



Retrovirale Vektoren – Effiziente Gentaxis für unterschiedliche Gentherapien

3

Michael A. Morgan, Melanie Galla, Boris Fehse und Axel Schambach

3.1 Einleitung

Die genetische Information, die als Bauplan für das menschliche Leben dient, ist in der chromosomalen DNA eines jeden Zellkerns und in der DNA unserer zellulären Kraftwerke, den Mitochondrien, gespeichert. Im menschlichen Körper ist die Expression der Gene gut reguliert und ihr orchestriertes Zusammenspiel erlaubt die Spezialisierung unserer Zellen und Gewebe. Gemäß dem Grundprinzip der Biologie wird während der Genexpression die genetische Information von der stabilen DNA-Form in eine transiente Informationsstruktur, die RNA, umgeschrieben. Es existiert eine Reihe unterschiedlicher Arten von RNA mit verschiedensten Funktionen in der Zelle.¹ Insbesondere kann die sog. „messenger“ oder Boten-RNA (mRNA) in Proteine übersetzt werden, die den verschiedenen Zelltypen in unserem Körper ihre morphologischen, physiologischen und funktionellen Eigenschaften, den sog. Phänotyp, verleihen (siehe Abb. 3.1). Für die Steuerung der Genexpression sind bestimmte genetische Strukturen und Elemente erforderlich, die als Promotoren und Enhancer-Sequenzen² bezeichnet werden. Mithilfe solcher Elemente ist es auch möglich, künstlich zu steuern, wie hoch oder niedrig ein Gen exprimiert wird,

¹Ausführlich in: Fehse et al. 2022.

²„Enhancer“ bedeutet Verstärker.

M. A. Morgan · M. Galla · A. Schambach (✉)
Institut Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover,
Hannover, Deutschland
e-mail: Schambach.Axel@mh-hannover.de

B. Fehse
Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie, Klinik für Stammzelltransplantation,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE),
Hamburg, Deutschland

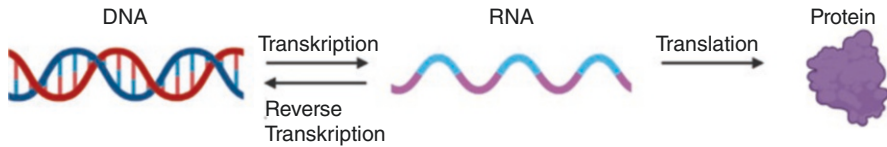


Abb. 3.1 Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Die genetische Information wird in einer stabilen Form, der Desoxyribonukleinsäure (DNA), gespeichert, die repliziert werden kann, um Kopien von sich selbst zu erstellen, z. B. bei der Zellteilung, und/oder in ein flüchtiges Biomolekül, die Ribonukleinsäure (RNA), umgeschrieben wird. RNA kann durch die Wirkung eines Enzyms namens Reverse Transkriptase zur Erzeugung von DNA verwendet werden. Verschiedene RNA-Moleküle können sehr unterschiedliche Funktionen ausführen (Fehse et al. 2022). Boten- (bzw. „messenger“-)RNA kann in Proteine übersetzt („translatiert“) werden. Abbildung mit [Biorender.com](https://www.biorender.com) erstellt

und auch ein Gen in bestimmten Zelltypen an- oder auszuschalten. Dieses Wissen über Genstruktur und -expression wird für medizinische Zwecke wie die Gentherapie genutzt.

Die Gentherapie ist ein molekularmedizinischer Ansatz, der zur Behandlung von Patienten mit angeborenen Krankheiten, die z. B. durch Gendefekte bei monogenen Erbkrankheiten verursacht werden, eingesetzt werden kann. Aber auch erworbene Erkrankungen wie z. B. Krebs oder schwere Infektionen können durch gentherapeutische Ansätze behandelt werden. Hierbei kann die Expression eines fehlenden oder defekten Gens durch das Hinzufügen einer „gesunden“ Genkopie korrigiert werden, was als additive Gentherapie bezeichnet wird. Aber auch die direkte Reparatur von Genen oder die Entfernung von krankheitsverursachenden Genen ist heutzutage möglich.

Mit der Aufklärung des humanen Genoms konnten für viele monogene Erbkrankheiten³ die zugrunde liegenden Gendefekte (Mutationen) identifiziert werden, die zum Verlust von Proteinen oder zur Produktion veränderter Proteine und dadurch zur Entstehung der jeweiligen Krankheit führen. Einige Beispiele für solche Erkrankungen sind schwere kombinierte Immundefekte (SCID),⁴ das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), die chronische Granulomatose (CGD), die zerebrale Adrenoleukodystrophie (CALD), die metachromatische Leukodystrophie (MLD), Hämoglobinopathien wie β -Thalassämie und Sichelzellerkrankung (SCD)⁵ sowie die blasenbildende Erkrankung Epidermolysis bullosa. Beispielhafte Ergebnisse aus Gentherapieversuchen werden später in diesem Kapitel für einige dieser monogenen Erkrankungen vorgestellt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, therapeutische Gene in Zellen zu übertragen, um Krankheiten wie die genannten zu behandeln. Ein gängiger Ansatz ist die Nutzung der natürlichen Fähigkeit von Retroviren, ihre eigene Erbinformation stabil in das Genom menschlicher Zellen zu integrieren. Retroviren haben eben-

³Für einen Katalog humaner Gene und genetischer Erkrankungen siehe unter: <https://www.omim.org/> [12.04.2023].

⁴„Severe combined immunodeficiency“.

⁵„Sickle cell disease“.

falls einen genetischen Bauplan, der jedoch im Gegensatz zu dem des Menschen nicht aus DNA, sondern aus RNA besteht. Dieser RNA-Bauplan codiert für bestimmte virale Strukturproteine, die zum Schutz und zur Einschleusung der viralen RNA in die Zielzelle notwendig sind. Des Weiteren codiert sie für die Reverse Transkriptase, die das Virus nach dem Eintritt in die Zielzelle zum Umschreiben des viralen RNA-Genoms in eine virale DNA nutzt. Letztere wird dann mithilfe eines weiteren Enzyms, der Integrase, in das Genom der Zielzelle eingebaut, woran sich dann die Produktion neuer infektiöser Viruspartikel anschließt. Im Rahmen der Entwicklung der Gentherapie wurden umfangreiche Anstrengungen unternommen, um aus ggf. pathogenen Retro- wie auch anderen Viren ein therapeutisches Werkzeug, den sog. Vektor,⁶ zu erstellen. Dazu werden die Viren so modifiziert,⁷ dass sie ihre Pathogenität und ihr Vermehrungspotenzial vollständig verlieren, aber noch einmalig als Transportvehikel funktionieren. Darauf aufbauend können die retroviralen Vektoren benutzt werden, um therapeutische genetische Informationen effizient in das Genom der Zielzellen einzuschleusen, sind aber nicht in der Lage, neue infektiöse Partikel zu erzeugen.⁸

In den folgenden Abschnitten werden die Beiträge deutscher Forschergruppen zur Entwicklung retroviraler Vektoren zum Transfer therapeutischer Gene, zu deren Sicherheitsanalyse sowie für ihre klinische Anwendung beleuchtet.

3.2 Die Entwicklung der retroviralen Vektortechnologie: Eine Chronologie

Die häufig in der Gentherapie verwendeten retroviralen Vektoren stammen von verschiedenen natürlichen Retroviren ab, die im Laufe von Millionen von Jahren Mechanismen für den Gentransfer entwickelt haben. So werden insbesondere Vektorsysteme auf der Basis des murinen Moloney-Leukämie-Virus (MoMLV) (sog. gammaretrovirale Vektoren) und des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (sog. lentivirale Vektoren) verwendet, da sie einen effizienten Gentransfer und eine stabile genetische Veränderung der Zielzellen ermöglichen. Das heißt, diese retroviralen Vektorsysteme fungieren als Gentaxis, um genetische Informationen (z. B. ein therapeutisches Gen) in die Zielzellen einzuschleusen und diese in ihren Chromosomen zu verankern, sodass sie im Falle einer Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Das verfolgt das Ziel, die Funktion der Zielzelle zu reparieren oder der Zielzelle eine neue oder verbesserte Funktion zu verleihen. Eine erfolgreiche Gentherapie mit retroviralen Vektoren erfordert die

⁶Gentransfervektoren werden auch als Genfähren oder Gentaxis bezeichnet.

⁷Unter anderem werden diejenigen Gene, die für eine Virusvermehrung notwendig sind, aus dem Virusgenom entfernt.

⁸In Abgrenzung zu Viren wird der Gentransfer mit viralen Vektoren daher nicht als Infektion, sondern als Transduktion bezeichnet.

robuste Produktion angemessen hoher Mengen an funktionellen Vektorpartikeln⁹ und den effizienten Eintritt der retroviralen Partikel in die Zielzellen. Die Bindung an die Zielzelle erfolgt bei Retroviren über die Interaktion des Hüll-(Glyko-)Proteins mit einem perfekt passenden Molekül (Rezeptor) auf der Zelloberfläche. Im Zuge der Vektorisierung der Retroviren konnte gezeigt werden, dass sich die ursprünglichen Hüllproteine auch gegen Hüllproteine anderer Viren austauschen lassen. Dieses Verfahren, das man Pseudotypisierung nennt, ermöglicht es u. a., stabilere Viruspartikel herzustellen, die auch andere Zielzellen¹⁰ modifizieren können als das Ursprungsvirus.¹¹ Weiterhin ist das Erreichen von möglichst physiologischen Transgenexpressionsniveaus wichtig, die hoch genug sind, um eine therapeutische Wirkung ohne unerwünschte Genotoxizität oder Phänotoxizität¹² zu erzielen.

Die bahnbrechenden Arbeiten zur Charakterisierung und Vektorisierung von MoMLV-Viren (d. h. gammaretroviralen Vektoren) stammen aus dem Heinrich-Pette-Institut¹³ in Hamburg und basieren auf Arbeiten von Pionieren wie Rudi Jaenisch, Wolfram Ostertag, Manuel Grez und Christopher Baum (Jaenisch et al. 1983; Hilberg et al. 1987). Erste gammaretrovirale Vektorsysteme nutzten zur Expression des jeweiligen therapeutischen Gens die natürlich vorkommenden viralen Promotor- sowie Enhancer-Elemente, die sich in den Long Terminal Repeats (LTR) des Virus befinden und als LTR-gesteuerte Vektoren bezeichnet werden. So basierte z. B. das häufig verwendete murine Stammzellvirus (Hawley et al. 1992) auf dem murinen embryonalen Stammzellvirus (MESV), das zuerst im Ostertag-Labor kloniert worden war (Grez et al. 1990). Weitere Bemühungen, die die Optimierung gammaretroviraler Vektorsysteme zur Erreichung hoher und stabiler Transgenexpressionsniveaus in einer Vielzahl von Zelltypen zum Ziel hatten und die für die therapeutische Wirksamkeit als notwendig erachtet wurden, umfassten die Erforschung genetischer Elemente, die die Transkription und Expression von Transgenen in Zielzellen beeinflussen, sowie die Entwicklung gammaretroviraler Vektor-konfigurationen mit verbesserter Transgenexpression (Baum et al. 1995, 1996, 1998; Hildinger et al. 1998). Die Eliminierung von viruscodierenden Sequenzen führte ebenfalls zu einer verbesserten Transgenexpression (Engels et al. 2003) und diente auch als Maßnahme zu einer erhöhten Sicherheit in den Patienten. In Proof-of-Concept-Experimenten wurde gezeigt, dass diese retroviralen Vektoren zur Expression des Multidrug-Resistance-Proteins 1 (*mdr-1*) in hämatopoetischen, d. h.

⁹Die Konzentration funktioneller Vektorpartikel in einer geeigneten Flüssigkeit wird als Vektortiter bezeichnet.

¹⁰Z. B. kann das HI-Virus nur bestimmte Immunzellen infizieren, die das CD4-Molekül tragen, das HIV als Rezeptor dient. Eine solche enge Spezifität würde die Nutzbarkeit lentiviraler Vektoren stark einschränken.

¹¹Ausführlich in Abschn. 3.3.

¹²Genotoxizität ist der negative Einfluss auf genetische Strukturen bzw. deren Funktionen. Phänotoxizität ist die Manifestation der Nebenwirkungen in der Funktion und/oder Struktur der betroffenen Zelle.

¹³Seit 2022: Leibniz-Institut für Virologie.

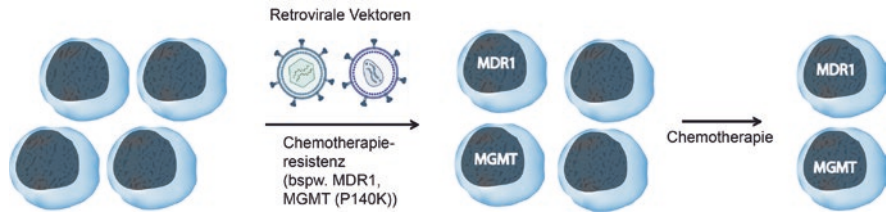


Abb. 3.2 Durch retrovirale Vektoren veränderte Zellen werden resistent gegen Chemotherapie. Die Modifizierung von Zellen zur Expression des Multidrug-Resistenzproteins MDR1 oder der Methylguanin-Methyltransferase P140K-Mutante (MGMT P140K) führt zu einer verbesserten Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika, sodass nur die geschützten (d. h. mit MDR1 oder MGMT markierten) Zellen bei einer medikamentösen Behandlung überleben. Die retroviralen Partikel wurden mit Biorender.com erstellt.

blutbildenden, Vorläuferzellen verwendet werden können, um eine breitere Anwendung der Chemotherapie bei Krebspatienten zu ermöglichen, ohne toxische Nebenwirkungen für das hämatopoetische System (Baum et al. 1995, 1996) (siehe Abb. 3.2).

Leider kam es in einigen Studien, in denen LTR-gesteuerte Vektoren verwendet wurden, um therapeutische Gene in hämatopoetische Stammzellen (HSC) einzubringen, zum Auftreten von Leukämien. Diese schwere Nebenwirkung wurde zuerst in Deutschland in Mausmodellen beobachtet und detailliert analysiert (Li et al. 2002; Baum et al. 2003, 2006; Kustikova et al. 2005), trat aber kurze Zeit später auch in klinischen Studien mit HSC auf (siehe Abschn. 3.5). Sehr wichtig für die spätere klinische Anwendung waren weitere, ebenfalls in Deutschland durchgeführte Studien, die zeigten, dass für analoge LTR-getriebene Vektoren das Risiko solcher maligner Entartungen in differenzierten somatischen Zellen, wie z. B. T-Zellen, deutlich geringer ist (Newrzela et al. 2008, 2012).

Die durch die Insertion (Integration) des LTR-gesteuerten gammaretroviralen Gentherapievektors hervorgerufene maligne Transformation von HSC wurde auf eine sog. Insertionsmutagenese zurückgeführt. Dabei kommt es in seltenen Fällen infolge der Insertion des retroviralen Vektors zur Dysregulation benachbarter Gene, z. B. zur Hochregulation der Expression sog. Proto-Onkogene¹⁴ durch die starken Promotoren und Enhancer des viralen Vektors (Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Ott et al. 2006; Deichmann et al. 2011).

Heute werden in der klinischen retroviralen Gentherapie sicherheitsverbesserte retrovirale Vektorsysteme, sog. selbstinaktivierende (SIN-)Vektoren, verwendet, bei denen die starken viralen Promotoren und Enhancer aus den LTRs entfernt wurden, um das Risiko solcher unerwünschter Ereignisse zu minimieren (Yu et al. 1986). Weiterhin erlaubt dieses Vektordesign eine flexible Auswahl der internen Promotor-

¹⁴Bei Proto-Onkogenen bzw. potenziell krebsfördernden Genen handelt es sich um Gene, die für wichtige regulatorische Proteine codieren, die z. B. den Zellteilungszyklus überwachen. Mutationen in diesen Genen oder eine zu starke Expression können zu Störungen führen, sodass z. B. die Zellteilung aus dem Ruder läuft.

und Enhancer-Sequenzen. Die Prinzipien zur Herstellung gammaretroviraler SIN-Vektoren (Yu et al. 1986) wurden auch erfolgreich auf lentivirale Vektoren übertragen (Naldini et al. 1996; Zufferey et al. 1998). Tatsächlich legen neuere Ergebnisse aus klinischen Gentherapiestudien nahe, dass die Nutzung von SIN-Vektoren das Auftreten der Insertionsmutagenese deutlich reduziert (Cartier et al. 2009; Cavazzana-Calvo et al. 2010; Aiuti et al. 2013; Biffi et al. 2013; Hacein-Bey-Abina et al. 2014, 2015; Sessa et al. 2016).

Internationale Wissenschaftler wie Luigi Naldini, Didier Trono und Kollegen leisteten zahlreiche Beiträge zur Entwicklung lentiviraler Vektoren mit verbesserter Sicherheit, einschließlich der Vereinfachung lentiviraler Vektoren durch Eliminierung zusätzlicher Sequenzen, die für den Transgentransfer nicht entscheidend sind (Zufferey et al. 1997; Dull et al. 1998). Ein Unterschied zu gammaretroviralen Vektoren besteht darin, dass lentivirale Vektoren auch Zellen transduzieren, die sich nicht in Zellteilung befinden (Bukrinsky et al. 1993). Lentivirale SIN-Vektorsysteme sind derzeit das am weitesten verbreitete integrierende Vektorsystem (Tucci et al. 2022) und werden in Deutschland wie auch international in mehreren klinischen Anwendungen eingesetzt (siehe Abschn. 3.4).

3.3 Der gesteuerte Zelleintritt ist ein Schlüssel zum zielgerichteten Gentransfer: die Pseudotypisierung von Vektoren

Wie oben angeschnitten nutzen Retroviren die Interaktion zwischen Glykoproteinen auf der Virushülle (ihren Hüll- oder Envelope-Proteinen) und spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der zu infizierenden Zelle für die Bindung an die Zielzelle. Daher kann die Wahl des Glykoproteins, das zur Pseudotypisierung retroviraler Vektoren verwendet wird, den Zelleintritt der Genföhre in die Zielzellpopulation steuern. Die heute am häufigsten in retroviralen Gentherapieprotokollen verwendeten Glykoproteine wurden aus anderen Viren isoliert, z. B. aus dem Gibbon-Affen-Leukämie-Virus (GALV) und dem Vesikulären Stomatitis-Virus G (VSV-G). Retrovirale Vektoren, die mit dem VSV-G-Protein pseudotypisiert sind, weisen eine höhere Stabilität auf und können ein breiteres Spektrum von Zelltypen transduzieren (Burns et al. 1993); mit der GALV-Hülle pseudotypisierte Vektoren modifizieren besonders effizient primäre menschliche T-Zellen (Bunnell et al. 1997; Fehse et al. 1998) und HSC. Darüber hinaus erwiesen sich Glykoproteine des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (Beyer et al. 2002; Miletic et al. 2004), des Masern- und des Nipah-Virus als nützlich, da mit ihnen sogar ein zellspezifisches Targeting möglich ist (Funke et al. 2008; Buchholz et al. 2015; Bender et al. 2016; Agarwal et al. 2020; Hartmann et al. 2018; Kneissl et al. 2013; Kleinlutzum et al. 2017; Hanauer et al. 2018). Zellspezifische Vektoren sind insbesondere für In-vivo-Gentherapien von großer Bedeutung, bei denen die eigentlichen Zielzellen möglichst effizient modifiziert, andere Gewebe aber ausgespart werden sollen.

3.4 Stabile therapeutische Genexpression durch Integration ins Zellgenom

Die stabile Integration der Vektoren in das Wirtsgenom (und damit die Weitergabe an Tochterzellen im Rahmen der Zellteilung) ist für den langfristigen Erfolg vieler gentherapeutischer Ansätze essenziell. In solchen Fällen sind gammaretrovirale und lentivirale Vektoren oft die erste Wahl der Gentherapeuten. Allerdings ist die Integration bei retroviralen Vektoren nicht steuerbar, erfolgt also weitgehend zufällig. Im Ergebnis sind die Insertionsstellen der Viren (über alle Zellen betrachtet) weitgehend gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt.¹⁵ Zu beachten ist jedoch, dass Retroviren ein evolutionäres „Eigeninteresse“ haben, in solche Bereiche des Genoms zu integrieren, die für ihre eigene Vermehrung förderlich sind. Das trifft vor allem auf „offene Genombereiche“ zu, also solche, in denen sich in der jeweiligen Zelle aktive Gene befinden. So kann das Virus sicherstellen, dass auch die eigenen Gene langfristig abgelesen (und nicht etwa dauerhaft stillgelegt) werden.

Die von Retroviren abgeleiteten Vektoren haben die Vorlieben für bestimmte Integrationsorte geerbt – gammaretrovirale Vektoren fügen sich häufiger in Transkriptionsstartstellen ein, also in Nachbarschaft zu den Promotoren, und lentivirale Vektoren in aktiv transkribierte Gene.¹⁶ Verschiedene zelluläre Faktoren, die sog. Tethering-Faktoren, scheinen gemeinsam mit retroviralen Integrasen die Insertion von gammaretroviraler oder lentiviraler Vektor-DNA in das Wirtsgenom zu steuern (Cherepanov et al. 2003; De Rijck et al. 2013; Gupta et al. 2013; Sharma et al. 2013; El Ashkar et al. 2014, 2017).

Wie oben angeführt kann die Integration retroviraler Vektoren, insbesondere, wenn sie in der Nähe von Proto-Onkogenen erfolgt, mit Risiken behaftet sein. Daher werden weiterhin viele Ressourcen für den Nachweis und die Charakterisierung von Insertionsstellen retroviraler Vektoren sowie für die Entwicklung von verbesserten Tests zur Bewertung der biologischen Sicherheit aufgewendet. Viele dieser Technologien wurden maßgeblich von deutschen Gruppen entwickelt, wie z. B. die Techniken der LM-PCR („ligation-mediated polymerase chain reaction“) (Schmidt et al. 2001) und der LAM-PCR (Kustikova et al. 2008, 2009) in Verbindung mit Fortschritten bei genetischen Sequenzierungsprotokollen (Arens et al. 2012; Wunsche et al. 2018). So konnte die Analyse der retroviralen Insertionsstellen weiter verbessert werden und hilft dabei, potenzielle Nebenwirkungen der Gentherapie besser zu verstehen. Sie wird inzwischen routinemäßig für die präklinische Sicherheitsbetrachtung und zur Überwachung klinischer Studien eingesetzt (Schmidt et al. 2001; Schwarzwaelder et al. 2007; Deichmann et al. 2007).¹⁷

¹⁵ Im Genom jeder einzelnen Zelle finden sich i. d. R. nur eine oder wenige Vektorinsertionen. Im Rahmen der Gentherapie wird die Zahl der Insertionen aus Sicherheitsgründen bewusst gering gehalten (vgl. Fehse et al. 2004b).

¹⁶ Man spricht daher auch von „halbzufälliger“ („semi-random“) Integration.

¹⁷ Im Rahmen der Gentherapie werden i. d. R. Hunderte Millionen modifizierter Zellen infundiert. In jeder einzelnen Zelle hat der Vektor seine eigene Insertionsstelle. Dies illustriert, wie komplex es ist, alle Insertionsstellen zu kartieren.

Während die ersten Studien zum Nachweis der Insertionsmutagenese in Mausmodellen erfolgten, steht mit dem In-vitro-Immortalisierungssassay (IVIM) heute ein (ebenfalls in Deutschland entwickelter) Test zur Verfügung, der die potenziellen Nebenwirkungen retroviraler Vektoren (maligne Transformation muriner Knochenmarkzellen) im Brutschrank analysiert (Modlich et al. 2006; Stein et al. 2013; Wolstein et al. 2014; Negre et al. 2015; Brendel et al. 2018; Poletti et al. 2018; Charrier et al. 2019; Garcia-Perez et al. 2020; Huang et al. 2016, 2017; Moscatelli et al. 2018). Dieser Test wird von den internationalen Zulassungsbehörden, z. B. PEI, EMA, MHRA, FDA,¹⁸ zur Bewertung des Transformationspotenzials von Vektoren akzeptiert, die zur Behandlung monogener und erworbener Krankheiten entwickelt wurden. Ein kürzlich in Hannover entwickelter Surrogat-Assay für die Bewertung der Genotoxizität (SAGA) zur Vorhersage des mutagenen Risikos integrierter retroviraler Vektoren nutzt maschinelles Lernen, um eine einzigartige Genexpressions-signatur in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC) der Maus nach Transduktion mit den potenziell genotoxischen Vektoren zu erkennen (Schwarzer et al. 2021).

Zusätzlich zu den gammaretroviralen und lentiviralen Vektorsystemen wurde vor Kurzem in Hannover ein alpharetrovirales SIN-Vektorsystem entwickelt,¹⁹ das auf dem aus Vögeln isolierten aviären Sarkom-Leukose-Virus (ASLV) basiert. Alpharetrovirale Vektoren weisen in Säugerzellen ein im Vergleich zu den genannten Vektoren neutraleres Integrationsmuster²⁰ auf (Suerth et al. 2010, 2012; Moiani et al. 2014). IVIM-Tests zeigten außerdem, dass alpharetrovirale SIN-Vektoren mit internen Promotoren zur Steuerung der Transgenexpression im Vergleich zu gamma-retroviralen und lentiviralen SIN-Vektoren weniger Transformationsereignisse in Knochenmarkzellen von Mäusen verursachten (Suerth et al. 2012), sodass sie eine interessante Alternative für zukünftige Gentherapiestudien darstellen.

Ein weiteres integrierendes Vektorsystem basiert auf dem apathogenen Foamy-Retrovirus, das ein relativ zufälliges Integrationsmuster aufweist und für das in einem humanisierten CD34-positiven-Zelltransplantationsmodell gezeigt werden konnte, dass es weniger häufig in der Nähe von Genen und insbesondere Proto-Onkogen-Transkriptionsstartstellen integriert (Lindemann und Rethwilm 2011; Everson et al. 2016). Die direkte In-vivo-Verabreichung von Foamy-Vektoren hat gezeigt, dass sie die schwere kombinierte Immundefizienz SCID-X1 bei Hunden korrigieren konnten (Burtner et al. 2014).

Nichtintegrierende retrovirale Vektoren sind ein weiteres interessantes Werkzeug für die klinische Umsetzung. Die gezielte Modulation bestimmter Schritte des retroviralen Lebenszyklus ermöglicht die Herstellung nichtintegrierender Vektoren, mit denen (a) zirkuläre 1- und 2-LTR-Episomen, (b) retrovirale oder nichtvirale mRNAs

¹⁸EMA: European Medicines Agency, MHRA: Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (UK), FDA: Food and Drug Administration (USA).

¹⁹Autor Axel Schambach gibt einen Interessenkonflikt an, da er ein Co-Erfinder eines Patents zu alpharetroviralen SIN-Vektoren ist.

²⁰Die Integrationen erfolgen über das gesamte Genom verteilt mit weniger Vorliebe für aktive Gene bzw. Promotorregionen.

und (c) bestimmte Proteine auf Zielzellen übertragen werden können. Dies sind interessante Werkzeuge für Situationen, in denen ein „Hit-and-Run“-Ansatz wünschenswert sein könnte, z. B. für die vorübergehende Expression einer Designer-nuklease oder -Rekombinase, um im Sinne des Genome-Editing eine Genomveränderung zu vermitteln (Galla et al. 2004, 2011; Philpott und Thrasher 2007; Voelkel et al. 2010; Maeder und Gersbach 2016; Baron et al. 2022; Gurumoorthy et al. 2022).

3.5 Die Gentherapie für monogene Erbkrankheiten

3.5.1 Schwere kombinierte Immundefizienz (SCID)

SCID-Patienten haben Gendefekte z. B. in der Adenosin-Deaminase (ADA) (ADA-SCID), der Interleukin-2-Rezeptor- γ -Kette (IL2RG) (SCID-X1) oder der Interleukin-7-Rezeptor- α -Kette, die zu einem Verlust oder der Nichtfunktionalität von Immunzellen (z. B. T-, NK-²¹ und B-Zellen) führen, sodass die Patienten gegen Pathogene weitgehend schutzlos sind und häufig, oft lebensbedrohliche Infektionen entwickeln. Bis vor Kurzem war die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) die einzige heilende Behandlung für SCID. SCID-Patienten, für die kein passender Spender für eine allogene HSCT gefunden werden kann, können heute mit Gentherapien behandelt werden, für die autologe (eigene) HSPC mit korrigierten Versionen von *ADA*, *IL2RG* oder *IL7R* ausgestattet werden. Die Transduktion von HSPC mit einem LTR-gesteuerten gammaretroviralen Vektor, der im Labor von Christopher Baum entwickelt wurde, zur Expression von ADA führte – nach Versagen und Beendigung von PEG-ADA²² – zu einer stabilen Transgenexpression und polyklonalen T-Zell-Rekonstitution ohne unerwünschte Nebeneffekte (Gaspar 2006). Andere Studien lieferten weitere Belege dafür, dass LTR-gesteuerte gammaretrovirale Vektoren zur Verabreichung von ADA den normalen Purinstoffwechsel ohne vektorbedingte Nebenwirkungen bei Patienten über 13 Jahre nach der Behandlung wirksam wiederherstellten (Aiuti et al. 2009; Ferrua und Aiuti 2017). Diese Studien führten zur Marktzulassung des „Advanced Therapy Medicinal Product“ (ATMP) Strimvelis® in Europa. Orchard Therapeutics, das Unternehmen, das Eigentümer von Strimvelis ist, hat jedoch kürzlich angekündigt, dass es seine Investitionen in Strimvelis einstellen wird.²³ Diese Entscheidung könnte darauf

²¹ NK-Zellen sind natürliche Killerzellen, eine Art von weißen Blutkörperchen, die als Teil der angeborenen Immunantwort infizierte oder anormale Zellen im Körper erkennen und zerstören, um das Immunsystem zu schützen.

²² PEG (Polyethylenglykol) wird in der Medizin häufig als Hilfsstoff bei der Herstellung von Arzneimitteln eingesetzt, um deren Stabilität zu erhöhen, ihre Freisetzung zu verlängern und ihre Bioverfügbarkeit zu verbessern.

²³ Siehe unter: <https://www.biopharmadive.com/news/orchard-layoffs-restructuring-gene-therapy/621261/> [01.05.2023].

zurückzuführen sein, dass in den letzten sechs Jahren nur 16 Patienten mit Strimvelis behandelt wurden (siehe auch Alex/König, Kap. 22).

In Studien zur Behandlung einer anderen Immundefizienz (SCID-X1) wurden LTR-gesteuerte gammaretrovirale Vektoren verwendet, die das Wildtyp-IL2RG-Gen in HSPC von SCID-X1-Patienten exprimieren. Während die Immunität bei den meisten Patienten erfolgreich wiederhergestellt werden konnte, war dieser Gentherapieansatz leider mit erheblicher Genotoxizität verbunden. 30 % (6 von 20) der Patienten in zwei unabhängigen Studien entwickelten akute Leukämien aufgrund der Aktivierung der Expression von Proto-Onkogenen (z. B. *LMO2*, *CCND2*, *MECOM*) durch die Insertion gammaretroviraler Vektoren (Cavazzana-Calvo et al. 2000; Hacein-Bey-Abina et al. 2002, 2010; Gaspar et al. 2011; Cavazzana et al. 2019).²⁴

Eine anschließende multinationale Studie bei neun Jungen mit SCID-X1 zeigte die Wirksamkeit und Sicherheit eines in Hannover mitentwickelten sicherheitsverbesserten gammaretroviralen SIN-Vektors, der das IL2RG-Gen in autologe CD34-positive Zellen aus dem Knochenmark einbringt (Hacein-Bey-Abina et al. 2014).²⁵ Analysen der Insertionsstellen dieses retroviralen SIN-Vektors ergaben ein polyklonales Integrationsprofil mit einer geringeren Häufung von Insertionsstellen in der Nähe bekannter Proto-Onkogene (*LMO2*, *MECOM*) und ohne Auftreten einer Zelltransformation bei einem der bisherigen Patienten, was auf ein verbessertes Sicherheitsprofil des gammaretroviralen SIN-Vektors hindeutet (Hacein-Bey-Abina et al. 2014). Die klinische Studie diente zudem als Grundlage für eine laufende multizentrische internationale Studie zur Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit eines lentiviralen SIN-Vektors bei SCID-X1-Patienten.²⁶ Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 2,2 Jahren wiesen alle behandelten Patienten eine robuste Immunrekonstitution mit korrigierten T-, NK- und B-Zellpopulationen auf, ohne dass es zu gentherapiebedingten unerwünschten Ereignissen kam. Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse zweier anderer kürzlich durchgeführter Studien, die ebenfalls eine Rekonstitution der T-, NK- und B-Zelllinien nach Anwendung lentiviraler SIN-Vektoren zur Behandlung von SCID-X1-Patienten zeigten (De Ravin et al. 2016; Mamcarz et al. 2019).²⁷ Dies ist auch deshalb ein großer Fortschritt, weil in früheren Studien nur eine Rekonstitution der T-Zellen beobachtet wurde.

²⁴ Erfreulicherweise ließen sich diese Leukämien bei 5 der 6 betroffenen Patienten erfolgreich therapieren.

²⁵ Siehe NCT01410019: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01410019>; NCT01175239: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01175239>; NCT01129544: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01129544> [01.05.2023].

²⁶ Siehe unter: <https://ashpublications.org/blood/article/140/Supplement%201/7770/491310/Lentiviral-Gene-Therapy-with-Low-Dose-Conditioning>; NCT03311503: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03311503> [01.05.2023].

²⁷ Siehe NCT01306019: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01306019>; NCT01512888: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01512888> [01.05.2023].

3.5.2 Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)

WAS ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch immunologische Defizite mit verminderter Fähigkeit zur Blutgerinnung aufgrund einer unzureichenden Menge²⁸ und Funktion von Thrombozyten gekennzeichnet ist. Die Beobachtung, dass Mutationen im WAS-Gen („WASP actin nucleation promoting factor“), das für das zytosolische Protein WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) codiert, zu WASP-Varianten mit abgeschwächter Funktion und Expression führen können, machte WAS-Patienten zu potenziellen Kandidaten für eine Gentherapie.

In der ersten in Deutschland durchgeführten Stammzellgentherapie für Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (Boztug et al. 2010; Braun et al. 2014) wurden zehn Patienten mit autologen CD34-positiven-HSPC behandelt, die mit einem von MLV abgeleiteten LTR-getriebenen gammaretroviralen Vektor korrigiert wurden, der WASP exprimiert.²⁹ Die Gentherapie führte zu einer geringeren Häufigkeit und Schwere von Infektionen, einer Korrektur der Thrombozytopenie und zur Reduktion und z. T. zum Verschwinden von Hautmanifestationen (Ekzemen). Nachdem in der frühen Phase nach Gentherapie keine klonalen Auffälligkeiten beobachtet wurden, entwickelten sieben Patienten innerhalb von 5 Jahren nach der Behandlung eine akute Leukämie (Braun et al. 2014).³⁰

In einer Folgestudie wurde der gammaretrovirale LTR-Vektor durch einen lentiviralen SIN-Vektor, der einen proximalen WAS-Promotor zur Expression des therapeutischen WASP-Transgens verwendet, ersetzt. In dieser Studie mit autologen HSPC erwies sich die Gentherapie bei sieben WAS-Patienten mit schwerer Erkrankung als praktikabel und sicher (Charrier et al. 2007; Hacein-Bey Abina et al. 2015). Ein Patient starb an einem septischen Schock aufgrund einer therapieresistenten Herpesvirusinfektion,³¹ aber bei den anderen sechs Patienten konnte ein stabiles Anwachsen funktioneller genmodifizierter Zellen mit WASP-Expression in T-, NK- und B-Zellen beobachtet werden. Wichtig ist, dass keine Anzeichen für vektorbedingte Toxizität beobachtet wurden, was die Sicherheit der lentiviralen SIN-Vektoren für die Gentherapie weiter untermauert (Aiuti et al. 2013; Hacein-Bey Abina et al. 2015).

²⁸Thrombozytopenie ist ein Mangel an Blutplättchen.

²⁹Nummer des Deutschen Registers für Klinische Studien: DRKS00000330, siehe unter: <https://drks.de/search/en/trial/DRKS00000330> [01.05.2023].

³⁰In neueren Pressemitteilungen wird von 8 Kindern mit Leukämie und bedauerlicherweise 3 verstorbenen Patienten berichtet.

³¹Hier handelt es sich also nicht um eine Nebenwirkung der Gentherapie, sondern um eine Folge eines ausgeprägten Immundefekts, für die die Therapie zu spät kam.

3.5.3 Chronische Granulomatose (CGD)

Bei CGD-Patienten sind die Immunzellen der myeloischen (das Knochenmark betreffenden) Linie weniger in der Lage, Sauerstoffradikale zu erzeugen, die für die Zerstörung aufgenommenen Krankheitserreger wichtig sind. Diese verminderte Funktionalität der Immunzellen der angeborenen Immunantwort führt zu wiederkehrenden Infektionen. Die häufigste Form von CGD wird X-chromosomal vererbt (X-CGD); sie wird durch *CYBB*-Mutationen³² verursacht, die zu einem Verlust der NADPH-Oxidase-Aktivität der Phagozyten³³ führen. Es gibt auch autosomal rezessive³⁴ CGD-Formen, die durch Mutationen in *CYBA*,³⁵ *NCF1*,³⁶ *NCF2* oder *NCF4* verursacht werden (Übersicht in Roos 2019).

Ähnlich wie bei den WASP-Studien erreichten die X-CGD-Patienten, deren HSPC mit einem gammaretroviralen LTR-gesteuerten Vektor behandelt worden waren, sehr schnell nach der Therapie eine Beseitigung vieler Krankheitssymptome. Allerdings kam es danach innerhalb weniger Monate zu einem Verlust der therapeutischen Genexpression aufgrund von Transgen-Silencing (Abschalten des Promotors/Enhancers im Vektor durch Methylierung).³⁷ Parallel dazu wurde ein klonales Wachstum hämatopoetischer Zellen mit retroviralen Insertionsstellen im *MECOM(MDS1-EVII)*-Lokus festgestellt,³⁸ was zur Transformation der genveränderten Zellen beitrug (Ott et al. 2006; Stein et al. 2010; Siler et al. 2015).³⁹ Auch hier wurde für die Folgestudien ein lentiviraler SIN-Vektor entwickelt, der so konstruiert wurde, dass er hGP91-PHOX über einen phagozytenspezifischen Promotor exprimiert. Dieser wurde von Gruppen in London und Frankfurt gemeinsam entwickelt und in klinischen Studien getestet (Santilli et al. 2011; Kohn et al. 2020).⁴⁰ Bei sechs der neun Patienten konnte eine klinische Wirksamkeit über mehr als zwölf Monate nachgewiesen werden, ohne dass es Anzeichen für ein Silencing des Transgens oder eine klonale Expansion gab.

³² Cytochrom b-245 Beta-Kette, gp91PHOX.

³³ Phagozyten (auch Fresszellen) vernichten Krankheitserreger, wofür die NADPH-Oxidase-Aktivität benötigt wird.

³⁴ Autosomal rezessiv vererbte Krankheiten brechen nur aus, wenn zwei defekte Kopien (je eine von beiden Elternteilen) des betreffenden Gens geerbt wurden, z. B. bei Mukoviszidose. Autosomal dominant vererbte Krankheiten brechen bereits aus, wenn eine defekte Kopie des betreffenden Gens von einem Elternteil geerbt wurde, z. B. bei Morbus Huntington.

³⁵ Cytochrom b-245-Alpha-Kette.

³⁶ Neutrophiler zytosolischer Faktor 1.

³⁷ Bei der Methylierung der DNA werden Methylgruppen (-CH₃) an bestimmte Basenpaare der DNA angehängt. Solche epigenetischen Veränderungen können z. B. bewirken, dass das Gen nicht mehr abgelesen wird.

³⁸ Dabei handelt es sich um einen Proto-Onkogen-Lokus, der schon für seine Rolle bei der Leukämieentstehung bekannt war.

³⁹ Siehe NCT00564759: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00564759> [01.05.2023].

⁴⁰ Siehe NCT01855685: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01855685>; NCT02234934: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02234934> [01.05.2023].

3.5.4 Hämoglobinopathien

Hämoglobinopathien sind Erbkrankheiten, die durch Mutationen und/oder Deletionen in α - oder β -Globin-Genen gekennzeichnet sind und zu einer fehlerhaften oder instabilen Hämoglobinsynthese⁴¹ führen. Die beiden Hauptgruppen der Hämoglobinopathien sind die autosomal rezessiven Thalassämie-Syndrome und die Sichelzellanämie sowie die autosomal dominanten Hämoglobinstörungen. Hämoglobinopathien sind vor allem in Ländern des globalen Südens verbreitet, werden in Deutschland infolge der Zuwanderung aber inzwischen häufiger diagnostiziert (Kohne und Kleihauer 2010). Früher war die allogene HSCT die einzige Heilungsmöglichkeit für Hämoglobinopathien, aber mittlerweile gibt es mehrere Gentherapiestudien für Patienten, für die es keinen geeigneten HSCT-Spender gibt. Mindestens drei von der Firma Bluebird Bio gesponserte Studien, bei denen lentivirale Vektoren zur Transduktion autologer hämatopoetischer Zellen ex vivo eingesetzt werden, wurden bzw. werden weltweit (inkl. Deutschland) durchgeführt. Eine laufende Studie ist beispielsweise eine multizentrische Studie zur Behandlung von transfusionsabhängigen β -Thalassämie-Patienten, die mit Gentherapie behandelt wurden, u. a. an der Medizinischen Hochschule Hannover (Magrin et al. 2022).⁴² Alle vier behandelten Patienten sind 4,6 bis 7,9 Jahre nach der Gentherapie transfusionsfrei geblieben, ohne dass behandlungsbedingte Nebenwirkungen aufgetreten sind.

Eine weitere, an mehreren Standorten durchgeführte Phase-3-Studie untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit der Gentherapie mit LentiGlobin BB305 (Betibeglogene autotemcel, Zynteglo®) bei transfusionsabhängigen β -Thalassämie-Patienten im Alter von ≤ 50 Jahren, die verschiedene Genotypen haben.⁴³ Zu den Standorten in Deutschland gehörten die Medizinische Hochschule Hannover und die Universität Heidelberg.

Eine weitere Phase-3-Studie mit mehreren Standorten (einschließlich der Medizinischen Hochschule Hannover) bewertete die Wirksamkeit und Sicherheit der Gentherapie mit einem lentiviralen β A-T87Q-Globin-Vektor bei transfusionsabhängigen β -Thalassämie-Patienten, die ≤ 50 Jahre alt sind und keinen $\beta 0/\beta 0$ -Genotyp haben.⁴⁴ Die Transfusionsunabhängigkeit wurde bei 20 von 22 auswertbaren Patienten erreicht. Allerdings hatten vier Patienten mindestens ein unerwünschtes Ereignis, das als mit der Gentherapie in Zusammenhang stehend angesehen wurde, darunter ein schwerer Fall von Thrombozytopenie (Locatelli et al. 2022). Zynteglo® hat vor Kurzem die Marktzulassung durch die EMA erhalten,⁴⁵ wurde dann aber durch die Firma freiwillig vom Markt genommen, da

⁴¹ Der „Blutfarbstoff“ Hämoglobin dient als Sauerstoffträger in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten).

⁴² Siehe NCT02633943: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02633943> [01.05.2023].

⁴³ Siehe NCT03207009: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03207009> [01.05.2023].

⁴⁴ Siehe NCT02906202: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02906202> [01.05.2023].

⁴⁵ Siehe unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zynteglo> [01.05.2023].

keine Einigung mit den Kostenträgern über die Erstattung erreicht werden konnte.⁴⁶ In den USA kostet die Behandlung mit Zynteglo® 2,8 Mio. US\$, ein Mehrfaches der ebenfalls kurativen allogenen Stammzelltransplantation (siehe auch Alex/König, Kap. 22).

3.5.5 Junktionale Epidermolysis bullosa (JEB)

JEB ist eine Hautadhäsionsstörung zwischen Epidermis und Dermis,⁴⁷ die durch Ablösung der obersten Hautschicht und der Schleimhäute aufgrund von Mutationen in Genen wie *COL17A1*, *ITGB4*, *LAMA3*, *LAMB3* oder *LAMC2* gekennzeichnet ist. Die Durchführbarkeit und Sicherheit einer Gentherapie zur Behandlung eines erwachsenen Patienten mit *LAMB3*-defizientem JEB, die durch eine Mutation des *LAMB3*-Gens verursacht wurde, wurde schon vor mehr als 15 Jahren in Italien nachgewiesen (Mavilio et al. 2006). Primäre Keratinozyten des Patienten wurden mit einem LTR-getriebenen gammaretroviralen Vektor transduziert, der die *LAMB3*-cDNA in voller Länge exprimiert. *LAMB3* war funktional, und die transplantierte Haut blieb während der einjährigen Nachbeobachtungszeit stabil, ohne Blasen, Infektionen, Entzündungen oder Immunreaktionen (Mavilio et al. 2006). Zur zweiten Anwendung dieser Form der Gentherapie kam es in Deutschland mit dem Ziel, das Leben eines siebenjährigen Kindes zu retten, das an einer schweren Form von JEB litt, die Blasen und Hauterosionen auf etwa 80 % seiner gesamten Körperoberfläche verursachte (Hirsch et al. 2017). Der oben beschriebene LTR-gesteuerte gammaretrovirale Vektor (MLV-RV) wurde zur Expression von *LAMB3*-cDNA verwendet, und die durch diesen Gentherapieansatz erzeugte transplantierte und regenerierte Haut war vollständig funktional und resistent gegenüber mechanischer Belastung. Untermauert wurde dies durch das Fehlen von Blasen oder Hauterosionen über 21 Monate. Inzwischen zeigte die langfristige Nachbeobachtung dieses Patienten, dass die transgene Epidermis 5 Jahre und 5 Monate nach der Transplantation der gentherapeutisch veränderten autologen epidermalen Transplantate stabil und funktional waren (Kueckelhaus et al. 2021), und damit die Grunderkrankung weitgehend kurativ behandelt worden war.

3.6 Gentherapie für erworbene Krankheiten

3.6.1 Selektions- und Eliminationsansätze in der Gentherapie

Die allogene HSCT ist zwar die einzige kurative Behandlung für verschiedene bösartige und nicht bösartige Erkrankungen, sie ist jedoch häufig mit potenziell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen wie schweren Infektionen und der Graft-versus-

⁴⁶Siehe unter: <https://www.dgho.de/aktuelles/news/newsarchiv/2021/bluebird-bio-nimmt-das-gentherapeutikum-zynteglo-r-aus-wirtschaftlichen-gruenden-vom-deutschen-markt> [13.04.2023].

⁴⁷Epidermis ist die äußere Hautschicht, Dermis die Hautschicht darunter.

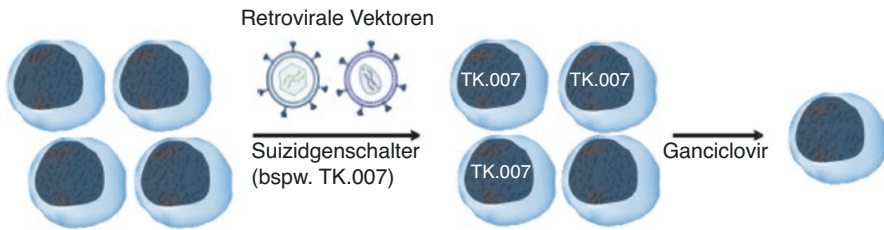


Abb. 3.3 Strategie zur Eliminierung genveränderter Zellen im Falle unerwünschter Ereignisse. Zellen können genetisch so modifiziert werden, dass sie „Suizidgene“ wie die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus (scHSV-tk) oder davon abgeleitete, effizientere Varianten (z. B. TK.007) exprimieren. Dieser Ansatz ermöglicht eine spätere Eliminierung modifizierter Zellen, falls diese entarten, unerwünschte Immunreaktionen hervorrufen oder einfach entfernt werden sollen, nachdem die klinische Krankheit abgeklungen ist. Die retroviralen Partikel wurden mit [Bioender.com](#) erstellt.

Host-Disease (GvHD)⁴⁸ verbunden. Um das GvHD-Risiko zu minimieren und zugleich die erwünschten spenderimmunzellvermittelten Effekte⁴⁹ beizubehalten, wurden die Spender-T-Zellen mit einem „Suizidgen“ modifiziert. Solche Suizidgene ermöglichen eine induzierbare Entfernung der genmodifizierten allogenen T-Zellen, falls beim Patienten schwere GvHD-Reaktionen auftreten sollten (Bonini et al. 1997; Tiberghien et al. 2001).

Eine Phase-1/2-Studie zur Evaluierung der Transplantation von CD34-angereicherten⁵⁰ peripheren Blutstammzellen, die mit dem HSV-TK-Suizidgen⁵¹ modifiziert wurden, wurde bei einem MDS (Myelodysplastische Syndrom)- und zwei CML (Chronische Myeloische Leukämie)-Patienten in Hamburg durchgeführt (Fehse et al. 2004a) (siehe Abb. 3.3). Es wurden keine akuten Toxizitäten beobachtet, und bei allen drei Patienten kam es nach der Transplantation zu einer raschen Rekonstitution. Bei einem Patienten entwickelte sich eine akute GvHD Grad II der Haut, die nach Induktion des Suizidgens durch Ganciclovir-Gabe vollständig abklang und mit einem raschen Verlust der genmodifizierten T-Zellen einherging. Bei einem weiteren Patienten wurden die modifizierten T-Zellen abgestoßen. Bei beiden Patienten, die die genetisch modifizierten T-Zellen verloren hatten, kam es anschließend zu einem sekundären Transplantatversagen, was auf die Bedeutung der Spender-T-Zellen für das langfristige Anwachsen des Transplantats hinweist.

⁴⁸Die Spender-gegen-Wirt-Krankheit ist eine potenziell lebensbedrohliche Krankheit, die durch bei der HSCT mitübertragenen Immunzellen des Spenders ausgelöst wird, die gesundes Gewebe des Empfängers angreifen.

⁴⁹Spender-gegen-Leukämie („graft-versus-leukemia“, GVL) und Spender-gegen-Infektion („graft-versus-infection“, GVI).

⁵⁰Bei CD34 handelt es sich um ein Oberflächenantigen (Marker), das typischerweise auf Blutstammzellen exprimiert und daher zu ihrer Anreicherung benutzt wird.

⁵¹Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase. Der Selbstmord der Zellen wird durch das Virostatikum Ganciclovir ausgelöst.

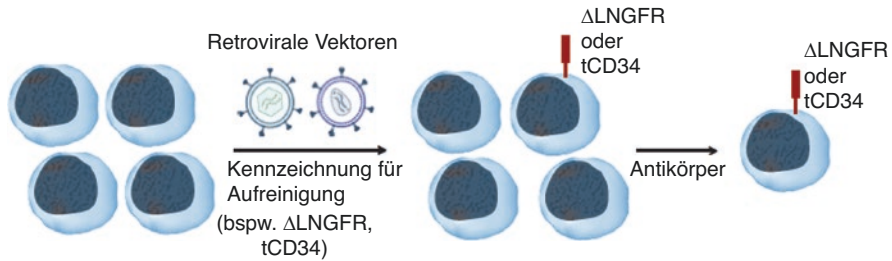


Abb. 3.4 Genetische Modifikation von therapeutischen Zellen für deren Aufreinigung
Therapeutische Zellen können mit retroviralen Vektoren modifiziert werden, die die Expression spezifischer Formen von Rezeptorproteinen ermöglichen, wie z. B. verkürzte Formen von CD34 (tCD34) oder des Nervenwachstumsrezeptors mit niedriger Affinität (Δ LNGFR). Gegen diese Oberflächenmoleküle gerichtete Antikörper können dann für eine In-vitro-Anreicherung genetisch modifizierter Zellen verwendet werden. Die retroviralen Partikel wurden mit [Biorender.com](https://www.biorender.com) erstellt

Für besagten Suizidgenansatz, aber auch andere Gentherapien, ist es wichtig, dass dem Patienten möglichst ausschließlich genetisch modifizierte Zellen infundiert werden. Um dies zu erreichen, werden mit dem Vektor neben dem therapeutischen auch spezielle „Markergene“ eingebracht, die eine Anreicherung der modifizierten Zellen ermöglichen. Zum Beispiel wurde in Hamburg für die Anreicherung gentechnisch veränderter primärer menschlicher T-Zellen eine verkürzte Form von CD34 (tCD34) entwickelt, wodurch eine hohe Reinheit ($> 95\%$) erreicht werden kann (Fehse et al. 2000) (siehe Abb. 3.4). Diese Expressionskassette wurde dann mit einer Variante des Ganciclovir-induzierbaren Selbstmordgens Herpes-Simplex-Virus-Thymidinekinase (scHSV-tk) gekoppelt, um ein tCD34-scHSV-tk-Fusionsprotein zu erzeugen, das von dem gammaretroviralen Hybridvektor MP71 exprimiert wird, der die MPSV-LTR und die MESV-Leader-71-Sequenz enthält (Fehse et al. 2002). Der in Deutschland entwickelte Vektor erwies sich bei einer in London durchgeführten klinischen Studie bei drei Kindern, die T-Zell-depletierte CD34-positive-HSC von nicht passenden Spendern erhielten, als praktikabel und sicher (Zhan et al. 2013).⁵²

Eine multizentrische Phase-1–2-Studie mit einer klinischen Prüfstelle an der Medizinischen Hochschule Hannover untersuchte die Infusion von mit HSV-TK transduzierten Spenderlymphozyten bei 50 Hochrisiko-Leukämiepatienten nach haploidenter⁵³ Stammzelltransplantation (Ciceri et al. 2009).⁵⁴ Die Spenderlymphozyten wurden mit dem gammaretroviralen Vektor SFCMM-3 modifiziert, der das HSV-tk-Gen über den LTR exprimiert und ein anderes Markergen enthält,

⁵² Siehe NCT01204502: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01204502> [01.05.2023].

⁵³ „Halbpassend“: Findet sich kein vollständig passender Spender, kann können z. B. auch Stammzellen von einem Elternteil auf ihr Kind (oder einem leiblichen Kind auf ein Elternteil) übertragen werden. Da die Transplantationsantigene von beiden Elternteilen geerbt werden, gibt es in diesen Fällen eine Übereinstimmung von mind. 50 %.

⁵⁴ Siehe NCT00423124: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00423124> [01.05.2023].

den „low affinity nerve growth factor“-Rezeptor (LNGFR). Dessen intrazelluläre Domäne wurde entfernt (Δ LNGFR), um die Aktivierung der Signalkaskade zu inhibieren, aber dennoch die Selektion der transduzierten Zellen über die extrazelluläre Domäne zu ermöglichen (siehe Abb. 3.4). Das Ausbleiben akuter oder chronischer unerwünschter Ereignisse beweist die Sicherheit dieses Gentherapieansatzes. Die Infusion von TK-modifizierten Lymphozyten schien die Immunrekonstitution zu beschleunigen, und die Induktion des Selbstmordgens kontrollierte erfolgreich die GvHD bei zehn Patienten mit akuter GvHD und einem Patienten mit chronischer GvHD (Ciceri et al. 2009; Weissinger et al. 2015). Obwohl das SFCMM3-basierte ATMP im Jahr 2016 eine bedingte Marktzulassung (CMA) in Europa (als Zalmoxis®) erhielt, wurde die parallele Phase-3-Studie abgebrochen und die CMA auf Antrag der Firma (MolMed) aus kommerziellen Gründen Ende 2019 zurückgezogen.

Um eine schnellere Eliminierung der veränderten Zellen bei niedrigeren Ganciclovir-Konzentrationen zu ermöglichen und somit die unspezifische Toxizität zu verringern, wurden von verschiedenen Gruppen optimierte Versionen des HSV-TK-Suizidgens entwickelt, wie z. B. TK.007, das in einer Kooperation zwischen dem UK Hamburg-Eppendorf, der Goethe-Uni in Frankfurt und dem Karolinska-Institut in Stockholm entstanden ist (Preuss et al. 2010, 2011).

3.6.2 Gentherapie bei Krebserkrankungen

Um Krebserkrankungen mithilfe retroviraler Vektoren gezielt zu bekämpfen, macht man sich verschiedene der oben genannten Mechanismen zunutze. So wurde gezeigt, dass lentivirale Vektoren, die mit dem Glykoprotein des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) pseudotypisiert sind, bestimmte Arten von Hirntumoren (Gliome) und infiltrierende Tumorzellen effizient und selektiv transduzieren (Miletic et al. 2004). Diese Eigenschaft kann mit der Besonderheit des HSVtk-Suizidmechanismus gekoppelt werden, der sich nur gegen Zellen richtet, die sich teilen. Tatsächlich führte die Behandlung mit lentiviralen HSV-tk-Vektoren, die mit LCMV-G pseudotypisiert waren, zu einer vollständigen Remission von soliden Tumoren in einem Glioblastom-Xenograft-Modell (Huszthy et al. 2009).

Ein weiteres aktuelles und vielsprechendes Gebiet der Krebsgentherapie sind chimäre Antigenrezeptor(CAR)-Immunzellen, die Dennis Harrer und Hinrich Abken in diesem Themenband behandeln (siehe Kap. 10), weshalb diese hier nicht detailliert aufgeführt werden.

3.6.3 Gentherapie gegen die HIV-1-Infektion

Die Entdeckung der Mechanismen des Eindringens von Viren in Zielzellen kann auch dazu genutzt werden, Zellen vor Virusinfektionen, wie z. B. HIV-1, zu schützen. Das Hüllglykoprotein gp120 von HIV-1 bindet an die Rezeptoren der Zielzellen und bestimmt so das Wirtszellspektrum des Virus, wobei die Untereinheit

gp41, das ein C-Peptidregion enthält, die Verschmelzung der Membranen von Virus und Zielzelle vermittelt (Wild et al. 1994). Dorothee von Laer konnte in Hamburg zeigen, dass die LTR-gesteuerte Expression einer membranverankerten Version vom C-Peptid T20 Zelllinien vor einer HIV-Infektion schützte, indem der Eintritt von HIV-1 in die Zelle wirksam durch Hemmung der Fusion der viralen Lipidmembran mit der Plasmamembran der Zielzelle blockiert werden konnte (Wild et al. 1994; Hildinger et al. 2001). Diese Strategie wurde noch weiter optimiert, um immunogene Nebenwirkungen zu minimieren, und die membranverankerten C-Peptide T20 (C36) und C46 hemmten die HIV-1-Infektion menschlicher primärer Blutlymphozyten, wobei C46 den Eintritt von C36-resistenten HIV-1-Varianten wirksam blockierte (Egelhofer et al. 2004). Die weltweit ersten klinischen Studien, in denen der C46-Vektor zur Modifikation autologer T-Zellen und Blutstammzellen benutzt wurde, wurden in Hamburg durchgeführt.⁵⁵

Von amerikanischen Kollegen wurde der von gp41 abgeleitete HIV-1-Eintrittsinhibitor in einen lentiviralen SIN-Vektor kloniert, der einen CMV-Promotor verwendet, um membrangebundenes C46 zu exprimieren. Dieses Konstrukt schützte primäre menschliche T-Zellen vor einer Infektion mit dem CXCR4-tropischen HIV-Stamm BK132 (Perez et al. 2005).

Eine präklinische Studie an einem Primatenmodell für HIV-1 und eine chimäre Infektion mit dem Affen-Immundefizienz-Virus (SIV)/HIV-1 zeigte, dass die Verwendung eines SFFV-promotorgesteuerten lentiviralen Vektors zur Modifizierung von HSC für die Transplantation in AIDS-Patienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen, durchführbar ist (Trobridge et al. 2009). Zusätzlich wurde eine mutierte Methylguanin-Methyltransferase (MGMT^{P140K}) mit übertragen, um modifizierte HSC und ihre Nachkommen resistent gegen Chemotherapie zu machen. Damit konnte eine In-vivo-Anreicherung der genmodifizierten HIV-resistenten Zellen erreicht werden (Trobridge et al. 2009) (siehe Abb. 3.5).

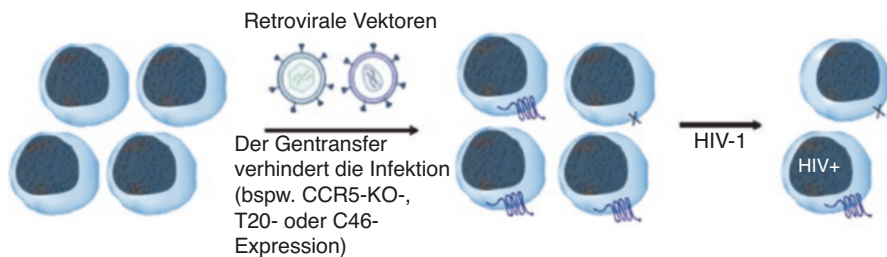


Abb. 3.5 Die genetische Modifikation von Zellen schützt die Zellen vor einer Infektion. Die Expression oder der Knockout (KO) von Zelloberflächenmolekülen sind Strategien, die zum Schutz von Zellen vor einer HIV-Infektion eingesetzt werden können. So kann z. B. der Knockout der Zellrezeptoren CCR5 und CXCR4 Zellen vor einer HIV-1-Infektion schützen. Darüber hinaus kann die Modifizierung von Zellen zur Expression kleiner membrangebundener C-Peptide wie T20 und C46 ebenfalls eine HIV-1-Infektion modifizierter Zellen verhindern. Die retroviralen Partikel wurden mit [Biorender.com](https://www.biorender.com) erstellt

⁵⁵ Siehe NCT00858793: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00858793> [01.05.2023].

Die Beobachtung, dass drei HIV-Patienten (in Berlin, Düsseldorf und London) nach einer Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen, denen der HIV-Korezeptor CCR5 fehlt,⁵⁶ geheilt wurden, unterstützt nachdrücklich die Entwicklung weiterer neuartiger zell- und gentherapeutischer Strategien zur Behandlung von HIV-Patienten (Hutter et al. 2009; Jensen et al. 2023) (siehe Abb. 3.5). Solche Ansätze könnten therapeutisch wichtig sein, um die derzeitigen Herausforderungen wie die Nebenwirkungen der derzeitigen Standard-HIV-Behandlungen (antiretrovirale Therapie, ART), zunehmende Resistenzen gegen ART sowie die Kosten für das Gesundheitssystem zu überwinden, da die Zell- und Gentherapie eine einmalige Behandlung mit potenzieller Heilung bieten könnte. Deutsche Forschergruppen haben auch gezeigt, dass es möglich ist, spezifische Sequenzen in den LTRs des integrierten HIV-1-Provirus anzusteuern und HIV-1 aus infizierten Zellen zu entfernen (Hauber et al. 2013; Karpinski et al. 2016).

3.7 Ausblick: Retrovirale Gentherapie

Eine systematische Nutzen-Schaden-Bewertung wird auch weiterhin eine wichtige Komponente für die Umsetzung jeglicher retroviraler Gentherapieansätze sein. Retrovirale Vektoren wurden zur Behandlung von mehr als 400 Patienten mit monogenen Erbkrankheiten und von mehreren tausend Krebspatienten, z. B. mit CAR-T-Zellen, eingesetzt und weisen in vielen Fällen (wie z. B. in HSPC bei SIN-Vektoren) eine sehr gute Sicherheit und Wirksamkeit auf. Die klinischen Erfolge der Gen- und Zelltherapien führten zu einer gemeinsamen Erklärung des FDA-Kommissars Scott Gottlieb und des Direktors des Center for Biologics Evaluation and Research Peter Marks (CBER), die vorhersagten, dass ab 2025 jährlich 10 bis 20 neue Zell- und Gentherapieprodukte von der FDA zugelassen werden.⁵⁷

Die Entwicklung präziserer Instrumente zur Genomveränderung und Fortschritte in der biomedizinischen Technologie, einschließlich DNA/RNA-Sequenzierung und Proteomanalysen, schaffen neue Möglichkeiten zur Erkennung und Behandlung erworbener und vererbter Krankheiten. Mit der weiteren Unterstützung nationaler und internationaler Kooperationsnetzwerke zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung kritischer Infrastrukturen werden in Zukunft neue Therapieoptionen entstehen, die sichere und wirksame Gentherapien zur Heilung unheilbarer Krankheiten einschließen (siehe Abb. 3.6).

⁵⁶Ca. 10 % der europäischstämmigen Menschen tragen ein defektes CCR5-Allel (CCR5 Δ 32). Bei ca. 1 % liegt die Mutation auf beiden Allelen vor. Betroffene haben überraschenderweise praktisch keine gesundheitlichen Nachteile, sind aber fast vollständig vor einer HIV-Infektion geschützt.

⁵⁷Siehe unter: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-fda-commissioner-scott-gottlieb-md-and-peter-marks-md-phd-director-center-biologics> [01.05.2023].

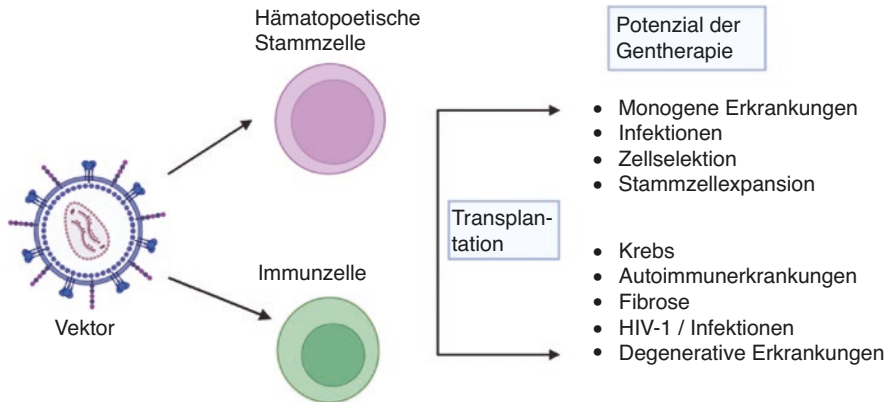


Abb. 3.6 Überblick über aktuelle und potenzielle Anwendungen von Gen- und Zelltherapien
Mit retroviralen Vektoren (hier ein lentiviraler Vektor) können somatische Zellen wie hämatopoetische Stammzellen und Immunzellen verändert werden, die dann für eine Vielzahl klinischer Anwendungen in Patienten transplantiert werden können, darunter die Behandlung von monogenen Erbkrankheiten, Infektionen, Krebs, Fibrose, Autoimmun- und degenerativen Krankheiten

Literatur

- Agarwal S et al (2020) In vivo generation of CAR T cells selectively in human cd4(+) lymphocytes. *Mol Ther* 28(8):1783–1794
- Aiuti A et al (2009) Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 360(5):447–458
- Aiuti A et al (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341(6148):1233151
- Arens A et al (2012) Bioinformatic clonality analysis of next-generation sequencing-derived viral vector integration sites. *Hum Gene Ther Methods* 23(2):111–118
- Baron Y et al (2022) Improved alpharetrovirus-based Gag.MS2 particles for efficient and transient delivery of CRISPR-Cas9 into target cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 27:810–823
- Baum C et al (1995) Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69(12):7541–7547
- Baum C et al (1996) Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection. *J Hematother* 5(4):323–329
- Baum C et al (1998) cis-Active elements of Friend spleen focus-forming virus: from disease induction to disease prevention. *Acta Haematol* 99(3):156–164
- Baum C et al (2003) Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101(6):2099–2114
- Baum C et al (2006) Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17(3):253–263
- Bender RR et al (2016) Receptor-targeted nipah virus glycoproteins improve cell-type selective gene delivery and reveal a preference for membrane-proximal cell attachment. *PLoS Pathog* 12(6):e1005641
- Beyer WR et al (2002) Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76(3):1488–1495

- Biffi A et al (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341(6148):1233-1238
- Bonini C et al (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276(5319):1719–1724
- Boztug K et al (2010) Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 363(20):1918–1927
- Braun CJ et al (2014) Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome-long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* 6(227):227ra233
- Brendel C et al (2018) Non-clinical efficacy and safety studies on g1xcgd, a lentiviral vector for ex vivo gene therapy of x-linked chronic granulomatous disease. *Hum Gene Ther Clin Dev* 29(2):69–79
- Buchholz CJ et al (2015) Surface-engineered viral vectors for selective and cell type-specific gene delivery. *Trends Biotechnol* 33(12):777–790
- Bukrinsky MI et al (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365(6447):666–669
- Bunnell BA et al (1997) Efficient in vivo marking of primary CD4+ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector. *Blood* 89(6):1987–1995
- Burns JC et al (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17):8033–8037
- Burtner CR et al (2014) Intravenous injection of a foamy virus vector to correct canine SCID-X1. *Blood* 123(23):3578–3584
- Cartier N et al (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326(5954):818–823
- Cavazzana M et al (2019) Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 18(6):447–462
- Cavazzana-Calvo M et al (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288(5466):669–672
- Cavazzana-Calvo M et al (2010) Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 467(7313):318–322
- Charrier S et al (2007) Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 14(5):415–428
- Charrier S et al (2019) Biosafety studies of a clinically applicable lentiviral vector for the gene therapy of artemis-scid. *Mol Ther Methods Clin Dev* 15:232–245
- Cherepanov P et al (2003) HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278(1):372–381
- Ciceri F et al (2009) Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 10(5):489–500
- De Ravin SS et al (2016) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med* 8(335):335ra357
- De Rijck J et al (2013) The BET family of proteins targets moloney murine leukemia virus integration near transcription start sites. *Cell Rep* 5(4):886–894
- Deichmann A et al (2007) Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* 117(8):2225–2232
- Deichmann A et al (2011) Insertion sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genomic areas after gammaretroviral vector gene therapy. *Mol Ther* 19(11):2031–2039
- Dull T et al (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11):8463–8471
- Egelhofer M et al (2004) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol* 78(2):568–575
- El Ashkar S et al (2014) BET-independent MLV-based vectors target away from promoters and regulatory elements. *Mol Ther Nucleic Acids* 3:e179

- El Ashkar S et al (2017) Engineering next-generation bet-independent mlv vectors for safer gene therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 7:231–245
- Engels B et al (2003) Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14(12):1155–1168
- Everson E et al (2016) A comparison of foamy and lentiviral vector genotoxicity in SCID-repopulating cells shows foamy vectors are less prone to clonal dominance. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3:16048
- Fehse B et al (1998) Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br J Haematol* 102(2):566–574
- Fehse B et al (2000) CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1(5 Pt 1):448–456
- Fehse B et al (2002) A novel ‘sort-suicide’ fusion gene vector for T cell manipulation. *Gene Ther* 9(23):1633–1638
- Fehse B et al (2004a) Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide gene-modified T lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells. *Blood* 104(10):3408–3409
- Fehse B et al (2004b) Pois(s)on – It’s a Question of Dose *Gene Ther* 11:879–881
- Fehse B, Walter J, AG Gentechnologiebericht (Hrsg) (2022) Im Fokus: RNA. Eine aktuelle Bestandsaufnahme der Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht. BIH, Berlin. Unter: <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/37118>. Zugegriffen am 08.03.2023
- Ferrua F, Aiuti A (2017) Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from bubble babies to an approved drug. *Hum Gene Ther* 28(11):972–981
- Funke S et al (2008) Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* 16(8):1427–1436
- Galla M et al (2004) Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation. *Mol Cell* 16(2):309–315
- Galla M et al (2011) Avoiding cytotoxicity of transposases by dose-controlled mRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 39(16):7147–7160
- Garcia-Perez L et al (2020) Successful preclinical development of gene therapy for recombinase-activating gene-1-deficient SCID. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17:666–682
- Gaspar HB (2006) Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14(4):505–513
- Gaspar HB et al (2011) Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med* 3(97):97ra80
- Grez M et al (1990) Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(23):9202–9206
- Gupta SS et al (2013) Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration. *J Virol* 87(23):12721–12736
- Gurumoorthy N et al (2022) Non-integrating lentiviral vectors in clinical applications: a glance through. *Biomedicines* 10(1):107
- Hacein-Bey Abina S et al (2015) Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *Jama* 313(15):1550–1563
- Hacein-Bey-Abina S et al (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346(16):1185–1193
- Hacein-Bey-Abina S et al (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644):415–419
- Hacein-Bey-Abina S et al (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 363(4):355–364
- Hacein-Bey-Abina S et al (2014) A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 371(15):1407–1417
- Hanauer JDS et al (2018) CD30-targeted oncolytic viruses as novel therapeutic approach against classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* 9(16):12971–12981
- Hartmann J et al (2018) A library-based screening strategy for the identification of darpins as ligands for receptor-targeted AAV and lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 10:128–143

- Hauber I et al (2013) Highly significant antiviral activity of HIV-1 LTR-specific tre-recombinase in humanized mice. *PLoS Pathog* 9(9):e1003587
- Hawley RG et al (1992) Transplantable myeloproliferative disease induced in mice by an interleukin 6 retrovirus. *J Exp Med* 176(4):1149–1163
- Hilberg F et al (1987) Functional analysis of a retroviral host-range mutant: altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15):5232–5236
- Hildinger M et al (1998) FMEV vectors: both retroviral long terminal repeat and leader are important for high expression in transduced hematopoietic cells. *Gene Ther* 5(11):1575–1579
- Hildinger M et al (2001) Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* 75(6):3038–3042
- Hirsch T et al (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 551(7680):327–332
- Huang J et al (2016) Preclinical validation: LV/IL-12 transduction of patient leukemia cells for immunotherapy of AML. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3:16074
- Huang J et al (2017) Lentivector iterations and pre-clinical scale-up/toxicity testing: targeting mobilized CD34(+) cells for correction of fabry disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5:241–258
- Huszthy PC et al (2009) Remission of invasive, cancer stem-like glioblastoma xenografts using lentiviral vector-mediated suicide gene therapy. *PLoS One* 4(7):e6314
- Hutter G et al (2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360(7):692–698
- Jaenisch R et al (1983) Germline integration of moloney murine leukemia virus at the Mov13 locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death. *Cell* 32(1):209–216
- Jensen BO et al (2023) In-depth virological and immunological characterization of HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 29(3):583–587
- Karpinski J et al (2016) Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nat Biotechnol* 34(4):401–409
- Kleinlutzum D et al (2017) Enhancing the oncolytic activity of CD133-targeted measles virus: receptor extension or chimerism with vesicular stomatitis virus are most effective. *Front Oncol* 7:127
- Kneissl S et al (2013) CD19 and CD20 targeted vectors induce minimal activation of resting B lymphocytes. *PLoS One* 8(11):e79047
- Kohn DB et al (2020) Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Med* 26(2):200–206
- Kohne E, Kleihauer E (2010) Hemoglobinopathies: a longitudinal study over four decades. *Dtsch Arztebl Int* 107(5):65–71
- Kueckelhaus M et al (2021) Transgenic epidermal cultures for junctional epidermolysis bullosa – 5-year outcomes. *N Engl J Med* 385(24):2264–2270
- Kustikova O et al (2005) Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 308(5725):1171–1174
- Kustikova OS et al (2008) Retroviral integration site analysis in hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol* 430:255–267
- Kustikova OS et al (2009) Retroviral insertion site analysis in dominant haematopoietic clones. *Methods Mol Biol* 506:373–390
- Li Z et al (2002) Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296(5567):497
- Lindemann D, Rethwilm A (2011) Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses* 3(5):561–585
- Locatelli F et al (2022) Betibeglogene autotemcel gene therapy for non-beta(0)/beta(0) genotype beta-thalassemia. *N Engl J Med* 386(5):415–427
- Maeder ML, Gersbach CA (2016) Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther* 24(3):430–446

- Magrin E et al (2022) Long-term outcomes of lentiviral gene therapy for the beta-hemoglobinopathies: the HGB-205 trial. *Nat Med* 28(1):81–88
- Mamcarz E et al (2019) Lentiviral gene therapy combined with low-dose busulfan in infants with SCID-X1. *N Engl J Med* 380(16):1525–1534
- Mavilio F et al (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 12(12):1397–1402
- Miletic H et al (2004) Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther* 15(11):1091–1100
- Modlich U et al (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108(8):2545–2553
- Moiani A et al (2014) Genome-wide analysis of alpharetroviral integration in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Genes (Basel)* 5(2):415–429
- Moscattelli I et al (2018) Targeting NSG mice engrafting cells with a clinically applicable lentiviral vector corrects osteoclasts in infantile malignant osteopetrosis. *Hum Gene Ther* 29(8):938–949
- Naldini L et al (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259):263–267
- Negre O et al (2015) Preclinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell disease. *Curr Gene Ther* 15(1):64–81
- Newrzela S et al (2008) Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood* 112(6):2278–2286
- Newrzela S et al (2012) T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development. *Leukemia* 26(12):2499–2507
- Ott MG et al (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12(4):401–409
- Perez EE et al (2005) Suppression of HIV-1 infection in primary CD4 T cells transduced with a self-inactivating lentiviral vector encoding a membrane expressed gp41-derived fusion inhibitor. *Clin Immunol* 115(1):26–32
- Philpott NJ, Thrasher AJ (2007) Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 18(6):483–489
- Poletti V et al (2018) Preclinical development of a lentiviral vector for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol Ther Methods Clin Dev* 9:257–269
- Preuss E et al (2010) TK.007: a novel, codon-optimized HSVtk(A168H) mutant for suicide gene therapy. *Hum Gene Ther* 21(8):929–941
- Preuss E et al (2011) Cancer suicide gene therapy with TK.007: superior killing efficiency and bystander effect. *J Mol Med (Berl)* 89(11):1113–1124
- Roos D (2019) Chronic granulomatous disease. *Methods Mol Biol* 1982:531–542
- Santilli G et al (2011) Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. *Mol Ther* 19(1):122–132
- Schmidt M et al (2001) Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther* 12(7):743–749
- Schwarzer A et al (2021) Predicting genotoxicity of viral vectors for stem cell gene therapy using gene expression-based machine learning. *Mol Ther* 29(12):3383–3397
- Schwarzwaelder K et al (2007) Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* 117(8):2241–2249
- Sessa M et al (2016) Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 388(10043):476–487
- Sharma A et al (2013) BET proteins promote efficient murine leukemia virus integration at transcription start sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(29):12036–12041
- Siler U et al (2015) Successful combination of sequential gene therapy and rescue allo-HSCT in two children with X-CGD – importance of timing. *Curr Gene Ther* 15(4):416–427
- Stein S et al (2010) Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 16(2):198–204

- Stein S et al (2013) From bench to bedside: preclinical evaluation of a self-inactivating gamma-retroviral vector for the gene therapy of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum Gene Ther Clin Dev* 24(2):86–98
- Suerth JD et al (2010) Self-inactivating alpharetroviral vectors with a split-packaging design. *J Virol* 84(13):6626–6635
- Suerth JD et al (2012) Alpharetroviral self-inactivating vectors: long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity. *Mol Ther* 20(5):1022–1032
- Tiberghien P et al (2001) Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97(1):63–72
- Trobridge GD et al (2009) Protection of stem cell-derived lymphocytes in a primate AIDS gene therapy model after in vivo selection. *PLoS One* 4(11):e7693
- Tucci F et al (2022) A systematic review and meta-analysis of gene therapy with hematopoietic stem and progenitor cells for monogenic disorders. *Nat Commun* 13(1):1315
- Voelkel C et al (2010) Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17):7805–7810
- Weissingner EM et al (2015) Long term follow up of patients after allogeneic stem cell transplantation and transfusion of HSV-TK transduced T-cells. *Front Pharmacol* 6:76
- Wild CT et al (1994) Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):9770–9774
- Wolstein O et al (2014) Preclinical safety and efficacy of an anti-HIV-1 lentiviral vector containing a short hairpin RNA to CCR5 and the C46 fusion inhibitor. *Mol Ther Methods Clin Dev* 1:11
- Wunsche P et al (2018) Mapping active gene-regulatory regions in human repopulating long-term HSCs. *Cell Stem Cell* 23(1):132–146 e139
- Yu SF et al (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10):3194–3198
- Zhan H et al (2013) Production and first-in-man use of T cells engineered to express a HSVTK-CD34 sort-suicide gene. *PLoS One* 8(10):e77106
- Zufferey R et al (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15(9):871–875
- Zufferey R et al (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72(12):9873–9880

Open Access Dieses Kapitel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Kapitel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

