibt es noch eine Reihe von Oberflächenantigenen, mit denen die verschiedenen Formen der Leukämie differenziert werden können.

Im Gegensatz zu den Leukämien sind maligne Lymphome neoplastische Transformationen von Zellen, die vorwiegend in Lymphgewebe residieren. Die zwei wichtigsten Varianten des malignen Lymphoms sind der Morbus Hodgkin und das non-Hodgkin Lymphom. In den USA werden jährlich etwa 7.500 neue Fälle von Morbus Hodgkin entdeckt, wobei hier vor allem junge Patienten zwischen 15 und 35 Jahren und Patienten nach dem 50. Lebensjahr betroffen sind. Etwa 40.000 neue Fälle von non-Hodgkin Lymphomen werden alleine in den USA jedes Jahr diagnostiziert, wobei die Anzahl altersabhängig ist und zuletzt mit den steigenden Zahlen von AIDS-Fällen stark angestiegen ist. Daneben gibt es noch eine Reihe anderer Krankheiten oder Expositionen, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von malignen Lymphomen assoziiert sind. Auch hier sind eine Reihe von genetischen Alterationen für die Krankheitsentwicklung notwendig. Die genetischen Veränderungen beim Hodgkin Lymphom müssen erst noch beschrieben werden, es sind lediglich die genetischen Alterationen verschiedener histologischer Subtypen des non-Hodgkin Lymphoms bekannt.

Viele der durchgeführten klinischen Gentransferstudien beschränkten sich lediglich auf eine Markierung der transduzierten Zellen, um den Verbleib der meist *ex vivo* retroviral transduzierten Zellen und die Dauerhaftigkeit einer solchen Transduktion mit stabiler Integration in Knochenmarkszellen und peripheren Blutstammzellen zu beobachten. In einem Beispiel der Genmarkierung von solchen Blutstammzellen bei der akuten myeloischen Leukämie fanden sich mittels PCR-detektierbare transduzierte Zellen bis zu 11 Monaten nach Behandlung (Cornetta et al. 1996).

Bisher wurden mindestens 28 Patienten im Rahmen von 12 Protokollen gentherapeutisch behandelt. In einer Phase I Studie zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie konnte unter Verwendung von Interleukin-2 transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen in einem von 2 behandelten Patienten eine Remissionsdauer von 10 Monaten erreicht werden, wobei die erste Remission 14 Monate angehalten hatte (Veelken et al. 1997). Durch den Transfer von Oligonukleotiden gegen das Proto-onkogen *c-myb* sollen chronisch-myeloische Leukämie-Zellen aus Knochenmarks-Proben eliminiert werden, die für die autologe Knochenmarkstransplantation verwendet werden sollen (Hijiya et al. 1994). Weitere Target-Gene, die hier meist retroviral oder als nackte DNA verabreicht wurden, sind das *multidrug resistance* (MDR)-Gen, CD154 und vor allem die Applikation des Thymidinkinase (TK)-Gens.

Die allogene Knochenmarkstransplantation ist ein sehr brauchbares Verfahren generell bei der Immuntherapie von hämatologischen Malignomen und bei einigen nicht-malignen Bluterkrankungen. In den Fällen jedoch, in denen hohe T-Zell-Dosen appliziert werden müssen, kommt es in etwa der Hälfte der Patienten zu einem erheblichen Problem. Allogene Lymphozyten können ein *graft-versus-host disease* (GvHD) auslösen, also einen Angriff der Donorzellen auf Empfänger-Gewebe mit lebensbedrohlichen Folgen. Um sich eine Option zur Eliminierung von Donorzellen zu schaffen, sollte es zu einem GvHD kommen, versuchen Bordignon et al. (1995a; Bonini et al. 1997) fast 100% Donorzellen vor der Transplantation mit

einem Suizidgen (TK) zu transduzieren. Vom Zeitpunkt her gut gewählte Ganciclovir-Therapie sollte dann die allogenen Zellen zerstören, um somit das Risiko für ein GvHD zu verringern, idealerweise sobald die Patienten von der initialen allogenen Antitumor-Antwort profitiert hätten. Weiterhin könnte TK, als Markergen verwendet, wichtige Fragen zum *in vivo* Schicksal von Donorzellen beantworten. Hierfür wurden Donor-Lymphozyten *in vitro* mit einem retroviralen Vektor mit zwei verschiedenen Genen transduziert. In diesem Vektor kontrollieren die *long terminal repeats* (LTR) die Expression eines Öbrflächenproteins, das normalerweise nicht in Blutzellen vorkommt. Es handelt sich hierbei um deltaNGFR, die eine rekombinante Version des *low affinity nerve growth factor receptor* ist. Ein interner *Herpes simplex* Virus-TK-Pomotor kontrolliert die Expression des TK-NeoR-Fusionsproteins. Das deltaLNGFR-Gen erlaubt eine schnelle Zell-Sortierung und Selektion transduzierter Zellen unter Verwendung von anti-LNGFR magnetische Immun-Kugeln. Durch diese Methode gelang es, eine Transduktionsrate von 95–99,6% innerhalb der ersten Selektionsrunde zu erreichen. Über die Ergebnisse der ersten 8 von 12 Patienten wurde berichtet. Alle Patienten hatten zuvor allo-Knochenmarktransplantations-Komplikationen nach Immunmangelbehandlung oder Immuntherapie bei Leukämie. Transduzierte und selektionierte Donor-Lymphozyten wurden Empfängern in ansteigenden Dosen infundiert, bis zu  $4 \times 10^7$  Zellen/kg Körpergewicht. Weder Komplikationen noch Toxizität wurden im Zusammenhang mit dem Gentransfer beobachtet. In einem Patienten wurde eine anti-TK-NeoR-Immunantwort beschrieben. Wiederholt wurden in den 12 Monaten nach der letzten Infusion transduzierte Zellen in Blut, Knochenmarksaspiraten und Biopsien von allen bis auf einen Patienten beobachtet. Ein Patient mit EBV-induziertem Lymphom, entwickelte erstmals nach der Behandlung eine Anti-EBV-Aktivität. *Graft-versus-Leukämie*-Antworten wurden in 5 Patienten detektiert. Zwei Patienten hatten partielle Antworten und 3 erreichten eine komplette Remission, einschließlich 2 Patienten, die keinerlei Chemotherapie erhalten hatten. Einer der beiden partiell reagierenden Patienten blieb für 5 Jahre im chronischen Stadium der CML, wobei zu diesem Zeitpunkt keine transduzierten Zellen mehr nachweisbar waren. Dies traf zeitlich mit dem Übergang in einen Blastenschub zusammen. Der Patient wurde nochmals mit transduzierten allogenen Lymphozyten behandelt und ging wieder in das chronische Stadium über. GvHD wurde in den 3 verbliebenen auswertbaren Patienten beobachtet. Sie wurden mit Ganciclovir-Injektionen behandelt. In einem Patienten konnten trotz ausgedehnter Ganciclovir-Therapie nie alle Donorzellen vollständig entfernt werden. GvHD wurde abgemildert, jedoch nicht beseitigt. In den anderen 2 Patienten zerstörten Ganciclovir-Verabreichungen sämtliche Donorzellen. Eine deutliche Verringerung allogener peripherer Blutlymphozyten von 13% auf PCR-nichtnachweisbare Spiegel wurde beobachtet, ohne jegliche immunsuppressive Therapie bzw. Toxizität. Hierdurch konnte die Immunreaktion komplett unterdrückt werden und alle klinischen und biologischen Zeichen eines GvHD verschwanden in beiden Fällen. Derartige Remissionen aus einem solchen Stadium von GvHD seien in einer internationalen Studie von klassischen Knochenmarkstransplantationen mit 258 Patienten nie aufgetreten.

### 2.2.11

#### **Multiples Myelom**

Das Multiple Myelom stellt eine maligne Proliferation von Plasmazellen dar, die aus einem einzigen Zellklon abstammen. Synonyme für das Multiple Myelom sind Myelom oder Plasmazytom. Der Tumor, seine Produkte und die Immunantwort bewirken eine Reihe von Organdysfunktionen und Symptomen mit Knochenschmerzen oder Frakturen, Nierenversagen, Infektneigung, Anämie, Hypercalcämie, gelegentliche Gerinnungsstörungen, neurologische Symptome und Hyperviskositätsyndrom. Die Inzidenz des Myeloms steigt mit dem Alter, wobei das mittlere Alter bei der Diagnosestellung 68 Jahre beträgt und ein Vorkommen vor dem 40. Lebensjahr selten ist. Die jährliche Inzidenz beträgt 4 auf 100.000 Einwohner, wobei diese Inzidenz in den verschiedensten Ländern der Erde sehr ähnlich ist. Über dem 25. Lebensjahr beträgt die Inzidenz 30 pro 100.000 Einwohner. Im Gegensatz zu den meisten anderen B-Zell-Tumoren konnten in Patienten mit Myelomen keine regelmäßigen chromosomalen Alterationen entdeckt werden. Eine Überexpression der *myc*- oder *ras*-Gene wurden in einigen Fällen beobachtet. Murine Plasmazytom-Modelle lassen vermuten, daß zur Induktion des Plasmazytoms ein fremdes Antigen (z.B. Mineralöl) und ein zelluläres Ereignis erforderlich sind. Somit könnte die chronische Stimulation mit einem Antigen bei der Transformation von bestimmten B-Zell-Klonen eine Rolle spielen. Weiterhin gibt es Hinweise für eine genetische Prädispositionen für das Myelom des Menschen.

In einer Phase I-Studie konnte unter Verwendung von Interleukin-2-transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen bei einem behandelten Patienten keine Veränderung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden (Veelken et al. 1997).

### 2.2.12

#### **Plattenepithelcarcinom von Kopf- und Hals**

Eine der wichtigsten bekannten Konsequenzen chronischer Sonnenexposition sind Melanome und nicht-Melanom Hautcarcinome. Ein Zusammenhang mit den nicht-Melanom Hautcarcinomen ist allerdings wesentlich wahrscheinlicher, da sich etwa 80% aller nicht-Melanom Hautcarcinome in exponierten Hautarealen, wie Gesicht, Hals und Händen, entwickeln. Jährlich entwickeln etwa 400.000 bis 500.000 Personen alleine in den USA nicht-Melanom Hautcarcinome und das Risiko eines Weißen, im Leben ein solches Carcinom zu entwickeln, beträgt mit ansteigender Tendenz derzeit geschätzt etwa 15%. Das Plattenepithelcarcinom ist eine der beiden Formen des nicht-Melanom-Hautcarcinoms und tritt deshalb besonders häufig im Gesicht, und dort wiederum im Bereich von Unterlippe und Ohren auf. Die 3 wichtigsten Schritte der Tumor-Induktion sind die Initiation, Promotion und Progression. Die chronische Exposition von Tierhaut gegenüber Lichtquellen, die Sonnen-UV-Lichtstrahlen imitieren, endet in der Initiation, einem Schritt, bei dem strukturelle Änderungen der DNA durch Mutation zu irreversiblen Veränderungen von Keratinozyten führen, wodurch die Tumorentstehung in Gang gesetzt wird. Es wird angenommen, daß die Exposition gegenüber einem Tumor-Initiator notwendig, aber für einen malignen Prozeß nicht ausreichend ist, da initiierte Hautzellen ohne Exposition gegenüber Tumor-Promotoren in der Regel keinen Tumor entwickeln. Der zweite Schritt in der Tumorentwicklung

ist die Promotion, ein Prozeß aus vielen Schritten, bei dem initiierte Zellen chemischen und physikalischen Agentien ausgesetzt werden. Hierdurch kommt es zu epigenetischen Veränderungen, die zur klonalen Ausbreitung initiiertter Zellen führen. Im Verlauf von Wochen und Monaten folgt ein gutartiges Wachstum von Papillomen. UV-B-Licht ist ein komplettes Carcinogen, was heißt, daß es als Initiator und als Promotor funktionieren, und so Tumoren induzieren kann. Inkomplette Carcinogene können die Tumorentstehung initiieren, benötigen jedoch eine zusätzliche Hautexposition gegenüber Tumor-Promotoren, um einen Tumor zu verursachen. Der Prototyp eines Tumor-Promotors ist der Phorbol-12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat (TPA). Bei der Tumorpromotion sind in der Regel multiple Expositionen über die Zeit notwendig, um einen Tumor zu verursachen. Der letzte Schritt ist die Konversion des benignen Vorläufers in eine maligne Läsion, ein Prozeß, von dem angenommen wird, daß zusätzliche genetische Alterationen in den bereits transformierten Zellen notwendig sind.

Bisher wurden 55 Patienten im Rahmen von 7 klinischen Protokollen eingeschlossen. Target-Gene umfassen vor allem die Gene für *p53*, HLA-B7/b2m, Interleukin-2 und Thymidinkinase (TK). Als Vektoren wurden Adenoviren und Liposomen eingesetzt. Burt et al. (1997) injizierten Patienten mit Plattenepithelcarcinomen von Kopf und Hals, bei denen andere Therapien versagt hatten, intratumoral einen adenoviralen Vektor vom Serotyp 5, der für das Tumorsuppressorgen *p53* (Ad5p53) kodiert. Das Schicksal des Vektors wurde durch die Untersuchung von Plasma- und Urinproben analysiert, wobei mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Primern Vektor-DNA in den Plasma- und Urinproben von 3 Patienten nachgewiesen werden konnte. Weiterhin fand sich nicht-replizierender Ad5p53-Vektor in diesen Proben, wie ein Bioassay zeigte, bei dem Patienten-Flüssigkeiten auf Empfängerzellen *in vitro* einen zytopathischen Effekt hatten. In den positiven Bioassays fand sich auch Adenovirus-Capsid, wie sich in einem Immunoassay zeigte, bei dem das Adenovirus-Capsid durch spezifische Anti-Hexon-Antikörper erkannt wird. Roth et al. (1997a, 1997b) führten eine ähnliche Phase I-Studie durch, in die 30 Patienten eingeschlossen wurden, bei denen ebenfalls konventionelle Therapien versagt hatten. Es handelte sich um eine Studie mit ansteigenden Dosen, bei der jedem der Patienten der Adp53-Vektor injiziert wurde. Bei 17 Patienten mit nicht-resezierbaren Tumoren wurden jeden zweiten Tag intratumorale Adp53-Injektionen vorgenommen, anschließend 2 Wochen nachbeobachtet und einem erneuten Therapie-Zyklus unterworfen. Die übrigen 13 Patienten mit resezierbaren Tumoren erhielten Adp53 jeden zweiten Tag für 2 Wochen, erhielten 3 Tage später eine intraoperative Injektion während der Resektion und eine letzte Injektion 3 Tage nach Resektion. In keinem der 30 Patienten wurden unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet. Die 17 nicht-resezierbaren Patienten erhielten weitere Therapiezyklen bis zur Besserung. Fünf dieser 17 Patienten hatten einen stabilen Verlauf und bei 2 Patienten kam es zu einer partiellen Regression mit einer über 50%igen Reduktion des Tumolvolumens. Zum Zeitpunkt des Berichtes waren 3 der 13 resezierbaren Patienten am Carcinom verstorben und 5 Patienten zeigten ein vollkommenes Verschwinden aller meßbaren Zeichen des Tumors über mehr als 6 Monate nach der Therapie. Ein Patient hatte bereits zum Zeitpunkt der Chirurgie eine komplette Antwort auf Adp53.

### 2.2.13

#### **Knochentumore**

Die Gentherapie wurde bisher lediglich bei einem neuroektodermalen Tumor, dem Ewing-Sarkom eingesetzt. Es handelt sich hierbei um ein malignes Sarkom, das aus kleinen, runden Zellen besteht und am häufigsten in den ersten 3 Lebensdekaden auftritt. Sie sind meistens in den langen Knochen lokalisiert, wobei allerdings prinzipiell jeder Knochen betroffen sein kann. Ein charakteristisches zytogenetisches Merkmal des Ewings Sarkom und verwandter primitiver neuroektodermaler Tumore ist die reziproke Translokation der langen Arme der Chromosomen 11 und 22. Die molekulare Klonierung der Bruchstelle ergab ein chimerisches Protein mit dem *fli-1*-Proto-Onkogen, ein Mitglied der *ets*- Familie unter den Onkogenen, das auf 11q24 lokalisiert ist. Obwohl das Ewing-Sarkom hochmaligne ist, spricht es auf Chemotherapie und Bestrahlung mit Überlebensraten von 60–70% an. In der Regel wird eine Extremitäten-erhaltende Tumor-Resektion mit Chemotherapie kombiniert, während die Bestrahlung bei Metastasierung oder Tumorbefall der Resektionsränder eingesetzt wird. Die Chemotherapie verbessert das Überleben von Patienten mit Ewing-Sarkom, auch einiger, die bereits Metastasen haben.

In einer Pilotstudie wurde von Engel et al. (1998) ein 11-jähriger Junge mit Ewing-Sarkom des linken Halses mit transgenen Interleukin-2 sezernierenden Fibroblasten behandelt. Er hatte bereits 4 Rezidive, die nach bereits durchgeführter chirurgischer Resektion, Chemotherapie, Thermochemotherapie und Bestrahlung auf keine verfügbare Therapie mehr ansprachen. Die Transfektion wurde mit einem Expressionsvektor und kationischen Liposomen durchgeführt. In einem <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitäts-Assay konnte die Lyse von Tumorzellen des Patienten durch IL-2 stimulierte mononukleäre Zellen gezeigt werden. Unter computertomographischer Führung wurden die IL-2 transgenen autologen Fibroblasten intratumoral injiziert. Es fand sich keine lokale oder systemische Toxizität. Die Anzahl der CD3+CD56+ Lymphozytenpopulationen stieg an. Es handelt sich um Zellen, die als Zytokin-induzierte Killerzellen charakterisiert wurden. Andere hämatologische Parameter änderten sich nicht signifikant.

### 2.2.14

#### **Fortgeschrittene komplexe Tumoren**

Hier werden verschiedene weit fortgeschrittene Carcinome zusammengefasst, die sich in einem zunehmend metastasierten und entdifferenzierten Stadium befinden, und nicht mehr reseziert werden können. Es handelt sich vor allem um Mamma-Adenocarcinome, Ovarialcarcinome, Prostatacarcinome, Hirntumore, Nierenzellcarcinome, Melanome, colorektale Adenocarcinome, Lymphome, Lungentumoren, Sarkome und Platenepithelcarcinome von Kopf und Hals (Wiley 1998).

Insgesamt handelt es sich hier um 43 Protokolle, in die bisher 574 Patienten eingeschlossen wurden. Eine Vielzahl von Target-Genen wurde getestet, darunter HLA-B7/b2m, CEA, IL-2, MDR-1, BRCA-1, GM-CSF, IL-12, TNF, IL-7, TK, HLA-A2, HLA-B13, H-2K(k) und CD80. Fast alle in Patienten bisher eingesetzten Transfer-Systeme wurden verwendet. Hui et al. (1997) berichtet über die Ergebnisse der ersten 2 Gentherapie-Studien Singapurs. In eine initiale Phase I-Studie wurden 9 Patienten eingeschlossen, gefolgt von einer Phase I/II-Studie mit 10 Patienten. Alle

19 Patienten hatten rezidivierende Carcinome in einem späten Stadium mit kutanen Metastasen. Sie erhielten 4wöchentlich intranodale Injektionen von DNA-DC-Chol/DOPE kationischen Liposomen zum Transfer der Gene für HLA-A2, HLA-B13 bzw. des xenogenen (murinen) H-2K(k). Die Expression des Transgens wurde in den ersten 3 Patienten mittels RT-PCR von Nadelbiopsien jeweils 1 Woche nach Transduktion verfolgt. Es fanden sich Transkripte für HLA-A2 und HLA-B13 während der gesamten Behandlung, jedoch nicht von H-2K(k). Unter Verwendung von mRNA des *human growth hormone* als interner Standard wurde eine quantitative PCR durchgeführt, wobei sich nach der ersten und zweiten Injektion für HLA-A2 mRNA mindestens 3fache Mengen von denen des HLA-B13 fanden. In den 9 Patienten der initialen Toxizitätsstudie fanden sich keine unerwünschten Nebenwirkungen. In einem Patienten behandelt mit HLA-A2 bildete sich der injizierte Knoten komplett zurück, in einem weiteren Patienten, ebenfalls behandelt mit HLA-A2, fand sich eine teilweise Regression. In den anderen Patienten, die mit HLA-A2, HLA-B13 oder H-2K(k) behandelt worden waren, fand sich keine Therapieantwort. In der nachfolgenden Phase I/II-Studie wurden Frauen mit terminalen Ovarial- oder Cervix-Carcinomen eingeschlossen, bei denen alle klassischen Therapieformen versagt hatten. Die Genterapie wurde wie in der initialen Phase I-Studie durchgeführt. Es wurden keine kompletten Regressionen beobachtet, die Hälfte der Patienten jedoch zeigten eine partielle lokale Antwort mit einer Schrumpfung auf mindestens die Hälfte der Größe. Eine partielle Antwort wurde meist nach allogener HLA-A2-Transduktion beobachtet, aber auch nach allogener HLA-B13- und xenogener H-2K(k)-Transduktion. Entferntgelegene unbehandelte Knoten bildeten sich in keinem der Patienten zurück und alle 19 Patienten erlebten eine weitere systemische Progression. Kontroll-Injektionen mit DNA-freien Liposomen in Knoten zeigten keine lokale Antwort. Offensichtlich war auch hier die Therapie mit HLA-A2 den anderen Therapien überlegen. Beide Studien zusammen genommen zeigten sich unter HLA-A2 2 komplette Remissionen von behandelten Knoten, sowie in 5 von 6 Ovarial- und Cervixcarcinom-Patientinnen eine lokalbegrenzte, jedoch signifikante Tumorgößen-Reduktion. Bei dem größten der behandelten Tumoren fand sich keine therapeutische Antwort, möglicherweise als Hinweis dafür, daß die Tumorgöße für die Kurabilität ein wichtiger Parameter für dieses Protokoll ist. Möglicherweise war die bessere Transkriptionseffizienz *in situ* ausschlaggebend, da die initial nachgewiesenen HLA-A2 mRNA Mengen die höchsten waren. Eine andere, nicht alleine entscheidende Möglichkeit war, daß HLA-Gene des A Locus immunogener sind als die des B Locus. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) der Patientin mit Cervixcarcinom, bei der eine komplette Regression ihres HLA-A2 behandelten Knotens erreicht worden war, wurden *in vitro* untersucht. Sie wurden entweder mit nichtmodifizierten oder mit HLA-A2-exprimierenden autologen Tumorzellen stimuliert und dann in Hinblick auf die Zerstörung von autologen Tumorzellen beobachtet. Nach Stimulation mit HLA-A2 modifizierten Zellen bewirkten sie eine 3 bis 4fache Zerstörung als nach Stimulation mit nicht-modifizierten Zellen. Jantschkeff et al. (1997) schlossen in eine französisch-schweizerische Phase I-Studie 9 Patienten ein, die metastasierend solide Tumoren hatten. Vero-Zellen wurden *in vitro* mit einem humanes Interleukin-2 (IL-2)-exprimierenden Plasmid transfiziert. Diese transduzierten xenogenen Zellen wurden den Patienten mittels Ultraschall- bzw. Computertomographie-gesteuerter Injek-



tion verabreicht. In 3 verschiedenen Kohorten wurden steigende Dosen von  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  Zellen verwendet. Die Injektionen wurden an den Tagen 1, 3 und 5 der Behandlung verabreicht, und eine Reihe Faktoren wurden vor, während und nach der Behandlung bestimmt. Dazu gehörten die T-Zell-Zusammensetzung in Tumor-Biopsien und Blutproben der Tage 1, 5 und 15 der Behandlung, CTL-Aktivität, Zytokin-Expression, anti-Vero-Antikörper und IL-2-Expression. Die Behandlung wurde gut vertragen. Eine transiente Toxizität in Form von Fieber wurde in einem Patienten und als Juckreiz und Erythem in 2 weiteren Patienten beobachtet. Bis auf anti-Vero-Antikörper in 2 Patienten wurden keine hämatologischen Veränderungen beobachtet. Zusammenfassend, konnten  $5 \times 10^5$  Vero-IL-2-Zellen sicher verabreicht werden, wobei sich nachweisbar biologische und klinische Veränderungen fanden. In den Tumorbiopsien wurde eine verstärkte Zytokin-Expression und/oder Infiltration der Tumoren mit Lymphozyten-Subpopulationen in 8 von 9 Patienten und Abnahme dieser Parameter in 3 von 9 Patienten ohne klares zuordenbares Verteilungsmuster. In einem Patienten mit Weichteilgewebe-Sarkom maverkleinerte sich eine entfernt-gelegene nicht-injizierte Metastase um 90% innerhalb von mehr als 12 Monaten. In 4 Patienten konnte die Erkrankung für 3, 7, mehr als 7 und 9 Monate zum Zeitpunkt des Berichtes stabilisiert werden. Makensen et al. (1997) berichten über eine Phase I-Immunisierungs-Studie, im Rahmen derer zwei Melanom-Patienten lethal bestrahlte autologe Tumorzellen gemischt mit IL-2-sezernierenden allogenen Fibroblasten injiziert wurden. Die Fibroblasten waren zuvor *in vitro* mit dem IL-2-Gen transfiziert worden. Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und Lymphozyten, die die Injektionsstelle infiltrierten, wurden analysiert. In beiden Patienten waren in einem Funktionstest die Zahlen auf MHC-I beschränkter CTLs an der Injektionsstelle erhöht. Sequenzierungsstudien zeigten, daß die gleiche Art von CTLs sowohl im Tumor wie an der Injektionsstelle erhöht waren. Insbesondere TCRBV21S3+ Zellen spielten bei der zytotoxischen Aktivität gegen autologe Tumorzellen eine Rolle. Es wird vermutet, daß die CTLs aus dem Tumor an die Injektionsstelle zirkulieren, wo sie weitervermehrt werden. Eine Amplifikation wurde vermutet, da TCRBV21S3+ Zellen an der Injektionsstelle nachweisbar waren und eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ vorhanden war. Beide waren vor der Behandlung nicht nachweisbar gewesen.

## 2.3

### Infektionskrankheiten

Bisher wurden insgesamt mindestens 405 AIDS-Patienten im Rahmen von 29 Protokollen gentherapeutisch behandelt. In einem weiteren Protokoll zur Behandlung von Influenza wurden bisher keine Patienten eingeschlossen.

#### 2.3.1

##### **Human immunodeficiency virus (HIV)-Infektion/ Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)**

Die 90iger Jahre stellen bereits die 2. Dekade der HIV/AIDS Pandemie dar. HIV ist ein Retrovirus der Lentivirus-Familie und wurde früher *lymphadenopathy associated virus* (LAV), *human T lymphotropic virus III* (HTLV-III) oder *AIDS-associated retrovirus* (ARV) genannt. Beobachtungs-Studien unter Verwendung dieses Tests

und das Monitoring der Anzahl von CD4+ Zellen als Parameter für die Immunsuppression führte zur Entdeckung eines breiten Spektrums von HIV-Erkrankungen, von asymptomatischen Gruppen bis hin zu fortgeschrittener Erkrankung, die als AIDS bezeichnet werden. Während die Krankheit noch zu Beginn der 80er Jahre auf Risikogruppen beschränkt war, finden sich in den 90er Jahren bereits Fälle in allen Bevölkerungsgruppen. Die 4 anerkannten humanen Retroviren gehören zu zwei verschiedenen Gruppen: die humanen T-lymphotropen Viren HTLV-I und II und die humanen Immundefizienz-Viren HIV-1 und HIV-2. Die am weitesten verbreitete Ursache für die HIV-Infektion ist das HIV-1. HIV-2 wurde erstmals 1986 in westafrikanischen Patienten identifiziert, wurde inzwischen aber auch in Europa, Südamerika, Canada und den USA beobachtet. Trotz einer Nukleotidsequenz-Homologie von 40% gegenüber dem HIV-1 ist es phylogenetisch sehr viel mehr mit dem *simian immunodeficiency virus* (SIV) verwandt. Ein Kernpunkt des Lebenszyklus im Rahmen einer HIV-Infektion ist die reverse Transkription genomischer RNA in DNA mit Hilfe eines Enzyms, genannt reverse Transkriptase. Der HIV-Lebenszyklus beginnt mit der Bindung des gp120-Proteins via eines Anteils seiner VI-Region nahe des N-Terminus mit hoher Affinität an den Rezeptor auf der Oberfläche der Gastzelle, das CD4-Molekül. Das CD4-Molekül ist ein Protein, das sich vorwiegend auf einem bestimmten Subtyp von Lymphozyten findet, die für die Helfer- oder Induktionsfunktion bei der Immunantwort verantwortlich sind. Weiterhin wird es auf der Oberfläche von Zellen der Monozyten/Makrophagen Linie exprimiert. Nach der Bindung erfolgt via dem gp41 Molekül die Fusion mit der Membran der Gastzelle, die genomische HIV-RNA wird von der Hülle befreit und internalisiert. Die reverse Transkriptase, die sich bereits im Virion befand, katalysiert die reverse Transkription der genomischen RNA in doppelsträngige DNA. Die DNA migriert zum Zellkern wird dort in die Chromosomen der Gastzelle integriert, und zwar mit Hilfe eines anderen viralen Enzyms, der Integrase. Die Inkorporation dieses sogenannten Provirus in das Zellgenom ist permanent. Dieses Provirus kann inaktiv (latent) bleiben oder eine umfangreiche Genexpression mit aktiver Virusproduktion auslösen. Ähnlich wie andere Retroviren besteht auch das HIV-1 aus Genen, die die viralen Strukturproteine enkodieren: *gag* enkodiert die Proteine, die den Viruskern formieren (einschließlich p24 Antigen); *pol* enkodiert die Enzyme verantwortlich für die reverse Transkription und Integration; und *env* enkodiert die Glykoproteine der Virushülle. Das HIV-1 ist jedoch komplexer als andere Retroviren indem es noch mindestens sechs andere Gene enthält (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*), die die Proteine enkodieren, die für die Regulation der HIV-Expression verantwortlich sind. Diese Gene werden von den *long terminal repeats* (LTRs) flankiert, die die regulatorischen Elemente für die Genexpression enthalten, wie das Polyadenylierungssignal-Sequenz, die TATA-Promotor-Sequenz, das NF- $\kappa$ B und SP1 *enhancer binding sites*, die *transactivating response* (TAR)-Sequenzen, wo das *tat* Protein bindet und das *negative regulatory element* (NRE) mit dessen Deletionen die Stärke der Genexpression verstärken. Der Hauptunterschied der Genome von HIV-1 und HIV-2 ist, daß HIV-2 das *vpu*-Gen nicht besitzt, dafür jedoch ein *vpx*-Gen, das in HIV-1 nicht vorkommt.

Häufig werden Gentherapie-Studien für die Behandlung von AIDS durch US-amerikanische Pharmafirmen durchgeführt, deren unabhängige Studien nicht

notwendigerweise durch das *Recombinant DNA Advisory Committee* registriert werden. Bisher wurden im Rahmen von 29 Protokollen 405 AIDS-Patienten gentherapeutisch behandelt.

Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte mit Markergenen gekennzeichnete CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Re-Infusion bis zu 10 Monate überlebten (Walker et al. 1995). Sie könnten somit die Ausgangsbasis für genetisch modifizierte T-Zellen zur Therapie oder Prävention von HIV-Infektionen sein. Während bereits zahlreiche potentiell therapeutisch günstige Gene zur Verfügung stehen, besteht die wesentliche Limitierung derzeit noch in der Unfähigkeit, zu einem signifikanten Anteil reifer, autologer CD4<sup>+</sup> Zellen Zugang zu bekommen bzw. sie zu transfizieren, da es sich hier um diejenigen Zellen handelt, die bereits durch das HIV zerstört wurden. Ziel einer Phase I-Studie war es deshalb, basierend auf diesen Marker-Studien, die Herstellung von HIV-spezifischen T-Zellen zur Verstärkung einer Immunantwort gegen das Virus. CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HIV-freien Zwillingen werden mit dem Gen eines Antigen-spezifischen chimerischen T-Zell-Rezeptors transduziert und in den HIV-infizierten Zwillingenbruder oder -Schwester infundiert (Walker et al. 1995). Dieser chimerische Rezeptor besteht aus einer CD4-Domäne fusioniert mit einem Anteil des T-Zell-Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, daß die Infusion von bis zu 10<sup>9</sup> Gen-modifizierten Zellen nicht toxisch ist und daß diese Zellen in einigen Patienten bis zu 16 Wochen persistieren. Acht Wochen nach der Infusion waren noch 0,1 % peripherer Blutlymphozyten modifiziert. Auf dieser Basis konnte inzwischen auch eine Phase II-Studie mit auf gleiche Weise transduzierten autologen T-Zellen und Knochenmarks-Stammzellen gestartet werden.

Bei den meisten therapeutischen Studien handelt es sich um Immunisierungstherapien, um die Immunantwort gegen HIV zu verstärken. In einer Phase I/II-Vakzinations-Studie wurde entweder Placebo oder ein retroviraler Vektor, HIV-IT(V), intramuskulär injiziert (Haubrich et al. 1995). HIV-IT(V) ist hochgradig rekombinant und wird von einer Hundezelllinie produziert und nicht von einer sonst üblichen Mauszelllinie, um *in vivo* Rekombinationsrisiken zu senken. Der virale Vektor trägt Segmente des potentiell vakzinierenden *env* und *rev* Genes von HIV-1 IIIB. Durch die Nachbeobachtung der ersten 16 Patienten konnte Toxizität ausgeschlossen werden. Es fand sich jedoch auch kein therapeutischer Effekt, weder in Bezug auf einen Impfeffekt noch auf die Virusbelastung. Diese Studie und ihr Phase I-Vorgänger (Ziegner et al. 1995, Galpin et al. 1994) sind inzwischen abgeschlossen. Ihnen folgte die verwandte Phase II-Studie von Parenti et al. die ebenfalls mit HIV-IT(V) durchgeführt wird. Bereits in den ersten Monaten im Jahre 1995 waren 124 Patienten eingeschlossen, Ende 1997 bereits 216 (Wiley 1998).

Auch MacGregor et al. (1998) verwendeten eine intramuskuläre Vakzinonstherapie, wobei sie erstmalig nackte HIV-Gene einsetzten. DNA für HIV-1 MN *env* und *rev* Gene unter der Kontrolle eines CMV-Promotors wurden 13 Männern und 2 nicht-schwangeren Frauen verabreicht. Die Zahl der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten betrug wenigstens 500/µl Blut und sie verwendeten keine antiviralen Medikamente. Entsprechend einem eskalierenden Dosisschema wurden jeweils 5 Patienten in Form von 3 Injektionen in jeweils 10wöchigem Abstand 30µg, 100µg oder 300 µg verabreicht. Da präklinische Untersuchungen gezeigt hatten, daß intramuskuläre Bipuvacainhydrochlorid-Injektionen jeweils vor der DNA-Injektion eine 20–200fache Erhöhung der Transgen-Expression bewirkten, und bereits gezeigt

werden konnte, daß die Impfung Schimpansen gegen HIV-Infektionen schützte bzw. in bereits infizierten Tieren deren anti-HIV-Abwehr verbesserte, wurde dieses Verfahren auch bei Menschen eingesetzt. Die Therapie wurde mit nur geringen Nebenwirkungen gut vertragen. Lediglich lokaler Schmerz und Steifheit wurden als Impfungs-bedingt erachtet. Es fand sich weder hämatologischer noch renale Toxizität. Bei allerdings bereits sehr variablen CD4+ und CD8+ Lymphozytenzahlen vor der Behandlung fand sich kein signifikanter therapeutischer Effekt. Auch die Virusbelastung blieb unverändert, wobei die HIV-RNA in 7 Patienten sogar um 30% anstieg und in 7 anderen Patienten um 30% fiel. Dagegen wurden die Anti-Env-Antikörper in Patienten geboostert, die 100 µg erhalten hatten. Anti-gp120-Antikörper stiegen in einzelnen Patienten der 100 und 300 µg-Gruppen. Anti-gp120-Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) und die Lymphozyten-Proiferationsaktivität stieg ebenfalls.

Riddel et al. (1996) beobachteten in 6 Patienten mit HIV-Infektionen eine therapeutisch-einsetzbare Immunreaktion gegen ein fremdes Transgen, nachdem sie eine adoptive Immuntherapie erhalten hatten. Periphere Blutlymphozyten der Patienten waren gesammelt und für HIV-gag Protein spezifische CD8+ T-Lymphozytenklone isoliert worden. Diese Klone waren *in vitro* mit einem retroviralen Vektor mit einem Fusionsgen transduziert worden, genannt HyTK, das für den Positiv-Selektionsmarker Hy (Hygromycin-Resistenz) und den Negativ-Selektionsmarker TK (Ganciclovir-Sensitivität) kodiert. Sie demonstrierten auf MHC I beschränkte anti-HIV-gag zytotoxische Aktivität auf Targetzellen *in vitro*. Einer der 3 Klone von HyTK-transduzierten CD8+T-Lymphozyten wurde expandiert und in autologe Patienten re-infundiert, wobei aufsteigende Dosen von  $10^8$  bis  $3,3 \times 10^9$  Zellen/m<sup>2</sup> verabreicht wurden. Es fanden sich keine Zeichen für Toxizität und keine zusätzliche Ganciclovir-Behandlung war notwendig. Vor der Infusion konnten keine Gedächtnis-CTLs gegen Hy oder TK nachgewiesen werden. Nach der Infusion jedoch wurden in 5 von 6 Patienten HyTK-spezifische CTLs gefunden. Patienten ohne nachweisbare anti-HyTK zytotoxische Aktivität zeigten einen Anstieg an zirkulierenden HyTK-transduzierten Zellen nach jeder Infusion. In allen Fällen waren HyTK-transfizierte Zellen maximal 7 Tage nachweisbar. Somit also waren die hier behandelten Patienten in der Lage, die Transgen-exprimierenden autologen Zellen schnell abzustoßen, obwohl sie immunologisch nur eingeschränkt kompetent waren.

Calarota et al. (1998) verabreichten deshalb 9 Symptom-freien HIV-1 Patienten intramuskuläre Injektionen der Immunisierungskandidatengene HIV-1 *tat*, *rev* oder *nef*. Insgesamt wurden jeweils 3 Immunisierungen innerhalb von 6 Monaten verabreicht. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Vor der Behandlung waren in keinem der Patienten Antikörper und zell-vermittelte Immunität gegen diese 3 regulatorische Proteine vorhanden, danach fand sich jedoch in allen 9 Patienten spezifische Gedächtniszellen und in 8 Patienten eine spezifische Zytotoxizität. Induzierte CTLs waren auf die MHC-Klasse-I beschränkt und vorwiegend CD8+ positiven Ursprungs. In 3 Patienten jedoch verringerte sich die zelluläre Aktivität nach dieser ursprünglichen Immunantwort. Die geringe Patientenzahl ließ nur die Vermutung zu, daß HIV-spezifische zytotoxische Antworten gegen regulatorische Proteine zu einer immunologischen Beseitigung infizierter Zellen führen könnte, bevor sie virale Partikel freigesetzt haben. Möglicherweise auch hätten nicht-selek-

tionierte oder nicht-infizierte Personen stärkere Immunantworten gezeigt als die selektierten Patienten mit geringer oder ohne vorbestehender Antwort.

Neben der Stimulation einer verstärkten Immunantwort gegen das HIV bestehen noch zahlreiche Optionen für gentherapeutische Behandlungsstrategien zur Verfügung, die eher auf eine „intrazelluläre Immunisierung“ abzielen, indem die virale Replikation inhibiert wird. Sie umfassen verschiedene dominant-negative Mutanten von Ribozymen, intrazelluläre Antikörper bis hin zu verschiedenen viralen Targets, wie fast alle Stadien des viralen Replikations-Zyklus. Letzteres wird durch letale Mutationen der viruseigenen *gag*, *pol*, *tat*, *rev* und *env* Gene erreicht, die kompetitiv die Integration von intaktem Wildtyp-Protein verhindern. In klinischen Phase I-Studien werden derzeit ein transdominantes mutiertes HIV-Protein, Rev M10 getestet, das kompetitiv an das entsprechende Rev-respondierende Element bindet, sowie ein Haarnadel-Ribozym gegen die 5'-Leitsequenz des Retrovirus. In beiden Fällen wurden wiederum autologe CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von HIV-infizierten Patienten verwendet (Barinaga 1993, Woffendin et al. 1996). Lediglich für die erste Studie (Rev) liegen derzeit Ergebnisse vor. T-Lymphozyten wurden mit Hilfe von Gold-Mikropartikeln mit Rev M10 transduziert. Die Überlebenszeit der T-Lymphozyten betrug in einem der 3 ersten Patienten 15 Tage, verglichen mit 3,5 Tagen für einen Kontrollpatienten, der den gleichen Vektor ohne das therapeutische Gen erhielt (Woffendin et al. 1996).

Da immunisierende Monotherapien bisher wenig erfolgreich waren, ist es wahrscheinlich, daß sich eher Therapien unter gleichzeitigem Einsatz von multiplen therapeutischen Genen gerichtet gegen verschiedene virale Gene und/oder verschiedene Stadien der Virusreplikation durchsetzen werden, die alle idealerweise über den gleichen Vektor transferiert werden. Auch zielten alle bisherigen vorliegenden klinischen Studien nur auf die Behandlung von T-Lymphozyten ab, obwohl das Reservoir infizierter Zellen auch aus anderen Zellen, wie z. B. Makrophagen, dendritische Zellen und den Gliazellen des Gehirns besteht, die teilweise eine sehr lange Lebensdauer haben. Möglicherweise ist auch über eine größere Vielfalt an Targetzellen eine verbesserte Therapie-Effizienz zu erreichen.

## 2.4

### **Kardiovaskuläre Erkrankungen: Periphere und koronare Gefäßkrankheit**

Hier spielen insbesondere die arteriosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle, vor allem die periphere Gefäßkrankheit und die koronare Herzkrankheit. Arteriosklerotische Läsionen werden in frühe Läsionen (initiale Läsionen und Lipideinlagerungen), intermediäre Läsionen, fibröse Plaques und komplizierte Läsionen eingeteilt. Folgen dieser Plaquebildung sind chronische Gefäßverschlüsse mit persistierenden Schmerzen und Ulzera, der vulnerable Plaque mit der Plaqueruptur/Herzinfarkt und die Restenose (Wiederverengung) von Gefäßen nach Ballonaufdehnungen (Dilatationen). Die Ruptur der arteriosklerotischen Plaques und die konsekutive Formation Gefäß-verschließender Thromben sind die wichtigsten Mechanismen, die zu akuten Ischämien, einschließlich Herzinfarkt, führen. Die instrumentelle Behandlung stenosierender Erkrankungen der Herzkranzgefäße hat eine anfänglich unerwartete Entwicklung genommen. So lag die Zahl der Eingriffe in der BRD 1985 bei 5.000 und im Jahre

1997 wurden mehr als 130.000 Indikationen vorgenommen. Hinsichtlich der Restenose-Prävention konnten bisher keine überzeugenden Fortschritte erzielt werden. Auch in neuesten Studien mit richtungsweisendem Charakter für unsere Therapiekonzepte liegt die Rezidivrate zwischen 20 und 50%. Wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte, läuft die Restenoseformation, ähnlich wie bei anderen Wundheilungsprozessen, in drei überlappenden Phasen ab. Die Phase der Entzündung beginnt mit dem Zeitpunkt der Gefäßverletzung, gelegentlich kombiniert mit thrombotischen Auflagerungen auf dem verletzten Areal. Sie dauert nur Stunden bis wenige Tage an und wird von der Granulationsphase gefolgt, die im Schweinemodell nach etwa sieben Tagen das Maximum der Proliferationsaktivität zeigt. Zu diesem Zeitpunkt sind viele Gefäßwandmyozyten unter dem Einfluß zahlreicher bereits bekannter Wachstums-stimulierender Proteine vom kontraktilen ruhenden Phänotyp in das synthetische proliferative Stadium übergegangen. Schließlich kommt es, beginnend mit der zweiten Woche nach dem Trauma und teilweise über Monate bis Jahre anhaltend, zur vermehrten Formation bzw. zum Umbau der Matrix.

Bisher wurden mindestens 47 Patienten im Rahmen von 4 Protokollen gentherapeutisch behandelt (Wiley 1998). Die periphere arterielle Verschlusskrankheit war die erste kardiovaskuläre Erkrankung bei der die Gentherapie eingesetzt wurde (Isner et al. 1995, Isner et al 1996a, Isner et al. 1996b, Isner 1998). Im Stadium IV der Erkrankung mit ischämischen Ulzera und drohender Amputation wurde das Gen des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bisher transluminal oder intramuskulär in 33 Patienten im Rahmen von 2 Protokollen in den USA und in Finnland verabreicht (Isner et al. 1996a, Isner 1998, Wiley 1998). Die DNA wurde entweder nackt oder als Liposomen-Komplex transferiert. Durch die Angiogene- und konsekutive Kollateralisierung konnte in einigen Patienten, abhängig vor allem von der applizierten DNA-Menge, klinisch eine Verbesserung der Gehstrecke erzielt werden, parallel dazu eine Zunahme der Perfusion in der konventionellen und in der Kernspin-Angiographie. Als zusätzlicher Beweis für die biologische Wirkung des erfolgreich exprimierten Gens konnte die Ausbildung von großen *Spider naevi* im Bereich des Fußes beobachtet werden sowie ein passageres peripheres Ödem infolge der vermehrten Gefäßpermeabilität (Isner et al. 1996a, Baumgartner et al. 1998). Da VEGF von intakten Zellen sezerniert werden kann, war eine subkutane Anwendung ebenso wirkungsvoll wie die direkte, transluminale Applikation über einen Hydrogel-beschichteten Katheter. Nachteilig könnten jedoch die nachweislich erhöhten Plasmaspiegel für VEGF-Protein sein (Baumgartner et al. 1998), da VEGF auch bei der Tumorangiogenese eine bedeutende Rolle spielt und somit potentiell das Wachstum bis dahin nicht erkannter Mikrotumoren anregen könnte. Crystal et al. (1995) initiierten inzwischen eine klinische Studie mit adenoviralem Transfer des VEGF-Gens in periphere Arterien. Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor. Ähnlich wie zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erfolgte inzwischen auch von Ylä-Hertualla et al im Rahmen einer finnischen Studie bei 3 Patienten die Behandlung der koronaren Herzkrankheit (Wiley 1998). Hier wurden die Lipofektion und Adenoviren eingesetzt. Drei weitere klinische Studien mit adenoviralem VEGF-Transfer bzw. Applikation von nackter VEGF-DNA, sowie adenoviralem Transfer des *fibroblast growth factor*(FGF)-4

Gens wurden begonnen (Wiley 1998). Derzeit liegen noch keine Ergebnisse über Patientenzahlen oder Ergebnisse vor.

Eine weitere Indikation zum Einsatz des VEGF bei der peripheren Verschlusskrankheit war die Prävention der Restenose nach Ballonangioplastie durch die frühzeitige Ausbildung eines Neo-Endothels (Isner et al. 1996c). Hier erfolgte der Einsatz bisher bei mindestens 11 Patienten (Wiley 1998). Eine andere Gruppe testet derzeit klinisch, trotz kontroversen Ergebnissen in Tierexperimenten, den Einsatz von *antisense* Oligonukleotiden gegen das Proto-onkogen *c-myc* (Kutryk et al. 1997). Eine Reihe anderer antiproliferativer Gene, wie *antisense c-myb*, *p21*, Riboblastoma und Cecropin, befinden sich derzeit in präklinischer Testung (Simons et al. 1992, Nikol et al. 1999, Huehns et al. 1999, Chang et al. 1995a, Chang et al. 1995b). Neben dem direkten Gentransfer befindet sich auch die Verwendung genetisch modifizierter Zellen in Verbindung mit z.B. Stents in Erprobung (Dickek et al. 1989).

Für die Stabilisierung des vulnerablen Plaques und zur konsekutiven Verhinderung von Myocardinfarkten, wird der Einsatz der Gentherapie vorgeschlagen (Feldman u. Isner, 1995). In diesem Zusammenhang soll insbesondere die Senkung des LDL-Cholesterins bzw. die Erhöhung des HDL-Cholesterins durch den Transfer des LDL-Rezeptor-bzw. Apo-A1-Gens und die Beeinflussung der Makrophageninfiltration durch den Transfer der Gene von Adhäsionsmolekülen (*soluble vascular cell adhesion molecule -sVCAM*, *monocyte chemoattractant protein-1 -MCP-1*) angestrebt werden. Für die Suppression der der Plaqueruptur folgenden lokalen Gefäßthrombosierung wird der Transfer der Gene für den *tissue plasminogen activator* (t-PA) oder Urokinase vorgeschlagen. Alternativ wird die frühe Reparatur des Endothels während oder nach Plaqueruptur der Transfer des sich bereits in klinischer Erprobung befindlichen *vascular endothelial growth factor* für die schnelle Reendothelialisierung nahegelegt. Klinische Studien hierzu gibt es derzeit noch nicht.

## 2.5

### Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose handelt es sich um eine neurologische Erkrankung mit Zelltod von Motoneuronen. In präklinischen Studien hatte sich gezeigt, daß neutrophische Faktoren auf Nagermodelle für die humane Erkrankung einen therapeutischen Effekt haben. Einer dieser Faktoren, der ziliäre neutrophische Faktor (CNTF) wurde in einer nicht-gentherapeutischen klinischen Studie untersucht, indem Patienten mit ALS das CNTF-Protein systemisch erhielten. Dabei fanden sich erhebliche Nebenwirkungen, wie die Induktion von Akutphasen-Reaktivatoren, erheblicher Hustenreiz und Gewichtsverlust, die zum Abbruch der Studie führten. Weitere Probleme waren die kurze Halbwertszeit der Moleküle und ihre Unfähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

Aebischer et al. (1996) entwarfen deshalb eine klinische Phase I-Studie, bei der die Wirkungen einer lokalen Applikation und Verfügbarkeit im Nervensystem beobachtet werden sollten. Hierfür wurde eine Nierenzelllinie des Baby-Hamsters (BHK Zelllinie) *in vitro* mit dem CNTF-Gen transduziert und in Polymer-Kapseln eingeschlossen. Die CNTF-Expression lag bei etwa 1 µg pro Tag. Die Implantation

erfolgte im lumbalen intrathekalen Zwischenraum der Patienten. Mindestens 12 Patienten erhielten bisher deartige Kapseln. Zur Untersuchung der *in vivo* Expression entnommene sukzessive Liquoruntersuchungen, die vor der Therapie negativ waren, zeigten danach mehrere Hundert pg von CNTF bis zu 15 Monate nach Implantation. Explantierte Kapseln enthielten noch lebende CNTF-produzierende BHK-Zellen. Keiner der Patienten zeigte die in der vorangegangenen systemischen Studie beobachteten schweren Nebenwirkungen. Entsprechend verschiedener klinischer Graduierungs-Schemata wurde trotz erfolgreicher Expression in allen Patienten ein Fortschreiten der Krankheit festgestellt. Als nächster Schritt ist eine Kombination mit einem anderen neutrophischen Faktor, dem NT4/5, geplant, da sich bereits *in vitro* ein besserer kurativer Effekt aufgrund einer Synergie der beiden Faktoren gezeigt hatte. Derzeit werden Zelllinien, die sowohl CNTF als auch NT4/5 produzieren in Tiermodellen zur Motoneuronen-Degeneration getestet.

## 2.6

### Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Multisystemerkrankung mit unbekannter Ursache. Eine Reihe von systemischen Manifestationen sind möglich, wobei die persistierende entzündliche Synovitis im Vordergrund steht, die meist die peripheren Gelenke in symmetrischer Weise befällt. Kennzeichen dieser Erkrankung ist die Knorpeldestruktion durch die Entzündungen der Synovia mit nachfolgenden Gelenkdeformationen. Der Verlauf kann sehr unterschiedlich sein, von milden Symptomen bis hin zu Gelenksdestruktionen, die die Implantation von Gelenkprothesen erfordern. Die Prävalenz der Rheumatoiden Arthritis beträgt in der Bevölkerung etwa 1% (0,3–2,1%). Frauen sind etwa dreimal häufiger betroffen als Männer. Die Prävalenz steigt mit dem Alter, wobei sich im höheren Alter die Geschlechtsunterschiede verwischen. Die Rheumatoide Arthritis tritt in der ganzen Welt auf und betrifft alle Rassen. Sie beginnt meist in der 4. oder 5. Lebensdekade, wobei 80% der Betroffenen die Krankheit zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr entwickeln. Familienuntersuchungen geben dafür Hinweise, daß eine genetische Prädisposition existiert. In vielen Populationen konnte ein genetischer Zusammenhang mit dem Auftreten von HLA-DR4 gefunden werden, das bei 70% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis exprimiert wird, im Gegensatz zu 28% in Kontrollpersonen. In anderen Populationen besteht ein Zusammenhang mit der Expression von HLA-DR1 und HLA-Dw16. Analysen dieser Histokompatibilitäts-Komplex-Gene haben ergeben, daß eine bestimmte Aminosäuren-Sequenz in der dritten hypervariablen Region des HLA-DR Moleküls das entscheidende genetische Element für die mögliche Erkrankung an einer Rheumatoiden Arthritis ist. Diese Region scheint Einfluß auf die Selektion von CD4+ T-Zellen und die Präsentation antigener Peptide gegen CD4+ T-Zellen zu haben.

Seit Juli 1995 wurden 2 klinische Studien zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis genehmigt. In einer Studie wird davon ausgegangen, daß es sich um eine invalidisierende Autoimmunerkrankung handelt, die die Knochengelenke befällt, bei der Interleukin-1 assoziierte Entzündungen des lokalen Bindegewebes in chronischen Schmerzen, Gewebsarosion und eingeschränkte Beweglichkeit resultieren. Deshalb wird hier das Gen für das Interleukin-1 Rezeptorantagonist-Protein



(IRAP) eingesetzt, das die durch Interleukin-1 verursachten Gelenksarrosionen blockiert. Im Juli 1996 behandelten schließlich Evans et al. (1996) die erste Patientin. Diese 68jährige Frau erhielt autologe Synovial-Zellen, die *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor für das IRAP-Gen transduziert worden waren. Die transduzierten Zellen wurden intraartikulär injiziert. Insgesamt sollen 9 Patienten in diese Studie eingeschlossen werden, bisher wurden 7 Patienten aufgenommen. In einer weiteren Studie wird das Thymidinkinase(TK)-Gen als nackte DNA eingesetzt (Wiley 1998).

### 3

#### Therapie mit Genen – ein Ausblick

Seit 1990 wird die somatische Gentherapie beim Menschen eingesetzt. Bisher existiert noch kein eindeutiger Beweis, daß Gentherapie von echtem therapeutischem Nutzen ist. Die Ergebnisse der ersten Untersuchungen sind jedoch insofern ermutigend, als bisher keine wesentlichen, unerwarteten Nebenwirkungen auftraten. Die Übertragung von Laborergebnissen ans Krankenbett erfordert hier noch viel Zeit und Geduld. Es bestanden unrealistische Erwartungen, auch seitens der beteiligten Wissenschaftler. Der anfängliche Enthusiasmus im Zusammenhang mit der Gentherapie ebbt jedoch wieder ab. Es zeigt sich, daß noch methodische Probleme, vor allem die Effizienz des Gentransfers zu verbessern sind (Crystal 1995). Die Leistungsfähigkeit der Vektoren entspricht noch nicht den klinischen Ansprüchen. Auch kann kein einheitliches Transferschema für alle betroffenen Krankheiten geben, die Art des Transfers muß an die Besonderheiten der jeweiligen Krankheit angepaßt werden. Deshalb gewinnt derzeit die Grundlagenforschung gegenüber klinischen Studien wieder an Gewicht. Trotz vorübergehender Rückschläge wird die Therapie mit Genen wahrscheinlich schon bald ihren Platz in der Medizin als neue Behandlungsmethode einnehmen. Ein Erfolg hätte weitreichende Folgen, denn langfristig könnten die Verringerung von Behandlungsdauern und wiederholten operativen und interventionellen Eingriffen führen, sondern auch zu einer erheblichen Kostensenkung im Bereich dieser überwiegend chronischen Erkrankungen führen. Die logischen Zusammenhänge, die dem Prinzip des Gentransfers unterliegen, sind verlockend und in Kombination mit dem 1990 initiierten Humangenomprojekt, das zur Aufdeckung aller 3 Millionen Basenpaare, die die etwa 100.000 menschlichen Gene enkodieren, führen wird, ergibt sich ein enormes Potential für innovative Therapien und das zunehmende Verständnis für die menschliche Biologie. Bis zum Ende des Jahrtausends wird erwartet, daß bereits mehr als 90% der menschlichen Gene bekannt sein werden. DNA als Medikament ist bereits Wirklichkeit, seine Möglichkeiten bisher jedoch nicht ausgeschöpft. Es ist zu hoffen, daß im Zuge dieser Entwicklung ausreichend Mittel für gute biomedizinische Forschung bereitgestellt werden, ohne die hier eine Weiterentwicklung nicht möglich ist.

## Literatur

- Aebischer P, Schlupe M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE (1996) Erratum: Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients (*Nature Medicine* (1996) Vol. 2 (pp. 696–699)). *Nat Med* 2(9): 1041
- Albelda SM (1997) Gene therapy for lung cancer and mesothelioma. *Chest* 111(6 Suppl): 144S–149S
- Barinaga M (1993) Ribozymes: killing the messenger. *Science* 262: 1512–1514.
- Barnes MN, Dshane JS, Rosenfeld M, Siegal BG, Curiel DT, Alvarez RD (1997) Gene therapy and ovarian cancer: a review. *Obstetrics and Gynecology* 89(1): 145–155.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM (1998) Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97(12): 1114–1123
- Belli F, Arienti F, Sulesuso J, Clemente C, Mascheroni L, Cattelan A, Sanantonio C, Gallino GF, Melani C, Rao S, Colombo MP, Maio M, Cascinelli N and Parmiani G (1997) Active immunization of metastatic melanoma patients with interleukin 2 transduced allogeneic melanoma cells: Evaluation of efficacy and tolerability. *Cancer Immunol Immunother* 44(4): 197–203.
- Bellon G, Michelcalemard L, Thouvenot D, Jagneaux V, Poitevin F, Malcus C, Accart N, Layani MP, Aymard M, Bernon H, Bienvenu J, Courtney M, Doring G, Gilly B, Gilly R, Lamy D, Levrey H, Morel Y, Paulin C, Perraud F, Rodillon L, Sene C, So S, Tourainemoulin F, Schatz C, Pavirani A (1997) Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 8(1): 15–25.
- Blaese RM, Anderson WF, Culver KW, Rosenberg SA (1990) The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1: 327–362.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475–480.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti 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(5319): 1719–1724.
- Bordignon C, Bonini C, Verzeletti S, Nobili N, Maggioni D, Traversari C, Giavazzi R, Servida P, Zappone E, Benazzi E (1995a) Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Gene Ther* 6: 813–819.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P (1995b) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270: 470–475.
- Boucher RC, Knowles MR, Johnson LG, Olsen JC, Pickles R, Wilson JM, Engelhardt J, Yang Y, Grossman M (1994) Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity. The University of North Carolina at Chapel Hill. *Hum Gene Ther* 5: 615–639.
- Burt K, Chema D, Timmons T (1997) Tracing the dissemination of adenoviral vectors in patient body fluids. *J Mol Med* 75:5: B28(86).
- Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandstrom E, Wahren B (1998) Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet*. 351(9112): 1320–1325.
- Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C (1995) Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1: 39–46.
- Chang MW, Barr E, Min-Min-Lu, Barton K, Leiden JM (1995a) Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits smooth muscle cell proliferation.

- ration and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 96(5): 2260–2268.
- Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM (1995b) Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of retinoblastoma gene product. *Science* 267(5197): 518–522.
- Conry RM, LoBuglio AF, Curiel DT (1996) Polynucleotide-mediated immunization therapy of cancer. *Semin Oncol* 23: 135–147.
- Cornetta K, Srour EF, Moore A, Davidson A, Broun ER, Hromas R, Moen RC, Morgan RA, Rubin L, Anderson WF, Hoffman R, Tricot G (1996) Retroviral gene transfer in autologous bone marrow transplantation for adult acute leukemia. *Hum Gene Ther* 7(11): 1323–1329.
- Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404–410.
- Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT and Danel C (1994) Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 8: 42–51.
- Crystal RG, Jaffe A, Brody S, Mastrangeli A, McElvaney NG, Rosenfeld M, Chu CS, Danel C, Hay J, Eissa T (1995) A phase I study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum Gene Ther* 6: 643–666.
- Culver KW, Osborne WR, Miller AD, Fleisher TA, Berger M, Anderson WF, Blaese RM (1991) Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc* 23(1 Pt 1): 170–171
- Culver KW, Anderson WF, Blaese RM. (1991) Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther* 2(2): 107–109.
- Culver KW, Blaese RM (1994) Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 10: 174–178.
- Davidson A, Morey S, Musk AW, et al. (1997) Gene therapy or therapy by intratumoral cytokines by infusion in mesothelioma patients. *Lung Cancer* 18 (suppl. 2):94
- Deisseroth AB, Kavanagh J, Champlin R (1994) Clinical protocol: Use of safety-modified retroviruses to introduce chemotherapy resistance sequences into normal hematopoietic cells for chemoprotection during the therapy of ovarian cancer: a pilot trial. *Hum Gene Ther* 5: 1507–1522.
- Deshane J, Siegal GP, Wang MH, Wright M, Bucy RP, Alvarez RD and Curiel DT (1997) Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti ErbB 2 intracellular single chain antibody for ovarian cancer gene therapy. *Gynecologic Oncology* 64 (3): 378–385.
- Dichek DA, Neville RF, Zwiebel JA, Freeman SM, Leon MB, Anderson WF (1989) Seeding of intravascular stents with genetically engineered endothelial cells. *Circulation* 80: 1347–1353.
- Dunbar C, Kohn D, Karlsson S, Barton N, Brady R, Cottler-Fox M, Crooks G, Emmons R, Esplin J, Leitman S, Lenarsky C, Nolte J, Parkman R, Pensiero M, Schiffmann R, Tolstoshev P, Weinberg K (1996) Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 7: 231–253.
- During M (1996a) Gene therapy chronology. *Science* 273: 416–417.
- During MJ (1996b) Gene trial in New Zealand. *Lancet* 348: 618
- Engel BC, Laws HJ, Buttlies B, Kahn T, Gobel U, Burdach SEG (1998) Induction of a CD3+/CD56+ lymphocyte population following gene therapy with transgenic IL-2 secreting fibroblasts in a child with peripheral neuroectodermal malignancy. *Med Pediatr Oncol* 31(2): 56–60.
- European Working Group of Gene Therapy E (1996) Newsletter No. 5.
- Evans CH, Mankin HJ, Ferguson AB Jr, Robbins PD, Ghivizzani SC, Herndon JH, Kang R, Bahnson AB, Barranger JA, Elders EM, Gay S, Tomaino MM, Wasko MC, Watkins SC, Whiteside TL, Glorioso JC, Lotze MT, Wright TM (1996) Clinical trial to assess the safety, feasibility, and

- efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 7: 1261–1306.
- Feldman LJ, Isner JM (1995) Gene therapy for the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 26: 826–835.
- Fenton RT, Sznol M, Luster DG, Taub DD, Longo DL (1995) A phase I trial of B7-transfected or parental lethally irradiated allogeneic melanoma cell lines to induce cell-mediated immunity against tumor-associated antigen presented by HLA-A2 or HLA-A1 in patients with stage IV melanoma. NCI protocol T93-0161. BRMP protocol 9401. *Hum Gene Ther* 6: 87–106.
- Flotte TR, Conrad C, Reynolds TZ (1995) Preclinical evaluation of AAV vectors expressing the human CFTR cDNA. *J Cell Biochem suppl* 21A:364 C366–112. (Abstract)
- Flotte TR, Carter B, Conrad C, Guggino W, Reynolds T, Rosenstein B, Taylor G, Walden S, Wtezel R (1996) A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gen Ther* 7(9): 1145–1159.
- Freeman SM, McCune MC, Robinson E (1992) Treatment of ovarian cancer using HSV-TK gene-modified vaccine. *Hum Gene Ther* 3:342.
- Gahery-Segard H, Molinier-Frenkel V, Le Boulaire C, Saulnier P, Opolon P, Lengagne R, Gautier E, Le Cesne A, Zitvogel L, Venet A, Schatz C, Courtney M, Le Chevalier T, Tursz T, Guillet JG, Farace F (1997) Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study of the immune responses to transgene and viral products. *J Clin Invest* 100(9): 2218–2226.
- Galpin JE, Casciato DA, Richards SB (1994) A phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (TAF) (HIV-1III Benv-transduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *Hum Gene Ther* 5(8): 997–1017.
- Gänsbacher B, Rosenthal FM, Zier K (1993) Retroviral vector-mediated cytokine-gene transfer into tumor cells. *Cancer Invest* 11: 345–354.
- Gill DR, Southern KW, Mofford KA, Seddon T, Huang L, Sorgi F, Thomson A, Macvinish LJ, Ratcliff R, Bilton D, Lane DJ, Littlewood JM, Webb AK, Middleton PG, Colledge WH, Cuthbert AW, Evans MJ, Higgins CF, Hyde SC (1997) A placebo controlled study of liposome mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy* 4(3): 199–209.
- Ginsberg HS Hrsg. (1984) *The adenoviruses*. New York: Plenum Press.
- Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335–341.
- Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3<sup>rd</sup>, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE, Wilson JM (1995) A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1(11): 1148–1154.
- Habib NA, Ding SF, el-Masry R, Mitry RR, Honda K, Michail NE, Dalla-Serra G, Izzi G, Greco L, Bassyouni M, el-Toukhy M, Abdel-Gaffar Y (1996) Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev* 20(2): 103–107.
- Hallek M, Girod A, Braun-Falco M, Wendtner C-M, Bogedain C, Hörer M (1998) Recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Res Mol Ther* 1:417–430
- Harris JD, Lemoine NR (1996) Strategies For Targeted Gene Therapy. *Trends in Genetics* 12 (10): 400–405.
- Hatzoglou M, Lamers W, Bosch F, Wynshaw BA, Clapp DW, Hanson RW (1990) Hepatic gene transfer in animals using retroviruses containing the promoter from the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 265: 17285–17293.
- Haubrich R, McCutchan JA, Holdredge R, Heiner L, Merritt J, Merchant B (1995) An open label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1(III B)(env/rev) retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther* 6(7): 941–955.

- Hay JG, McElvaney NG, Herena J, Crystal RG (1995) 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* 6: 1487–1496.
- Hesdorffer C, Antman K, Bank A, Fetell M, Mears G, Begg M (1994) Clinical protocol: Human MDR gene transfer in patients with advanced cancer. *Hum Gene Ther* 5: 1151–1160.
- Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C, Garrett T, Fetell M, Reiss R, Bank A, Antman K (1998) Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 16(1): 165–172.
- Hijiya N, Zhang J, Ratajczak MZ, Kant JA, DeRiel K, Herlyn M, Zon G, Gewirtz AM (1994) Biologic and therapeutic significance of MYB expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4499–4503.
- Hoogerbrugge PM, Van Beusechem VW, Kaptein LC, Einerhand MP, Valerio D (1995) Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Br Med Bull* 51: 72–81.
- Hoogerbrugge PM, Van Beusechem VW, Fischer A, Debree M, le Deist F, Perignon JL, Morgan G, Gaspar B, Fairbanks LD, Skeoch CH, Moseley A, Harvey M, Levinsky RJ, Valerio D (1996) Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 3: 179–183.
- Horowitz MS (1990) Adenoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Herausg. *Virology*. New York Raven Press, 1679–1740.
- Huebner RJ, Rowe WP, Ward TG, et al. (1954) Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. *N Engl J Med* 251: 1077–1086.
- Huehns TY, Krausz E, Mrochen S, Schmid M, Engelmann MG, Esin S, Schrittenloher P-K, Höfling B, Günzburg WH, Nikol S (in press) Neointimal growth can be influenced by local adventitial gene manipulation via a needle injection catheter. *Atherosclerosis*.
- Hui KM, Ang PT, Huang L, Tay SK (1997) Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 4(8): 783–790.
- Isner JM (1998) Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: Early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev* 30(1–3): 185–197.
- Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rossow S, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Schainfeld R (1995) Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 91: 2687–2692.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF (1996a) Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370–374.
- Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Juragj D (1996b) Clinical Protocol: Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther* 7: 959–988.
- Isner JM, Walsh K, Rosenfield K, Schainfeld R, Asahara T, Hogan K, Pieczek A (1996c) Arterial gene therapy for restenosis. *Hum Gene Ther* 7: 989–1011.
- Izquierdo M, Cortes ML, Martin V, de Felipe P, Izquierdo JM, Perez-Higueras A, Paz JF, Isla A, Blazquez MG (1997) Gene therapy in brain tumours: implications of the size of glioblastoma on its curability. *Acta Neurochir Suppl Wien* 68: 111–117.
- Jantschepf P, Bongartz G, Dietrich PY, Schatz C, Mehtali M, Courtney M, Herrmann R, Rochlitz C (1997) Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 75: B31(98)
- Kirchis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wagner E (1997) Coupling of cell binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4(5): 409–418.
- Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 333: 823–831.

- Kohn D, Weinberg KI, Parkman P, Lenarsky C, Crooks GM, Shaw K, Hanley ME, Lawrence K, Annett G, Brooks JS, Wara D, Elder M, Bowen T, Hershfield MS, Berenson RI, Moen RC, Mullen CA, Blaese RM (1993) Gene therapy for neonates with ADA-deficient SCID by retroviral-mediated transfer of the human ADA cDNA into umbilical cord CD34+ cells. *Blood* 82 (suppl. 1): 315a.
- Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM, Hanley ME, Annett G, Brooks JS, el KA (1995) Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1: 1017–1023.
- Kohn DB, Hershfield MS, Corbonaro D, Shigeoka A, Brooks J, Smogorzewska EM, Barsky LW, Chan R, Burotto F, Annett G, Nolta JA, Crooks G, Kapoor N, Elder M, Wara D, Bowen T, Madsen E, Snyder FF, Bastian J, Muul L, Blaese RM, Weinberg K, Parkman R (1998) T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4(7): 775–780.
- Kutryk MJB, de Groot MR, van den Brand M, Hamburger JN, van der Giessen WJ, Foley DP, de Feyter PJ, von Birgelen C, Camenzind E, Serruys PW (1997) Feasibility of the local delivery of antisense oligonucleotide against *c-myc* for the prevention of in-stent restenosis: acute results of the Thoraxcentre „ITALICS“ trial. 14th Congress of the European Society of Cardiology, Stockholm p2918.
- Link CJ, Moorman D, Seregina T, Levy JP, Schabold KJ (1995) A phase I trial of in vivo gene therapy with the Herpes simplex thymidine kinase ganciclovir system for the treatment of refractory or recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Therapy* 2: 230–231.
- Liu JM, Young NS, Walsh CE, Cottler-Fox CE, Carter C, Dunbar C, Barrett AJ, Emmons R (1997) Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther* 8(14): 1715–1730.
- Liu JM (1998) Gene transfer for the eventual treatment of Fanconi's anemia. *Semin Hematol* 35(2): 168–179.
- Lotze MT, Rubin JT (1995) Report of the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH). 9209–033.
- Lotze MT, Rubin JT, Carty S, Edington H, Ferson P, Landreneau R, Pippin B, Posner M, Rosenfelder D, Watson C (1994) Gene therapy of cancer: a pilot study of IL-4-gene-modified fibroblasts admixed with autologous tumor to elicit an immune response. *Hum Gene Ther* 5: 41–55.
- Lu DR, Zhou JM, Zheng B, Qiu XF, Xue JL, Wang JM, Meng PL, Han FL, Ming BH, Wang XP (1993) Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B* 36(11): 1342–1351.
- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Baine Y, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Coney LR, Ginsberg RS, Weiner DB (1998) First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 178(1): 92–100.
- Mackensen A, Veelken H, Lahn M, Wittnebel S, Becker D, Kohler G, Kulmburg P, Brennscheidt U, Rosenthal F, Franke B, Mertelsmann R, Lindemann A (1997) Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts. *J Mol Med* 75(4): 290–296.
- Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schneiderman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin-JI (1997) Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22): 12133–12138.
- Marshall E (1996) New Zealand's leap into gene therapy. *Science* 271: 1489–1490.
- McElvaney NG, Crystal RG (1995) IL-6 release and airway administration of human CFTR cDNA adenovirus vector [2]. *Nat Med* 1: 182–184.
- Merrouche Y, Negrier S, Bain C, Combaret V, Mercatello A, Coronel B, Moskovtchenko JF, Tolstoshev P, Moen R, Philip T (1995) Clinical application of retroviral gene transfer in oncology: results of a French study with tumor-infiltrating lymphocytes transduced with the gene of resistance to neomycin. *J Clin Oncol* 13: 410–418.

- Mukherjee S, Haenel T, Epton M (1997) Intralesional vaccinia virus-interleukin-2 (VV-IL-2) gene therapy in malignant mesothelioma (MM). *Lung Cancer* 18(suppl. 1): 236.
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ (1992) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3: 649–656.
- Nabel EG, Yang Z, Muller D, Chang AE, Gao X, Huang L, Cho KJ, Nabel GJ (1994) Safety and toxicity of catheter gene delivery to the pulmonary vasculature in a patient with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 5: 1089–1094.
- Nabel GJ, Chang A, Nabel EG, Plautz G, Fox BA, Huang L, Shu S. (1992) Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Human Gene Therapy* 3: 399–410.
- Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11307–11311.
- Nabel GJ, Chang AE, Nabel EG, Plautz GE, Ensminger W, Fox BA, Felgner P, Shu S, Cho K (1994) Immunotherapy for cancer by direct gene transfer into tumors. *Hum Gene Ther* 5: 57–77.
- Nabel GJ, Yang ZY, Nabel EG, Bishop K, Marquet M, Felgner PL, Gordon D, Chang AE (1995) Direct gene transfer for treatment of human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 772: 227–231.
- Nikol S, Huehns TY, Krausz E, Armeanu S, Engelmann MG, Winder D, Salmons B, Höfling B (in press) Needle injection catheter delivery of the gene for an antibacterial agent inhibits neointimal formation. *Gene Ther*
- O'Shaughnessy JA, Cowan KH, Nienhuis AW, McDonagh KT, Dorrentino Bp, Bunbar CE, Chiang Y, Wilson W, Goldspiel B, Kohler D, Cottler-Fox M, Leitman S, Gottesman M, Pastan I, Denicoff A, Noone M, Gress R (1994) Clinical protocol: Retroviral mediated transfer of the human multidrug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hum Gen Ther* 5: 891–911.
- Oldfield EH, Ram Z, Chiang Y, Blaese RM (1995) Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. GTI 0108. A phase I/II study. *Hum Gene Ther* 6(1): 55–85.
- Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y (1998) Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91: 30–36
- Parmiani G, Arienti F, Sulesuso J, Melani C, Colombo MP, Ramakrishna V, Belli F, Mascheroni L, Rivoltini L and Cascinelli N (1996) Cytokine based gene therapy of human tumors: an overview. *Folia Biologica* 42(6): 305–309.
- Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G, Davidson Smith H, Davidson H, Stevenson BJ, Carothers AD, Wallace WA, Moralee S, Hoenes C, Kallmeyer G, Michaelis U, Naujoks K, Ho LP, Samways JM, Imrie M, Greening AP, Innes JA (1997) Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4(3): 210–218.
- Qiu X, Lu D, Zhou J, Wang J, Yang J, Meng P, Hsueh JL (1996) Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J Engl* 109(11): 832–839.
- Ram Z, Culver K, Oshiro E (1995) Summary of results and conclusions of the gene therapy of malignant brain tumors: Clinical study. *Journal of Neurosurgery* 82: 343A.
- Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der NIH. (1995) Data management scientific report and status report, Stand 2.6.1995.
- Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, Gilbert MJ, Wilson L, Manley SA, Lupton SD, Overell RW, Reynolds TC, Corey L, Greenberg PD (1996) T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med* 2(2): 216–223.
- Rosenberg SA (1992) Karnofsky Memorial Lecture. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 10: 180–199.

- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL (1990) Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323: 570-578.
- Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE (1994) Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86: 1159-1166.
- Roth JA (1996a) Modification of tumor suppressor gene expression in non small cell lung cancer (Nslc) with a retroviral vector expressing wildtype (normal) p53. *Human Gene Therapy* 7(7): 861-874.
- Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KMW, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D (1996b) Retrovirus mediated wild type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 2(9): 985-991.
- Roth JA, Cristiano RJ (1997a) Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going. *Journal of the National Cancer Institute* 89(1): 21-39.
- Roth JA (1997b) 33<sup>rd</sup> American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (Abstract).
- Rubin J, Charboneau JW, Reading C, Kovach JS (1994) Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer. *Hum Gene Ther* 5(11): 1385-1399.
- Sakiyama Y (1996a) Clinical study of gene therapy for ADA deficiency. *Aerugi* 45: 621-626.
- Sakiyama Y (1996b) Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Hokkaido Igaku Zasshi* 71: 27-32.
- Salmons B, Gunzburg WH (1993) Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 4(2): 129-41.
- Schadendorf D, Czarnetzki BM, Wittig B (1995) Interleukin-7, interleukin-12, and GM-CSF gene transfer in patients with metastatic melanoma. *J Mol Med* 73: 473-477.
- Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD (1992) Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 359: 67-70.
- Sobol RE, Fakhrai H, Shawler D, Gjerset R, Dorigo O, Carson C, Khaleghi T, Koziol J, Shifan TA, Royston I (1995) Interleukin-2 gene therapy in a patient with glioblastoma. *Gene Ther* 2: 164-167.
- Son K, Huang L (1994) Exposure of human ovarian carcinoma to cisplatin transiently sensitizes the tumor cells for liposome-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12669-12672.
- Sterman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, Recio A, Knox L, Wilson JM, Albelda SM, Kaiser LR (1998a) Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 9(7): 1083-1092.
- Sterman DH, Kaiser LR, Albelda SM (1998b) Gene therapy for malignant pleural mesothelioma. *Gene Ther* 12: 553-568.
- Stopeck AT, Hersh EM, Akporiaye ET, Harris DT, Grogan T, Unger E, Warneke J, Schluter SF, Stahl S (1997) Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 15: 341-349.
- Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D (1998) Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 5(4): 481-90.
- Tait DL, Obermiller PS, Redlin-Frazier S, Jensen RA, Welsch P, Dann J, King M.C, Johnson DH, Holt J (1997) A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 3:1959-1968
- Tan Y, Xu M, Wang W, Zhang F, Li D, Xu X, Gu J, Hoffman RM (1996) IL-2 gene therapy of advanced lung cancer patients. *Anticancer Res* 16: 1993-1998.



- Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J (1995) Generation of human cytotoxic T-cell specific for human carcinoembryonic antigen (CEA) epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA (rV-CEA) vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87: 982–990.
- Tursz T, Cesne AL, Baldeyrou P, Gautier E, Opolon P, Schatz C, Pavirani A, Courtney M, Lamy D, Ragot T, Saulnier P, Andreumont A, Monier R, Perricaudet M, Le Chevalier T (1996) Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 88: 1857–1863.
- Veelken H, Mackensen A, Lahn M, Kohler G, Becker D, Franke B, Brennscheidt U, Kulmburg P, Rosenthal FM, Keller H, Hasse J, Schultze Seemann W, Farthmann EH, Mertelsmann R, Lindemann A (1997) A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int J Cancer* 70: 269–277.
- Waddill W, Wright W, Unger E, Stopeck A, Akporiaye E, Harris D, Grogan T, Schluter S, Hersh E, Stahl S (1997) Human gene therapy for melanoma: Ct guided interstitial injection. *American Journal of Roentgenology* 169(1): 63–67.
- Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(9): 3410–3414.
- Walker R, Bechtel CM, Natarajan V, Baseler M, Metcalf JA, Stevens R, Blaese RM, Davey RT, Falloon J, Polis MA (1995) Adoptive transfer of genetically modified, HIV-specific, syngeneic cytotoxic T lymphocytes (CTL) in HIV discordant identical twins. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Washington, DC: Abstract 404.
- Weber F, Bojar H, Priesack HB, Floeth F, Lenartz D, Kiwit J, Bock W (1997) Gene therapy of glioblastoma – one year clinical experience with ten patients. *JMM* 75: B40. (Abstract).
- Welsh MJ, Zabner J, Graham SM, Smith AE, Moscicki R, Wadsworth S (1995) Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: Part A. Safety of dose and repeat administration in the nasal epithelium. Part B. Clinical efficacy in the maxillary sinus. *Hum Gene Ther* 6: 205–218. Wiley Stand 1.12.1998, Wiedergabe mit Erlaubnis von Wiley J. *Gene Medicine*. Website: <http://www.wiley.co.uk/genmed>.
- Wilson JM (1995) Report of the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH).
- Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ (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.
- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75: 207–216.
- Zabner J, Ramsey BW, Meeker DP, Aitken ML, Balfour RP, Gibson RL, Launspach J, Moscicki RA, Richards SM, Standaert TA (1996) Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 97: 1504–1511.
- Ziegner UH, Peters G, Jolly DJ, Mento SJ, Galpin J, Prussak CE, Barber JR, Hartnett DE, Bohart C, Klump W (1995) Cytotoxic T-lymphocyte induction in asymptomatic HIV-1-infected patients immunized with Retrovector-transduced autologous fibroblasts expressing HIV-1III B Env/Rev proteins. *AIDS*. 9(1): 43–50.