

Gentherapie

Zellspezifische Produktion von multiplen Therapeutika im Körper

DOMINIK BRÜCHER^{1, 2}, PATRICK CHRISTIAN FREITAG¹, ANDREAS PLÜCKTHUN¹

¹ BIOCHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

² VECTOR BIOPHARMA AG, BASEL

Many conventional cancer therapies suffer from side effects and low efficacy, due to poor tumor localization of systemically injected therapeutics. Utilizing the adenoviral SHREAD platform, therapeutic genes were delivered specifically to cancer cells *in vivo* that express a defined, freely selectable cell receptor. Antibodies secreted by infected cells were visualized using a cell-clearing technology, revealing a high local concentration of the antibody within the tumor, with minimal concentration in peripheral healthy tissues.

DOI: 10.1007/s12268-022-1714-9

© Die Autoren 2022

■ Trotz Jahrzehnten an intensiver Forschung weisen viele etablierte onkologische Behandlungen nur geringe Erfolge auf und/oder verursachen drastische Nebenwirkungen. Diese Problematik basiert zum Teil auf der systemischen Injektion von Therapeutika, die sich nach der Injektion des Therapeutikums im Blutkreislauf des Patienten verteilen und so mit dem gesunden Gewebe wechselwirken. Im Gegensatz dazu ist – durch eine veränderte Blutgefäßbildung im Tumor und dessen kompakte Struktur – die Diffusion und Penetration von systemisch applizierten therapeutischen Proteinen dort erschwert. Daher verbleibt ein Großteil des Medikaments in der Zirkulation oder im gesunden Gewebe, wo es ungewollte Nebenwirkungen verursachen kann. Die Konsequenz ist ein suboptimaler Konzentrationsgradient mit niedrigen therapeutischen Konzentrationen im Tumor aber hohen Konzentrationen im gesunden Gewebe.

Ein Bestreben der Forschung im Plückthun-Labor ist es, diesen Konzentrationsgradienten umzukehren. So sollen Nebenwirkungen bestehender Therapien gelindert und neue effizientere Therapien ermöglicht werden. Anstatt Therapeutika systemisch zu injizieren, werden diese lokal von den Tumorzellen selbst produziert. Die therapeutischen Gene werden durch hochspezifische und stark modifizierte adenovirale Vektoren zellspezifisch in Tumorzellen zur

Expression gebracht (SHREAD(*shielded retargeted adenovirus*)-Technologie). So konnte das Verhältnis zwischen der intratumoralen Konzentration des Therapeutikums und der Konzentration im gesunden Gewebe um den Faktor 1800 verbessert werden [1].

Diese lokale Expression von Therapeutika im Verbund mit der großen Kapazität dieser Vektoren von 36 kb ermöglichte es, die Wirksamkeit von Kombinationen von immunologischen Therapeutika zu untersuchen, die sonst systemisch toxisch wären. Außerdem enthält der Vektor keine viralen Gene mehr, wodurch eine unerwünschte virale Replikation und die Translation von viralen Proteinen verhindert wird. Durch diese Kombinationstherapie konnte das Tumorstadium reduziert werden und die Überlebensrate der mit dem SHREAD-System behandelten Versuchstiere signifikant vergrößert werden, ohne detektierbare Nebeneffekte hervorzurufen (iMATCH-Technologie, [2]). Als Referenz dienten Versuchstiere, die unbehandelt waren oder mit einem Vektor behandelt wurden, der nur ein einziges therapeutisches Gen enthielt.

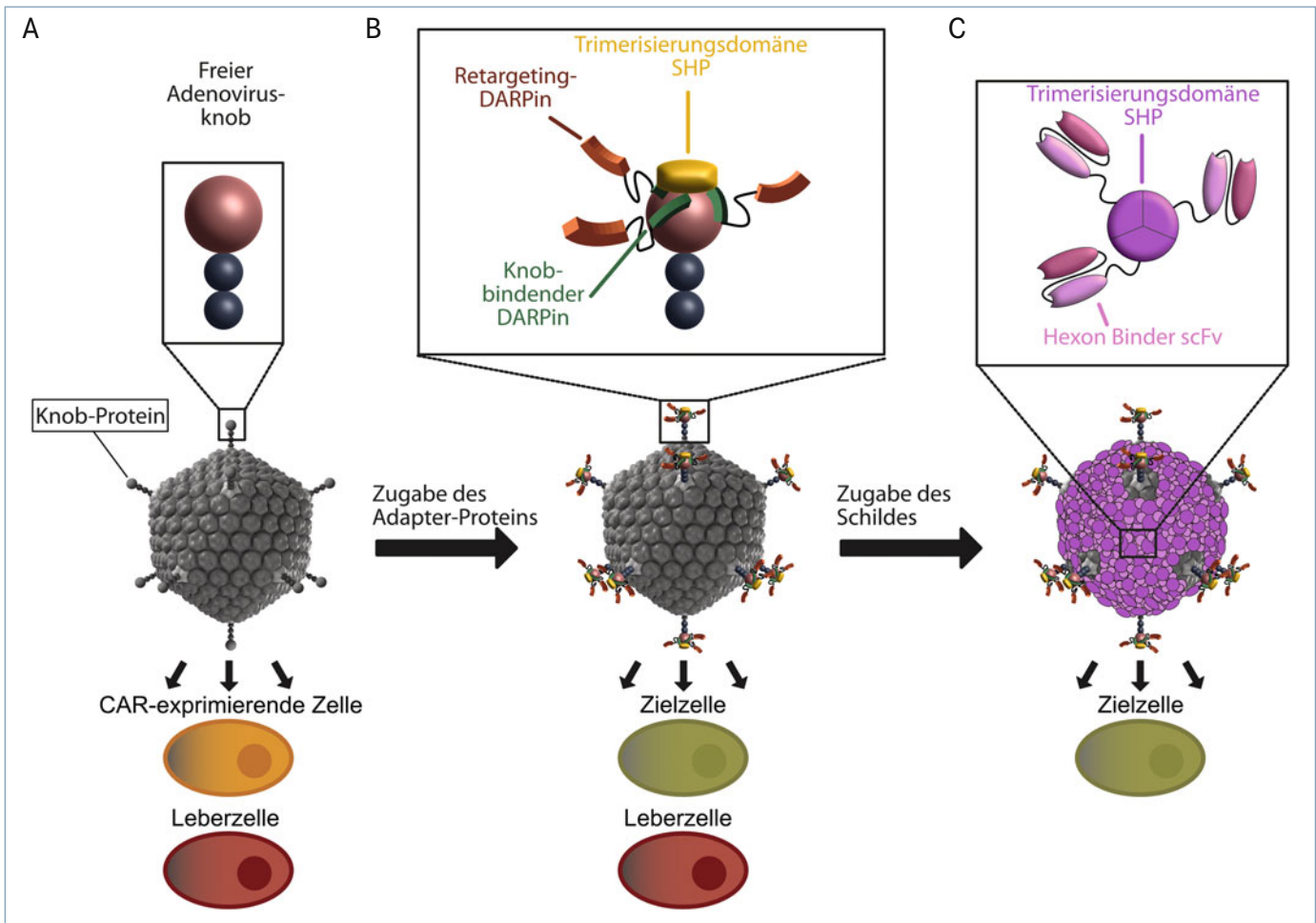
Zellspezifische Produktion von Therapeutika: Technologie

Um Therapeutika zielgerichtet in einer Zelle produzieren zu können, muss zunächst der

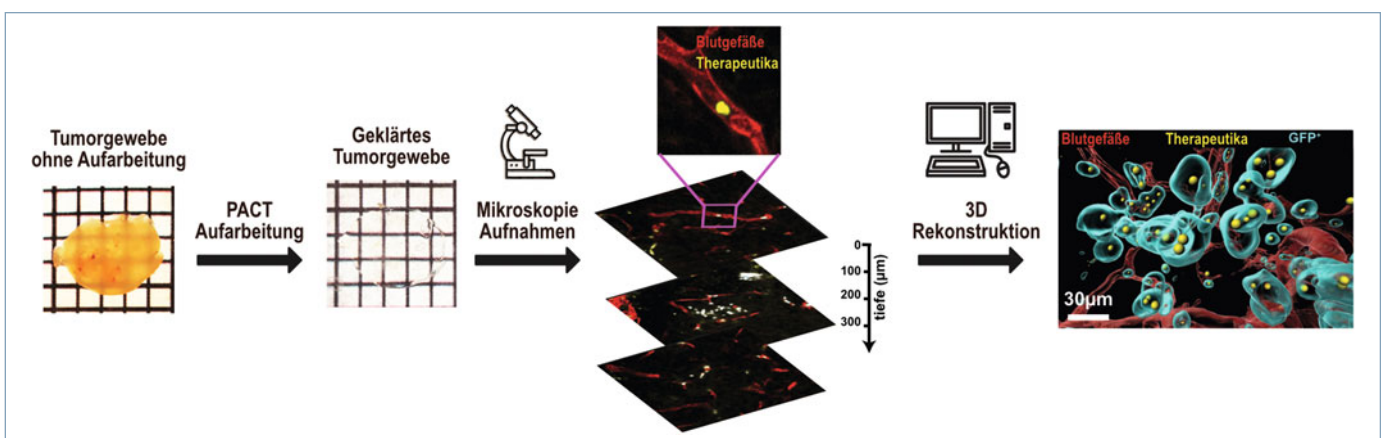
natürliche Tropismus des Genvektors, in unserem Falle des Adenovirus, reduziert und eine neue Affinität für die Zielzelle etabliert werden (**Abb. 1**). Hierzu haben wir die äußere Hülle des Adenovirus (das Capsid) genetisch modifiziert und zusätzlich mit externen Proteinen umhüllt (Schild- und Adapter-Protein), um die Bindung des Adenovirus an unspezifische Zellrezeptoren zu verhindern [3]. Dadurch wurde der natürliche Lebertropismus stark reduziert.

Die Bindung an die gewünschte Zielzelle wird durch einen extern zugefügten Adapter ermöglicht. Dieser Adapter besteht aus drei Teilen (**Abb. 1**): (i) einem Bindungsmolekül (designed ankyrin repeat protein, DARPIn), das mit picomolarer Affinität den Adenovirus Knob bindet (das distale Ende der Fiber), (ii) einer extrem stabilen Trimerisierungsdomäne zur Aviditätsgewinnung, bestehend aus dem Phagenprotein SHP, und (iii) einem zweiten Bindungsmolekül, welches spezifisch einen Rezeptor auf der Zielzelle bindet (retargeting DARPIn). Der Adapter kann effizient in Bakterien mit verschiedensten *retargeting* DARPIns produziert werden. Dies ermöglicht ein schnelles, systematisches Screening desselben adenoviralen Vektors auf unterschiedlichen Zelltypen, Rezeptoren und Epitopen (**Abb. 1**).

Für eine Applikation im Menschen muss allerdings das Immunsystem, welches das Adenovirus normalerweise neutralisieren würde, umgangen werden. Hierfür hat die Gruppe von Andreas Plückthun ein proteinbasiertes Schild entwickelt (**Abb. 1**), das an das adenovirale Capsid bindet und somit die Interaktion mit dem Immunsystem einschränkt. Adenovirale Vektoren mit gebundenem Schild konnten Zielzellen in Anwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers infizieren, wohingegen nicht geschützte adenovirale Vektoren inaktiviert wurden [4]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass genetische Modifikationen am viralen Capsid die Interaktion mit im Blut vorkommenden Proteinen, wie z. B. Blutgerinnungsfaktor X, zusätzlich reduzieren können [4]. Die Bindung von Faktor X an adenovirale



▲ **Abb. 1:** Die Kombination von Adapter- und Schild-Protein ermöglicht eine spezifische Infektion von Zielzellen und minimiert die Aufnahme des Adenovirus durch die Leber oder andere Zellen und Gewebe. **A,** Der native Adenovirus (Serotyp C5) kann über das Knob-Protein verschiedene Zellen, die den Coxsackievirus und Adenovirusrezeptor (CAR) exprimieren (orange), infizieren. Weiter wird der native Adenovirus von leberassoziierten Zellen, z. B. Kupfer-Zellen (rot) unspezifisch aufgenommen. **B,** Mit der Zugabe des Adapter-Proteins kann der natürliche Knob-vermittelte Tropismus des Adenovirus verhindert werden. Gleichzeitig wird ein künstlicher Tropismus für die Zielzelle (grün) durch den retargeting DARPin erzeugt. Durch die von der Trimerisierungsdomäne des Adapters (gelb) erzeugte hohe Avidität entsteht eine extrem hochaffine Bindung zwischen dem Adapter und dem Adenovirus und eine multiple Bindung an die Zielzelle. **C,** In Kombination mit dem Schild kann zusätzlich eine unspezifische Aufnahme des Adenovirus von Leberzellen verhindert werden. Hierdurch wird eine erhöhte Spezifität für das Zielgewebe, z. B. Tumorgewebe, ermöglicht.



▲ **Abb. 2:** Visualisierung der lokalen Infektion, Expression und Akkumulation von biologischen Therapeutika nach Anwendung der SHREAD-Technologie. Nach Applikation von SHREAD-Vektoren wurde der Tumor entnommen und nach Kreuzvernetzung der Proteine die Lipide und lichtabsorbierenden Moleküle mithilfe der PACT (passive clarity technique)-Methode aus dem Tumor entfernt. Zusätzlich wurden die Proben mit einer Lösung behandelt, die den Brechungsindex einheitlich macht. Der nun völlig transparente Tumor (zweites Bild) kann für fluoreszenzmikroskopische Analysen mit hoher Auflösung verwendet werden. Basierend auf diesen Aufnahmen konnte eine dreidimensionale Rekonstruktion des Tumorgewebes, der infizierten Zellen, Blutgefäße und sekretierten Antikörper erreicht werden.

Vektoren führt zu deren vermehrten Aufnahme in Leberzellen, was ungewollte Nebeneffekte auslösen kann. Daher ist eine Verringerung der Interaktionen des Vektors mit Blutkomponenten essenziell für gentherapeutische Behandlungen und deren sicheren Einsatz. Diese Mutationen allein sind allerdings noch nicht ausreichend: Erst die Synergie dieser genetischen Modifikationen und der extern zugefügten Adapter und des Schilds resultierte in einer tumorspezifischen Produktion von vektorcodierten Reporterproteinen, mit gleichzeitig verminderter Expression im gesunden Gewebe (der Leber) *in vivo* [4]. Im Vergleich zu konventionellen adenoviralen Vektoren ohne externe Adapter und Schild konnte die ungewollte Expression in der Leber um das ca. 14000-Fache verringert werden, was die potenzielle Sicherheit für therapeutische Anwendungen deutlich erhöht.

Tumorspezifische Produktion von Therapeutika *in vivo*

Mit modernsten Mikroskopietechniken und 3D-Analysen konnte die Produktion eines therapeutischen Antikörpers direkt im Tumor nach einer Behandlung mit der SHREAD-Technologie nachgewiesen werden (**Abb. 2**). Dafür wurden den Versuchstieren die entsprechenden adenoviralen Vektoren verabreicht, welche spezifisch Tumorzellen im Tumor infizierten, wie nach Entnahme des Tumors gezeigt werden konnte [1]. Eine computerbasierte 3D-Rekonstruktion der Fluoreszenzmikroskopie des Tumorgewebes erlaubte die dreidimensionale Darstellung der Antikörperproduktion im Tumor. Bemerkenswerterweise wurde der Antikörper nur lokal im Tumor in der Nähe der mit Adenovirus infizierten Zellen detektiert. Im gesunden Gewebe, z. B. der Leber oder im Blut, wurde eine deutlich niedrigere Konzentration des Antikörpers als im Tumor gemessen. Im Vergleich zur direkten Injektion des Therapeutikums (des Antikörperproteins) wurde nach einer Behandlung mit der SHREAD-Therapie eine niedrigere Konzentration des Antikörpers im gesunden Gewebe detektiert. Somit konnte eine hohe Tumorspezifität des produzierten Antikörpers nachgewiesen werden. Dies ist ein ermutigender Befund für potenzielle Anwendungen von SHREAD-produzierten Therapeutika, welche aufgrund ihrer Toxizität als Proteine nicht oder nur in geringen Dosen gespritzt werden können.

Weiter zeigte eine detaillierte biophysikalische Analyse des von Tumorzellen produzierten Antikörpers, dass dieser funktional aktiv ist und tumorspezifische Glykosylierungsmuster aufweist [5]. Je nach Wirkmechanismus des Antikörpers kann ein geändertes Glykosylierungsmuster zu einer gesteigerten oder verminderten therapeutischen Effizienz führen. Durch die Ko-Expression von Enzymen, die das Glykosylierungsmuster von Antikörpern verändern können, z. B. Sialidasen, kann eine für den Wirkmechanismus optimierte Glykosylierung und somit eine gesteigerte Wirksamkeit des *in vivo* produzierten Antikörpers erzeugt werden. Die Ko-Expression von mehreren Proteinen übersteigt allerdings die Genkapazität traditioneller adenoviraler Vektoren der ersten Generation: Aus diesem Grund haben wir adenovirale Genvektoren entwickelt, die sowohl eine vergrößerte Genkapazität von 36 kb aufweisen, weil sie keine viralen Gene mehr tragen, als auch kompatibel zu dem entwickelten Schild und dem retargeting Adapter sind [2].

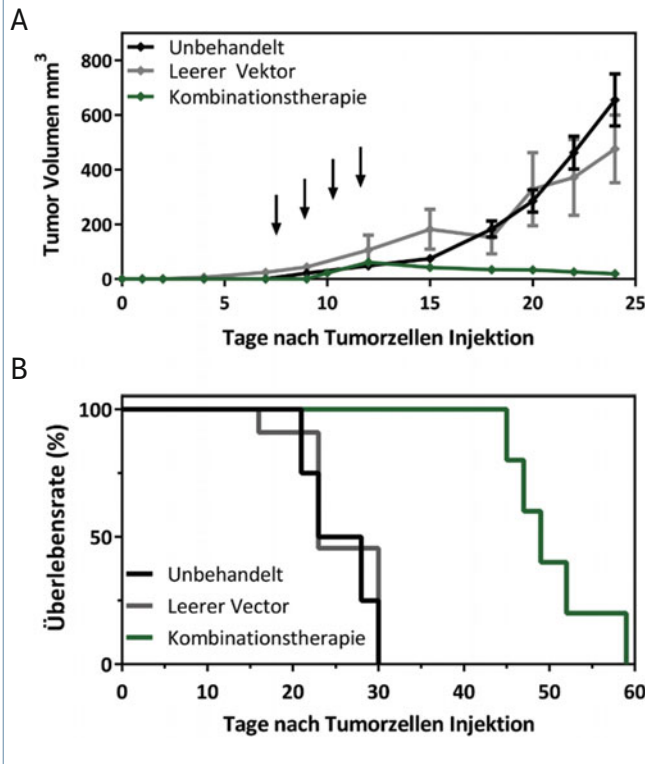
Kombinatorische Gentherapie

Native Adenoviren können in humanen Zellen replizieren und so neue Zellen infizieren, wodurch der Wirt geschädigt wird. Um diese für Genvektoren unerwünschte Nebenwirkung zu verhindern, wurden schon in der Vergangenheit essenzielle Gene vom adenoviralen Genom entfernt, um nicht replizierende Vektoren zu generieren. Die Deletion von essenziellen Transkriptionsfaktoren wie E1 und weiteren Genclustern (E2, E3, E4) von adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation ermöglichte die Codierung von Transgenen mit einer Größe von 1–13 kb. Trotz dieser Deletionen werden allerdings einige verbleibende virale Gene exprimiert, was eine adaptive Immunantwort gegen die infizierten Zellen erzeugt.

Besonders für Kombinationstherapien ist aber eine langanhaltende Expression der Therapeutika und eine große Genkapazität von entscheidender Bedeutung. Um dies zu ermöglichen, haben wir ein System entwickelt, das eine effiziente und systematische Kombination verschiedener therapeutischer Gene auf einem adenoviralen Genom ermöglicht (iMATCH [2]). Das iMATCH-System entspricht der neusten Generation adenoviraler Vektoren, den „High-Capacity adenovirale Vektoren“, die durch die Dele-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



◀ **Abb. 3:** Kombinationsvektoren generiert mit der iMATCH-Plattform sorgen für verringertes Tumorwachstum und verlängertes Überleben durch die gleichzeitige Expression ihrer Wirkstoffe. Immunkompetente Mäuse mit Tumorlast wurden mit einem adenoviralen Kombinationsvektor mit Schild und retargeting Adapter behandelt. Auf dem Kombinationsvektor wurden die Gene von zwei murinen Cytokinen (IL-2 und IL-12) sowie einem murinen Anti-PD-1-Antikörper (RMP1-14) codiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse oder Mäuse, die lediglich einen adenoviralen Vektor mit Schild und retargeting Adapter, aber ohne therapeutische Gene erhalten hatten. Das Tumolvolumen (A) und das Überleben (B) der behandelten Versuchstiere wurde dokumentiert. Die Behandlung der Versuchstiere mit dem Kombinationsvektor führte zu einer Reduktion des Tumolvolumens und zu einer verlängerten Lebensdauer. Weitere detaillierte Resultate sind in Brücher et al. [2] beschrieben.

tion aller adenoviralen Gene eine Genkapazität von 36 kb aufweisen. Durch die Deletion aller viralen Gene können diese nicht exprimiert werden, wodurch eine verminderte adaptive Immunantwort resultiert und eine bis zu sieben Jahre anhaltende Transgenexpression *in vivo* erzielt werden konnte [6, 7].

Durch die Kombination der SHREAD- und iMATCH-Technologie konnte bereits eine Kombination mit bis zu drei immuntherapeutischen Proteinen in einem einzelnen Vektor in Tumorzellen *in vivo* generiert werden, wobei das theoretische Kombinationslimit noch lange nicht erreicht wurde. Erst diese Kombination von immuntherapeutischen Wirkstoffen erzielte eine signifikante Verminderung der Tumorlast und eine signifikante Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere (**Abb. 3**).

Bis zu einer klinischen Nutzung dieser Technologien ist es sicherlich noch ein weiter Weg. Die hier beschriebenen Grundlagenexperimente veranschaulichen allerdings das Potenzial der adenoviralen Gentherapie im Allgemeinen und der SHREAD- und iMATCH-Plattform im Speziellen für Anwendungen in der Onkologie und weiteren medizinischen Indikationen. Durch eine gezielte lokale Produktion von Therapeutika können systemisch toxische, aber hochpotente Therapien mit diesen Technologien verwirklicht werden.

Danksagung

Wir möchten unseren besonderen Dank an die folgenden Kollegen ausdrücken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen haben. Liste in alphabetischer Reihenfolge:

Literatur

- [1] Smith SN, Schubert R, Simic B et al. (2021) The SHREAD gene therapy platform for paracrine delivery improves tumor localization and intratumoral effects of a clinical antibody. *Proc National Acad Sci* 118: e2017925118
- [2] Brücher D, Kirchhammer N, Smith SN et al. (2021) iMATCH: an integrated modular assembly system for therapeutic combination high-capacity adenovirus gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 20: 572–586
- [3] Dreier B, Honegger A, Hess C et al. (2013) Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPins. *Proc National Acad Sci* 110: E869–77
- [4] Schmid M, Ernst P, Honegger A et al. (2018) Adenoviral vector with shield and adapter increases tumor specificity and escapes liver and immune control. *Nat Commun* 9: 450

- [5] Brücher D, Franc V, Smith SN et al. (2020) Malignant tissues produce divergent antibody glycosylation of relevance for cancer gene therapy effectiveness. *Mabs* 12: 1792084
- [6] Brunetti-Pierri N, Ng T, Iannitti D et al. (2013) Transgene expression up to 7 years in nonhuman primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 24: 761–765
- [7] Muruve DA, Gotter MJ, Zaiss AK et al. (2004) Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses *in vivo*. *J Virol* 78: 5966–5972

Funding note: Open Access funding enabled and organized by University of Zürich.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz 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 Artikel 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. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

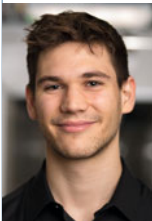
Prof. Dr. Andreas Plückthun
Universität Zürich
Winterthurerstraße 190
CH-8057 Zürich
plueckthun@bioc.uzh.ch
<https://plueckthun.bioc.uzh.ch>

AUTOREN



Dominik Brücher

2010–2016 Biochemiestudium an der Universität Tübingen. 2016–2021 Promotion, gefolgt von einem Postdoktorat an der Universität Zürich, Schweiz, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Plückthun im Bereich Biochemie. Seit 2021 Gruppenleiter in der Firma Vector BioPharma AG in Basel.



Patrick Christian Freitag

2014–2017 Biotechnologiestudium an der ETH Zürich, Schweiz. Seit 2017 Promotion an der Universität Zürich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Plückthun im Bereich Biochemie.



Andreas Plückthun

Chemiestudium an der Universität Heidelberg und Promotion an der University of California, San Diego, USA. 1982–1985 Postdoktorand an der Harvard University im Labor von Prof. Dr. J. Knowles. 1985–1991 Gruppenleiter am Genzentrum der LMU München. 1991–1993 Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried. Seit 1993 Professor für Biochemie an der Universität Zürich, Schweiz. Mitgründer von Morphosys AG, Molecular Partners AG, G7 Therapeutics, Vector BioPharma AG.