
2.3 Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie

KARSTEN BRAND und MICHAEL STRAUSS

2.3.1 Einführung

Gentherapie ist das gezielte Einbringen eines funktionsfähigen Gens in Körperzellen mit therapeutischer Zielstellung. Der Gentherapeut versucht entweder eine defekte Zellfunktion wiederherzustellen, wie etwa bei der Substitutionstherapie monogenetischer Erkrankungen, oder aber der Zelle eine zusätzliche Funktion zu vermitteln, wie etwa bei der Übertragung toxischer Gene. Damit können prinzipiell alle Erkrankungen, bei denen Proteine eine entscheidende pathogenetische Rolle spielen oder eine therapeutische Funktion haben, Ziel einer gentherapeutischen Behandlung sein. Inwieweit die Gentherapie tatsächlich sinnvoll zum Einsatz kommt, richtet sich danach, ob der Umweg über das Gen gegenüber konventionellen Verfahren eher Vor- oder Nachteile hat. Ausgehend von teilweise beeindruckenden tierexperimentellen Ergebnissen wurden in den letzten 5 Jahren bisher 136 klinische Therapiestudien, darunter 90 zur Behandlung von Krebs, durchgeführt (Stand: März 1996). Bei bisher etwa 600 behandelten Patienten traten, von einer publizierten Ausnahme abgesehen [Crystal et al. 1994], keine gravierenden Nebenwirkungen auf. Allerdings sind bisher auch keine konsistenten Therapieerfolge beschrieben worden. Damit wird wohl erst in den nächsten Jahren zu rechnen sein, wenn die noch unausgereifte gentherapeutische Methodik bis zur klinischen Reife weiterentwickelt worden ist.

Die Suche nach einer möglichst effizienten und doch spezifisch auf die Tumorzelle ausgerichteten Therapie, die das konventionelle Tumortherapiedesign bestimmt, ist auch Grundlage gentherapeutischer Ansätze. Gentherapie, im Vergleich etwa mit einer Chemotherapie, erlaubt ein höheres Maß an Regulierbarkeit und damit an Spezifität. Zugleich ist die Gentherapie aber störanfälliger und benötigt eine gute Feinabstimmung der einzelnen Komponenten, um eine optimale Effizienz zu haben. Daher ist ein möglichst umfassendes Verständnis

der molekularen Grundlagen des Gentransfers zur Durchführung einer sinnvollen Gentherapie notwendig.

2.3.1.1 Geschichte von Gentransfer und Gentherapieansätzen

Gentherapie ist nicht, wie häufig angenommen, ein neues Konzept. Bereits vor 3 Jahrzehnten gab es recht präzise Vorstellungen über die Möglichkeiten des Transfers rekombinanter DNA: „Schließlich kann man davon ausgehen, daß Viren effizient zum Wohlergehen der Menschheit genutzt werden, in theoretischen Studien in der Genetik von somatischen Zellen und möglicherweise in genetischer Therapie.....Wir können sogar ziemlich optimistisch sein hinsichtlich der langfristigen Möglichkeit über die Isolation oder das Design, die Synthese und Einführung neuer Gene in defiziente Zellen bestimmter Organe zu therapieren“ (Übersetzung der Autoren) [Tatum 1966]. Ausgehend von der Alteration von Genen als Ursache von Krebs, spekulierte Tatum [1966] (Übersetzung der Autoren) weiter: „eine Behandlung könnte über eine Modifikation und Regulation von Genaktivitäten oder mit den Mitteln von Genreparatur oder -substitution erreicht werden.“ Solche Überlegungen weitblickender Forscher waren möglich geworden durch die Erkenntnis, daß Nukleinsäuren genetische Information vermitteln [Avery et al. 1944], durch die Strukturaufklärung der DNA [Watson u. Crick 1953] mit der weiteren Entschlüsselung des genetischen Kodes, durch den ersten Nachweis einer Übertragung genetischer Information mittels Viren auf Zellen [Zinder u. Lederberg 1952] und eine Reihe von Transfektionsstudien in den frühen 60er Jahren.

Nennenswerte Fortschritte in der Methode des Gentransfers gab es allerdings erst in den späten 70er Jahren, als ausgefeilte Transfektionstechniken und Selektionsmethoden in der Zellkultur mit den gewaltigen Fortschritten der rekombinanten DNA-

Technologie verbunden werden konnten. Jetzt war es möglich, in größerem Maßstab verschiedenste Gene in Säugerzellen einzubringen, auf Antibiotikaresistenz zu selektieren und die Effekte des Transgens zu studieren.

Für die Schaffung der ersten realistischen Möglichkeit zur Gentherapie kann man wohl in erster Linie die Entwicklung viraler Vektoren [Shimotono u. Temin 1981, Tabin et al. 1982, Wei et al. 1981] und entsprechender Verpackungszelllinien [Miller u. Buttimore 1986] verantwortlich machen. Mit dem Transfer mehrerer krankheitsassoziiierter Gene in verschiedene Zellen in Zellkultur bekam die Möglichkeit eines effizienten Gentransfers in Säugerzellen zum Zweck der Gentherapie eine breite Akzeptanz. Ein guter Überblick über die Anfänge der Gentherapie findet sich bei Wolf u. Lederberg [1994].

2.3.1.2 Zielstellung des Beitrags

Die Entwicklung eines klinisch einsetzbaren Gentransfersystems erfordert solide molekularbiologische Kenntnisse und ein Mindestmaß an zellbiologischem und physiologischem Wissen. Es ist abzusehen, daß die Gentherapie in nicht allzuferner Zukunft auch von Medizinern eingesetzt wird, die sich in ihrer medizinischen Ausbildung nicht intensiver mit molekularer Medizin auseinandergesetzt haben. Um die Eignung eines Gentherapeutikums im Einzelfall abschätzen zu können, ist es wichtig, seine molekulare Wirkungsweise zumindest in Grundzügen zu kennen. Dies zu vermitteln, soll auf den nächsten Seiten versucht werden. Es werden die beiden wesentlichen Komponenten von Gentransfersystemen, das therapeutische Gen mit seinen Expressionskontrollelementen (das Transgen) und das Gentransfervehikel (der Vektor) besprochen. Ein Schwerpunkt wurde auf die Relevanz für Tumorerkrankungen gelegt.

2.3.2 Transgen

2.3.2.1 Krebsgentherapiestrategien und ihre Kandidatengene

Man kann Krebsgentherapiestrategien im engeren Sinn, die auf eine möglichst vollständige Ausmerzungen der Tumorzellen zielen, von supportiven Maßnahmen zum Schutz des normalen Körperge-

webes vor den Effekten der konventionellen Therapie, wie z. B. der Chemotherapie, unterscheiden. Die Beschreibung und Wertung dieser Therapieformen, die alle bereits in klinischen Studien verfolgt werden, sind Gegenstand des folgenden Buchbeitrages. Sie werden hier nur in ihrer Bedeutung für die Wahl des jeweiligen Vektorsystems diskutiert. Tatsächlich sind die Wahl der Gentherapiestrategie und damit die Wahl des Transgens von entscheidender Bedeutung für die Anforderungen, die an den Vektor gestellt werden.

2.3.2.1.1 Immungentherapie

Die Immungentherapie, hervorgegangen und eng verbunden mit der Immuntherapie, ist das etablierteste unter den Krebsgentherapieverfahren und stellt den Großteil der bisher durchgeführten bzw. laufenden Krebsgentherapiestudien dar. Eine Aktivierung des Immunsystems zu einer effizienten Antitumorimmunantwort überträgt die schwierigste Aufgabe der Krebstherapie, die Spezifität und Effizienz, den immunologischen Effektoren. Die Anforderungen an den Vektor werden dadurch herabgesetzt. Der Vorteil der Immungentherapie gegenüber der nicht genetisch vermittelten Immuntherapie, bei der das Immuntherapeutikum systemisch appliziert wird, besteht in einer Verringerung von Nebenwirkungen, die in den frühen immuntherapeutischen Ansätzen erheblich waren. Das am weitesten verbreitete Verfahren ist die Tumorstimmung mit autologen oder heterologen bestrahlten Tumorzellen oder Fibroblasten, die ex vivo oder auch in vivo mit Zytokin-, MHC- oder kostimulatorischen Molekülen transfiziert werden, um so eine systemische Immunantwort zu stimulieren. Ein anderer Ansatz versucht durch Gentransfer in in vitro expandierte, tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) deren Tumor-erkennende und -zerstörende Wirkungen zu erhöhen.

2.3.2.1.2 Suizidgentherapie

Bei dieser In-vivo-Strategie überträgt man ein Chemosensibilität-vermittelndes Gen auf die Tumorzellen, die dann durch die Gabe eines nebenwirkungsarmen Medikaments abgetötet werden. Im Fall des populärsten unter den eingesetzten Transgenen, dem der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-tk), phosphoryliert das in den Tumorzellen gebildete Enzym zusammen mit zell-eigenen Enzymen extern appliziertes Gancyclovir zum toxischen Gancyclovirtriphosphat, welches im wesentlichen durch die Hemmung der DNA-Poly-

merase zum Zelltod führt. Aufgrund eines in seinem Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärten sog. Bystander-Effekts werden auch nicht transduzierte Tumorzellen in unmittelbarer Nachbarschaft genetisch modifizierter Zellen abgetötet, was die Notwendigkeit einer kaum erreichbaren 100%igen Transfereffizienz zu einer erfolgreichen Therapie relativiert. Trotz des Bystander-Effekts ist bei diesem Ansatz ein effizientes und spezifisches Vektorsystem gefordert, da, anders als bei der Immuntherapie, das Ausmaß des primären Gentransfers den limitierenden Schritt darstellt. Ein Vorteil dieser gentherapeutischen Chemotherapie gegenüber der konventionellen Form liegt in der Begrenzung von Nebenwirkungen durch die Nutzung der Möglichkeiten des Gentransfersystems zur Erhöhung der Spezifität. Ein Nachteil könnte in den schlechteren pharmakokinetischen Eigenschaften etwa eines 90 nm großen Viruspartikels gegenüber einem Zytostatikum bestehen.

2.3.2.1.3 Tumorsuppressor- und Antionkogentherapie

Die Entwicklung dieses jüngsten unter den Krebsgentherapieansätzen, für den es noch kein etabliertes Pendant unter den konventionellen Verfahren gibt, war durch den rasanten Erkenntnisgewinn über die Ursachen der Krebsentstehung möglich. Während zunächst noch die Vorstellung bestand, durch die Substitution verlorengegangener Suppressorgene oder die Ausschaltung überexprimierter Onkogene eine Art Korrektur des onkogenen Defekts vornehmen und die Krebszelle wieder in eine normal funktionierende Körperzelle überführen zu können, sieht man heute diese Therapieform als primär zytotoxisch an. Dabei spielt die Überlegung eine Rolle, daß aufgrund der Mehrschrittkanzerogenese die Rekonstitution eines Einzelschritts kaum eine Normalisierung der Zellfunktionen bewirken kann, sondern durch Rekonstruktion eines Einzeldefekts eher eine so empfindliche Störung der Balance im proliferativen Geschehen der Tumorzelle bewirkt wird, daß diese nicht anders als mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) reagieren kann. Die Zahl der möglichen Kandidatengene aus dem Bereich der Zellzyklusregulation und der Apoptosemaschinerie wächst beständig. Aufgrund des tumorzellspezifischen Angriffspunkts ist die Spezifität des Ansatzes als höher einzuschätzen als bei der Suizidgenstrategie. Die größte Limitierung liegt vermutlich in der Effizienz des Gentransfers. Da aber auch hier von dem Auftreten eines Bystander-Effekts berichtet

wurde, scheint ein Gentransfer in 100% der Tumorzellen nicht unbedingt notwendig zu sein.

2.3.2.1.4 Supportive Gentherapiemaßnahmen

Bevor sich gentherapeutische als eigenständige Verfahren etabliert haben werden und eine routinemäßig eingesetzte Alternative zu konventionellen Verfahren darstellen, wird vermutlich die Kombination beider Therapieformen Einzug in den klinischen Alltag finden. Zu den erfolgreichsten klinischen Phase-1-Studien gehören Genmarkierungen von hämatopoetischen Stammzellen mit dem Neomycinresistenzgen, mit deren Hilfe nachgewiesen werden konnte, daß residuale Tumorzellen nach der (unvollständigen) Reinigung autologen Knochenmarks und dessen Reinfusion an einem späten Rezidiv beteiligt sind. Eine 2. ebenfalls auf hämatopoetische Stammzellen abzielende Maßnahme ist die Einführung von Multidrug-resistance-Genen (MDR-Genen), die die deletären Auswirkungen vieler Chemotherapieregimes auf die korpuskulären Blutbestandteile erheblich verringern könnte. Die Hauptschwierigkeit bei diesen Therapieverfahren liegt im effizienten Gentransfer in die hämatopoetischen Stammzellen, die sich auch ex vivo nur schwer transfizieren lassen.

2.3.2.2 Struktur des Transgens

2.3.2.2.1 Kodierender Bereich

Aus Gründen der Handhabbarkeit und des besseren Zugriffs wird in der Gentherapie fast ausschließlich mit cDNA, der von Introns befreiten (gespleißten), nur aus kodierenden Einheiten (Exons) bestehenden DNA, gearbeitet. Die Größe der üblicherweise verwendeten cDNAs liegt zwischen 1 und 10 Kilobasenpaaren (kbp), ein Parameter, der bei vielen viralen Vektoren, die z. Z. noch Limitierungen in der maximalen Kapazität des Genoms haben, von Bedeutung sein kann. Bei der Wahl der Herkunft des Transgens bevorzugt man humane Gene (Ausnahme: Suizid- und Markergene), da von deren Produkten die geringste Modifizierung und Inaktivierung durch die Zielzelle und die geringste Immunogenität erwartet werden können.

2.3.2.2.2 Expressionskontrollelemente

Die Bedeutung der Expressionskontrollelemente (EKE) für die erfolgreiche Anwendung der Genthe-

rapie kann nicht genügend betont werden. Die Möglichkeit, Gene kontrolliert zu exprimieren und damit Proteine kontrolliert zu synthetisieren, stellt einen gewaltigen konzeptionellen Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren dar. EKE sind für die Expressionshöhe eines Gens in Abhängigkeit vom transfizierten Zelltyp verantwortlich. Damit besteht die Möglichkeit, die Transgenexpression auf den Tumor zu beschränken, selbst wenn mit dem Gentransfer auch Normalzellen getroffen wurden.

Bei Säugetieren wird die für ein Protein kodierende DNA-Sequenz von der RNA-Polymerase II transkribiert. Um aktiv zu werden, muß das Enzym im Verbund mit Transkriptionsfaktoren an 5' vom Transkriptionsstart gelegene DNA-Sequenzen, den Promotor, binden. Weiter 5' oder auch 3' gelegene sog. Enhancer haben zusätzlich Einfluß auf das Expressionsniveau des abgelesenen Gens. Bei identischem Genotyp haben die Zellen des Körpers teilweise sehr unterschiedliche Phänotypen, ein Phänomen, was u. a. auch in Unterschieden im Expressionsniveau der Gene begründet liegt. Welche Genloci in welchem Gewebe zu welchen Zeitpunkten aktiv sind, hängt von dem jeweiligen Set an Transkriptionsfaktoren, über die ein Zelltyp verfügt, ab. Promotoren oder Enhancer werden für ein bestimmtes Gewebe oder einen Zelltyp als gewebespezifisch bezeichnet, wenn dort ein so spezifisches Set an Transkriptionsfaktoren existiert, daß die EKE nur oder vorzugsweise in diesem bestimmten Zelltyp aktiv sind und das nachgeschaltete Gen aktivieren. Es ist von entscheidender Bedeutung für eine gentherapeutische Anwendung dieses Prinzips, daß ein gewebespezifischer Promotor grundsätzlich ein heterologes Gen regulieren kann, welches natürlicherweise von einem anderen Promotor exprimiert wird. Die EKE vieler Gene sind heute gut charakterisiert, und für die meisten Gewebe sind auch mehr oder weniger gewebespezifische Promotoren bzw. Enhancer identifiziert worden. Da sich Tumorzellen in ihrem Phänotyp erheblich von den sie umgebenden Zellen unterscheiden, also Unterschiede in der Transkriptionsregulation vorliegen müssen, ist das Reservoir an tumorzellspezifischen EKE potentiell sehr groß. Bisher wurden die EKE von 3 verschiedenen Genklassen für den gentherapeutischen Einsatz in Betracht gezogen:

- Promotoren von Genprodukten, die z. B. als Tumormarker in der Onkologie Bedeutung haben [α -Fetoprotein (AFP, Hepatozelluläres Karzinom), Karzinoembryonales Antigen (CEA, Kolonkarzinom)]

- Onkogenpromotoren (erbB2, Mammakarzinom)
- Promotoren mit einer Spezifität für das Normalgewebe, aus dem der Tumor hervorgegangen ist (Tyrosinkinase, Melanozyten, Melanom).

2.3.2.2.1 Gewebespezifische Expression in viralen Vektoren

Aufgrund der z. Z. noch bestehenden Limitierungen in der Verpackungskapazität vieler viraler Vektoren ist man daran interessiert, die eingesetzten EKE möglichst kurz zu halten. Während sich bei vielen Promotoren regulatorische Elemente noch 15 kbp 5' vom Startkodon befinden, sind gentherapeutisch eingesetzte EKE selten länger als 5 kbp. Um trotzdem ein hohes Maß an Expressionsstärke und Spezifität aufrechtzuerhalten, muß man in transienten Transfektionsexperimenten von Plasmiden mit geeigneten Reportergenen unter der Kontrolle der zu testenden EKE sorgfältig prüfen, in welchem Ausmaß Sequenzen deletiert und wie regulatorische Elemente kombiniert werden können, um trotz notwendiger Verkürzungen möglichst geringe Einbußen an Wirkung zu haben. Gegebenenfalls können auch die Kernbereiche starker, aber ubiquitär wirksamer viraler Promotoren mit gewebespezifischen Enhancer-Elementen verbunden werden, was einen Kompromiß aus Effizienz und Spezifität darstellen kann. Das Ausmaß an notwendiger Spezifität hängt letztlich vom gewählten Therapieverfahren ab. Während man bei der ex vivo eingesetzten Immuntherapie und supportiven Therapie zugunsten starker, gut charakterisierter viraler Promotoren ganz auf die gewebespezifische Expression verzichten kann, ist eine solche bei zytotoxischen In-vivo-Verfahren aus Sicherheitsgründen auf Dauer unverzichtbar.

Wenn in der transienten Transfektion von Zielzellen eine gute Spezifität und Effizienz eines untersuchten EKE gezeigt wurde, ist der nächste Schritt der Nachweis, daß diese Eigenschaften auch nach der Integration in den Gentransfervektor oder nach der Integration in das Wirtszellgenom erhalten bleiben. Bei Retro- und Adenoviren sind Interferenzen durch viruseigene EKE bekannt. Nach der Integration in das retrovirale Genom (s. unten) in Leserichtung kann es vorkommen, daß der starke, ubiquitär aktive, retrovirale Promotor (LTR) am 5'-Ende des Genoms die Regulation des Transgens übernimmt und mit der Aktivität des gewebespezifischen Promotors konkurriert [Wu et al. 1996]. Daher bevorzugt man inzwischen den Einbau des Transgens in Antisense-Orientierung zur LTR. Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung von retroviralen Vektoren, die bei der

Integration ins Wirtszellgenom die eigene LTR verlieren (SIN-Vektoren [Yu et al. 1986], s. unten) oder der Austausch des retroviralen Promotors durch einen gewebespezifischen.

Die entsprechenden Befunde bei Adenoviren sind noch uneinheitlich, aber es gibt mehrere Studien, wonach die Gewebespezifität im adenoviralen Kontext weitgehend erhalten bleibt [Kaneko et al. 1995, Sandig u. Strauss, submitted]. Eine Alternative zur gewebespezifischen Expression im engeren Sinn, die trotzdem eine spezifische Expression im Zielgewebe erlaubt, wurde unter Verwendung von 2 unabhängigen adenoviralen Vektoren demonstriert [Hersh et al. 1995]. Der natürliche Tropismus von Adenoviren für einen bestimmten Zelltyp konnte dadurch potenziert werden, daß das therapeutische Gen von einem Promotor gesteuert wurde, der wiederum vom Genprodukt des koapplizierten 2. Vektors abhängig war.

Adeno-assoziierte Viren scheinen für die gewebespezifische Expression besonders geeignet zu sein. Der transgene Vektor wird hier nur von 2 kurzen ITR (inverted terminal repeats) flankiert, die keine (nennenswerten) expressionsregulatorischen Sequenzen besitzen. Daher ist keine Interferenz mit internen gewebespezifischen Promotoren zu erwarten. Eine Erhaltung der gewebespezifischen Expression ist für den AFP-Promotor [Su et al. 1996] und die β -Globingen-LCR (LCR: locus control region) [Zhou et al. 1996] im AAV-Kontext beschrieben worden. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, in welchem Maß AAV ins Genom integrieren oder aber stabil episomal vorliegen. Für zytotoxische Krebsgentherapien, die eine spezifische Expression erfordern, die nicht lang anhalten muß, wäre mit Blick auf die gewebespezifische Expression ein episomaler Status vorteilhaft, da dann keine Positionseffekte (s. unten) auftreten. Einer der internen (im Vektor gewöhnlich deletierten) Promotoren der Wildtyp-AAV (rep-p5) scheint selbst eine gewisse Gewebespezifität für Bronchialepithel und nicht-lymphatische Milzzellen zu haben [Flotte u. Carter 1995], eine Eigenschaft, die sich gentherapeutisch nutzen ließe. Einige Ergebnisse zur Expressionsregulation bei Herpes-simplex-Viren werden im Kapitel über diese Vektoren vorgestellt.

2.3.2.2.2 Gewebespezifische Langzeitexpression

Während für die immunologischen und zytotoxischen Therapieverfahren eine transiente Expression des Transgens ausreichend sein kann, ist bei Verfahren zur Knochenmarkprotektion oder Genmarkierung, wie auch bei der Mehrheit der Strate-

gien zur Behandlung nichttumoröser Erkrankungen, eine Langzeitexpression notwendig. Diese kann durch den Einsatz von Sequenzen, die eine autonome Replikation von transferierten Plasmiden in den Zielzellen ermöglichen, erreicht werden. Experimente in dieser Richtung befinden sich z. Z. noch im Anfangsstadium.

Ein etablierter Weg, zu einer stabilen Expression eines Transgens zu kommen, ist der über die stabile Integration des Gens in das Wirtszellgenom (s. unten). Es hat sich aber gezeigt, daß sowohl die Erhaltung der Spezifität als auch die Wahrung einer adäquaten und reproduzierbaren Effizienz der Genregulation nach der Integration in das Chromatin ein Problem darstellen (Positionseffekte). Dies zeigt sich sehr deutlich in Studien mit transgenen Mäusen, bei denen der Ausprägungsgrad, mit dem ein Phänotyp auftritt, je nach dem Integrationsort des Transgens erheblich zwischen den einzelnen transgenen Tieren differiert [Beermann et al. 1990, Koopman et al. 1991, Lem et al. 1992]. Es gibt verschiedene Erklärungen für dieses Phänomen. Eine, die vielleicht gentherapeutische Relevanz erlangen könnte, ist die fehlende Abschirmung der transferierten Transkriptionseinheit gegenüber dem benachbarten Chromatin. So gibt es einige Evidenz für natürlicherweise im Säugetiergenom auftretende sog. Matrix-attachment-sites (MAR), die eine Art Schutz- und Begrenzungsfunktion auszuüben scheinen [Eissenberg u. Elgin 1991, Kas et al. 1993, Kries et al. 1991]. Von solchen strukturellen Begrenzungselementen könnte durchaus eine Funktionsfähigkeit in einer breiten Palette von Geweben erwartet werden, und es sollte keinen übermäßigen technischen Aufwand darstellen, solche MAR an beiden Seiten einer Expressionskassette zu plazieren und so eine positionsunabhängige Expression zu erlangen. Eine 2. gentherapeutisch relevante Erklärung für die Uneinheitlichkeit im Auftreten von Positionseffekten besteht in der Überlegung, daß unter den getesteten Enhancer-Elementen durchaus solche zu finden sind, die bei einer Integration in das Genom ihre Gewebespezifität bewahren, daß aber die herkömmlichen Testmethoden gewöhnlich nicht geeignet sind, solche Elemente reproduzierbar herauszufiltern. Tatsächlich sind inzwischen mehrere Enhancer-ähnliche Sequenzen isoliert worden, die Positionseffekte anscheinend verhindern und die Transkription in einer dominant-positiven Weise aktivieren [Bonifer et al. 1990, Dillon u. Grosveld 1993, Greaves et al. 1989, Sippel et al. 1992]. Solche, als Locus-control-Regionen bezeichneten Abschnitte bewahren eine optimale Gewebespezifität

im Verbund mit homologen Promotoren und können ohne Funktionsverlust mit heterologen Genen kombiniert werden.

2.3.2.2.3 Regulierbare Expression

Während bei der gentherapeutischen Behandlung von Krebs die Gewebespezifität im Vordergrund steht, kommt bei Marker- und supportiven Studien und bei der Therapie nichttumoröser Erkrankungen der absoluten Höhe der Genexpression eine besondere Bedeutung zu. Bei der Therapie monogenetisch vererbter Erkrankungen beispielsweise muß gewährleistet sein, daß das Expressionsniveau des substituierten Gens dem physiologischen möglichst nahe kommt. Zu niedrige Konzentrationen des Expressionsprodukts führen zum Wirkungsverlust, zu hohe Konzentrationen können toxisch sein. Eine Möglichkeit, Einfluß auf das Expressionsniveau eines Transgens zu nehmen, wenn auch auf Kosten der Gewebespezifität, bieten regulierbare Promotoren. Am weitesten verbreitet ist das tet-System [Gossen u. Bujard 1992, Gossen et al. 1995]. Hier wird das Transgen unter die Kontrolle eines primär inaktiven Minimalpromotors mit Transaktivatorbindungsstelle gebracht. Weiterhin wird ein Transaktivatorgen unter einem konstitutionell aktiven Promotor transferiert. Durch die externe Applikation des Antibiotikums Tetrazyklin kann der Transaktivator so modifiziert werden, daß er an seine Bindungsstelle 5' vom Transgen bindet und dieses aktiviert wird. Da dieses System stufenweise regulierbar ist, wäre ein gentherapeutischer Einsatz dort vorstellbar, wo zumindest vorübergehend fein abgestimmte Expressionsniveaus gefordert sind. Auch eine Expressionskontrolle über Steroidhormon-responsive Elemente scheint in vitro und in vivo möglich zu sein [Delort u. Capocchi 1996]. Die kontrollierbare Transgenexpression wird im Verlauf der Entwicklung der Gentherapie zu einer klinischen Routinemethode vermutlich immer mehr an Bedeutung gewinnen, da nach der Dokumentation der Effizienz eines gentherapeutischen Ansatzes, die wesentlich von der Optimierung der bestehenden Vektoren abhängt, Aspekte der Feinregulation und Sicherheitsbedürfnisse im Vordergrund des Interesses stehen werden.

2.3.2.3 Stabilität des Transkripts

Um die effiziente Expression eines Fremdgens zu erreichen, ist es nicht nur notwendig, daß das Gen ordnungsgemäß transkribiert wird, sondern auch,

daß ein stabiles Transkript entsteht, welches zur Translation ins Zytoplasma transportiert werden kann. Da eine transgene Expressionskassette immer ein Kunstprodukt darstellt, bleibt eine Unsicherheit, ob das Transgen in der Empfängerzelle auch so funktioniert, wie vorgesehen. Daher ist ein gentherapeutischer Einsatz immer nur nach empirischer Testung der hypothetischen Funktion in der Zellkultur und im Tierexperiment möglich. Dies wird besonders deutlich bei der Testung der Transkriptstabilität, bei der die Menge der experimentellen Daten so begrenzt ist, daß wenig theoretische Rahmenbedingungen gesetzt werden können. Weitgehende Einigkeit besteht darin, daß ein Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der meisten eukaryotischen mRNAs deren Stabilität erhöht und daher in die Expressionskassette mit aufgenommen werden sollte. Möglicherweise spielen auch Introns, die während der Konversion des primären Transkripts zur mRNA entfernt werden (Spleißen), sowie auch die Ereignisse des Spleißens selbst für die Stabilität des Transkripts eine Rolle [Collis et al. 1990, Dillon 1993]. Wegen der Kapazitätsbegrenzung der meisten Vektoren (s. unten) können nicht sämtliche Introns wieder in das Transgen aufgenommen werden. Daten von transgenen Tieren legen es aber nahe, zumindest 1 Intron in die Expressionskassette mit einzubeziehen, wobei allerdings Hinweise existieren, daß nicht alle Introns gleichermaßen wirksam sind [Palmiter et al. 1991].

2.3.3 Vektor

Obwohl sich verschiedene Körpergewebe in ihrer Zugänglichkeit für unterschiedliche Pharmakapreparationen durchaus unterscheiden, stellen das Herankommen eines Medikaments an seinen Wirkort und die Aufnahme in die Zelle in der modernen Pharmakologie häufig lösbare Probleme dar und sind nicht mehr der Hauptgegenstand therapeutischer Überlegungen. Ganz anders liegt der Fall in der Gentherapie: DNA kann nicht unverpackt appliziert werden, da sie ohne Hilfsmittel nur sehr schlecht von Zellen aufgenommen wird. Einer In-vivo-Anwendung nackter DNA steht außerdem die rasche Inaktivierung durch Nukleasen des Bluts entgegen. Es wurden daher Vektorsysteme entwickelt, die neben dem Schutz der DNA vor enzymatischem Abbau noch 2 weitere wichtige Aufgaben übernehmen: Eine möglichst effiziente Aufnahme durch die Tumorzelle und die Gewährleistung, daß das

Tabelle 2.3.1. Eigenschaften gentherapeutischer Vektoren und Eignung für Krebsgentherapie

Vektor	Transfereffizienz in vitro	Transfereffizienz in vivo	Expressionsniveau	Expressionsdauer	Spezifität für Tumoren	Sicherheit	Zytotoxische Therapie	Immuntherapie ex vivo	Immuntherapie in vivo	Marker/Supportive Therapien ex vivo
Retroviren	++	+ ↑	+	+++	++ ↑	+++	+ ↑	++	+	+++
Adenoviren	+++	+++	+++	+ ↑	+ ↑	++ ↑	+++ ↑	++ ↑	++ ↑	+ ↑
AAV	++	++	++	+++	+ ↑	++ ↑	+ ↑	++	++	+++
HSV	+++	+++	+++	++	+	+ ↑	+++	+	+	+
Vakziniaviren	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+
Direkte DNA-Injektion	+	+	+	+	+	+++	+	+	+++	+
Partikelbombardement	++	+---	+	+	+	+++	+---	+	++	+
Kationische Liposomen	++	+---	+	+	+	+++	++	++	+++	+
Rezeptor-vermittelter Gentransfer	++	++	+	+	+++	+++	+	++	++	+
Adenovirusbestandteile im Vektor	+++	++	+	+	+++	++	+	++	+	+
Inaktivierte Sendai-Viren	++	++	+	+	+	++	++	++	++	+

Ausprägungsgrad: + gering, ++ mittel, +++ hoch, ↑ weist auf zu erwartende Verbesserungen hin

Gen zunächst ins Zytosol und dann in den Zellkern gelangt. Die Entwicklung von Vektoren für einen effizienten Gentransfer stellt die z. Z. größten Anforderungen an die gentherapeutische Forschung dar. Die verwendeten Vektoren haben durchweg makromolekulare bis subzelluläre Größe und können schon daher nicht nach herkömmlichen pharmakokinetischen Gesichtspunkten beurteilt werden. Während in der Frühphase der gentherapeutischen Bemühungen im wesentlichen auf geringfügig modifizierte natürliche Vektoren zurückgegriffen wurde, bzw. In-vitro-Transfektionsmethoden empirisch auf ihre In-vivo-Anwendung getestet wurden, um die prinzipielle Möglichkeit eines Gentransfers mit der Expression eines Transgens zu zeigen, hat man sich in den letzten Jahren verstärkt bemüht, den gestiegenen Ansprüchen an die Gentherapie durch eine immer ausgefeiltere Modifikation der Vektorstruktur Rechnung zu tragen. Übersichtsartikel zu den Grundlagen des Gentransfers liegen von Mulligan [1993] und Vile u. Russell [1994] vor (s. auch Tabelle 2.3.1).

2.3.3.1 Nicht-virale Methoden

Obwohl sich auch die sog. nicht-viralen Gentransfermethoden zunehmend viraler Prinzipien bedienen und umgekehrt virologisch orientierte Gentherapeuten immer mehr virale Funktionen aus dem Vektor auslagern, erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Unterscheidung in virale und nicht-virale Methoden noch sinnvoll. Bei nicht-viralen Verfahren besteht kein Risiko der Entstehung rekombinanter infektiöser Partikel. Im Vergleich zu manchen viralen Vektoren ist außerdem die Gefahr der insertionellen Mutagenese geringer. Diese Vorteile bleiben sicher bis auf weiteres der wesentliche Pluspunkt von nicht-viralen gegenüber viralen Therapien. Zwei weitere Vorteile, nämlich die bessere Herstellbarkeit und Handhabung sowie die hohe DNA-Aufnahmekapazität, könnten sich in naher Zukunft durch die Weiterentwicklungen viraler Vektoren relativieren. Den genannten Vorteilen steht als wesentlicher Nachteil die geringe In-vivo-Gentransfereffizienz nicht viraler Methoden entgegen.

2.3.3.1.1 Physikalische Methoden

2.3.3.1.1.1 Ex-vivo-Verfahren

Ein in der Grundlagenforschung häufig angewandtes Transfektionsverfahren ist die Elektroporation [Chu et al. 1987]. In Suspension befindliche Zellen werden einem Spannungsfeld ausgesetzt. Durch

kurzzeitig entstehende Öffnungen in der Plasmamembran kann Plasmid-DNA in die Zellen gelangen. Nach Optimierung der verschiedenen Parameter in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie können transiente Transfektionsraten bis 90% erreicht werden [Ledley 1995]. Über stabile Transfektionsraten hämatopoetischer Vorläuferzellen von bis zu 4,5% wurde berichtet [Matthews et al. 1995].

Ein weiteres, ebenfalls nur für eine ex-vivo-Anwendung in Frage kommendes Verfahren ist die Mikroinjektion. Es bleibt abzuwarten, ob es gelingt, durch automatisierte Injektionen die Ausbeute stabil transfizierter Zellen (z. B. hämatopoetische Stammzellen) signifikant zu erhöhen und unter geeigneten Kulturbedingungen ex vivo zu vermehren, bevor sie reinfundiert werden. Beide Verfahren sind bisher nicht nennenswert zu gentherapeutischen Zwecken eingesetzt worden.

2.3.3.1.1.2 In-vivo-Verfahren

Neuere Verfahren, die auch für eine In-vivo-Anwendung geeignet wären, sind Partikelbombardement [Burkholder et al. 1993, Cheng et al. 1993, Yang et al. 1990] und Jetinjektion [Vahlsing et al. 1994]. Bei ersterem Verfahren werden zunächst 1–3 µm große Gold- oder Tungsten-Partikel mit Plasmid-DNA beschichtet. Die Partikel werden dann mit Hilfe eines Art Schockwellengenerators in einem elektrischen Spannungsfeld beschleunigt und auf das Zielgewebe gefeuert. Die Barriere der Zellmembran wird so durch den physikalischen Einschlag durchbrochen und die DNA intrazellulär freigesetzt. In vitro konnte eine Transfektion von epithelialen, endothelialen, fibroblastoiden und lymphozytären Zellen sowie primären Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten gezeigt werden. Die DNA-Integration lag bei 0,01–0,001% [Ledley 1995]. In vivo wurde das Verfahren bisher mit Rattepidermis, -muskelgewebe, -leber und -pankreas und Mausmuskelgewebe durchgeführt [Ledley 1995, Schofield u. Caskey 1995]. Leber, Epidermis und Pankreas zeigten nur eine transiente Expression. In der Dermis konnte eine Expression noch nach 3 Jahren festgestellt werden [Cheng et al. 1993]. Die transgene DNA scheint bei diesem Verfahren nicht in das Wirtszellgenom zu integrieren und in den meisten Fällen als relativ instabiles Episom vorzuliegen. Eine Transfereffizienz in 10–20% der beschossenen Hautzellen wurde beschrieben [Williams et al. 1991]. Die Eindringtiefe betrug, je nach Organ (Haut) 200–500 µm (Leber), [Williams et al. 1991]. Kürzlich wurde über Eindringtiefen von 30–50 Zellschichten berichtet [Yang u. Sun 1995]. Von seiten der Therapieeffizi-

enz konnten Verzögerungen im Tumorwachstum durch den Zytokingentransfer festgestellt werden [Yang u. Sun 1995]. Der Transfer von mRNA scheint ebenfalls sowohl in vitro als auch in vivo möglich zu sein [Qiu et al. 1996].

Bei der Jetinjektion durchbricht ein unter hohen Druck gesetzter Strom aus Flüssigkeitskügelchen die Zellmembranen und reißt die zugefügte DNA mit. Mit dieser Technik ließ sich Maushaut durchdringen und der darunterliegende Muskel transfizieren, wobei die Expression des Reportergens jedoch nur 1/10 derjenigen nach Injektion (Kanüle) der gleichen DNA-Menge betrug [Vahlsing et al. 1994].

Überraschend hohe Transferraten in Muskelgewebe im Vergleich mit adenoviralen und retroviralen Vektoren konnten mit der einfachen Injektion nackter Plasmid-DNA erreicht werden [Davis et al. 1993]. Die Transferraten waren höher als bei Retroviren und mit etwa 10% an blaufärbten Zellen im Gewebeschnitt mit Adenoviren vergleichbar. Für die meisten anderen Gewebe sind derart hohe Transferraten nicht gefunden worden [Ledley 1995]. Der Aufnahmemechanismus der DNA in die Zelle ist nicht bekannt.

Für die zytotoxische Behandlung der meisten soliden Tumoren ist die Transfereffizienz der physikalischen Verfahren zu niedrig. Eine Behandlung breitflächiger Hautlymphome mit Partikelbombardement wäre evtl. in Betracht zu ziehen. Dazu müßten aber die Transfereffizienz und die Eindringtiefe noch eingehender evaluiert werden. Eine Anwendung sowohl für Partikelbombardement und Jetinjektion als auch für das einfache und kostengünstige Verfahren der direkten DNA-Injektion könnte in der Immuntherapie liegen [Ulmer et al. 1993, Vahlsing et al. 1994], wo auch eine geringe Transgenexpression bzw. eine hohe Expression in wenigen Zellen zum Auslösen einer Immunantwort ausreichen können. Außerdem lassen sich mit diesen Verfahren auch Zellen transfizieren, die, z. B. wegen fehlender Rezeptoren, viralen Verfahren nicht zugänglich sind.

2.3.3.1.2 Chemische Methoden

Bei den chemischen Gentransfermethoden wird i. allg. gereinigte Plasmid-DNA, die das Transgen enthält, mit einer Trägersubstanz komplexiert und diese Komplexe ex vivo oder in vivo appliziert.

2.3.3.1.2.1 Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation

Das 1. Verfahren mit dem die zelluläre Aufnahme von DNA substantiell gesteigert werden konnte,

die Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation [Graham u. van der Eb 1973, Wigler et al. 1977], wurde bereits in den frühen 70er Jahren entwickelt und optimiert. Die in der Grundlagenforschung extensiv eingesetzte Methode erlaubt eine Transfektion von, je nach Zelltyp, 10–50%, wobei ein nennenswerter Prozentsatz der DNA bis in den Zellkern gelangt und dort transient exprimiert wird. Ein kleiner Anteil der Zellen (bis zu 1%, meist weniger als 0,1%) kann aufgrund der stabilen Integration des Transgens ins Genom eine Langzeitexpression aufweisen. Die nur in vitro einsetzbare Methode wurde aber bisher gentherapeutisch nicht in größerem Maß eingesetzt.

2.3.3.1.2.2 Kationische Liposomen

Die in der Gentherapie am häufigsten angewandte unter den nicht-viralen Gentransfermethoden ist die Transfektion mit kationischen Liposomen [Caplen et al. 1995, Staubinger 1993]. Sie wurde in den letzten Jahren mit Blick auf den therapeutischen Einsatz vielfach modifiziert. Die Technik beruht auf den elektrischen Ladungseigenschaften der DNA (negativ aufgrund des Phosphatrückgrads der Doppelhelix), kationischer Lipide (positiv) und der Zelloberfläche (insgesamt negativ). Zum Einsatz kommen monokationische Lipide, wie DOTMA, aber auch Weiterentwicklungen mit höherer Transfektionseffizienz, wie DOSPA, welches wegen einer Spermidinkopfgruppe mehrere positive Ladungen trägt. Weiterhin werden auch weniger toxische, für die In-vivo-Anwendung geeignete Einzelsubstanzen und Kombinationen, wie das polyzyklische DC-chol bzw. das myristylierte DMR1 in Verbindung mit dem neutralen Lipidamin DOPE verwendet. Diese Lipide bilden in wässriger Lösung unter Ultraschallbehandlung Doppelschichtmizellen, lassen sich durch Ultrazentrifugation in homogene Fraktionen gleicher Partikelgröße auftrennen und können durch einfache Inkubation mit DNA beladen werden. Auf diese Weise wird der DNA einerseits Schutz vor mechanischen und enzymatischen Einflüssen gegeben, andererseits durch die ladungsvermittelte Bindung ein Kontakt mit der Zelloberfläche hergestellt. Es ist noch nicht ganz geklärt, welcher Mechanismus die effiziente Abgabe der Nukleinsäuren ins Zytosol ermöglicht, aber sowohl die einfache Fusion der Liposomen mit der Zellmembran als auch ein endozytotischer Weg mit Freisetzung zumindest eines Teils der DNA aus den Endosomen werden diskutiert. Die Transgenexpression wird mit durchschnittlich 1–3 Wochen, ausnahmsweise auch länger (9 Wochen, Zhu et al. [1993]) angegeben.

Für Liposomen sind die wohl ausführlichsten pharmakokinetischen Studien unter den Gentransfersystemen durchgeführt worden [Ledley 1995]. Die Halbwertszeit im Blut z. B. nach i.v.-Infusion wird mit weniger als 5 min [Lew et al. 1995] angegeben.

Dort, wo eine transiente Expression des Transgens ausreichend oder sogar erwünscht ist, wie bei Tumorstimmulierungen, können kationische Liposomen ex vivo und in vivo eingesetzt werden. Wenig toxische Liposomen sind inzwischen in 6 In-vivo-Tumorstimmulierungsstudien mit etwa 60 Patienten eingesetzt worden. In allen Fällen werden die Liposomen direkt intratumoral appliziert. Während ein weitgehender Konsensus existiert, daß die erreichbare In-vivo-Transfereffizienz mit kationischen Liposomen ausreichen kann, um eine effiziente Immunantwort zu erhalten, besteht z. Z. keine Einigkeit darüber, ob Liposomen auch für die zytotoxische Gentherapie geeignet sind. Je nach Applikationsart kann die Transfereffizienz beachtlich sein. Die Applikation eines DC-chol-DOPE-Aerosols und dem β -Galaktosidase-Reportergen bei Mäusen zeigt eine Blaufärbung (als Ausdruck einer Transfektion) von mindestens 40% des respiratorischen Epithels von Trachea und Hauptbronchien [Alton et al. 1993]. Die Applikation von DOPE-Liposomen in die Schwanzvene von Mäusen resultierte in einer sehr guten Gewebsverteilung mit zumindest ausschnittsweiser Transfereffizienz von Lungen- und Milzgewebe von über 50% [Zhu et al. 1993], was für eine gute Extravasationsfähigkeit der Liposomen spricht. Gute Ansprechraten von Primärtumor und Lungenmetastasen bei Mäusen nach zytotoxischer p53-Therapie sind beschrieben worden [Lessonwood et al. 1995]. Bei einer direkten intratumoralen Injektion erreichte man eine Transfektionseffizienz von 1–10% in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle [Stewart et al. 1992]. In einem anderen Experiment lag die maximale durchschnittliche Transfereffizienz bei 2,4% der Tumorzellen [Sugaya et al. 1996], was allerdings zur Induktion einer Tumorstimmulierung ausreichte. Weiterentwicklungen, wie die Testung wiederholter Injektionen oder Dauerinfusion (Pumpensysteme), sind abzuwarten, bevor man die Wertigkeit liposomaler Präparationen für die zytotoxische Gentherapie beurteilen kann.

Die bisher klinisch eingesetzten Liposomen können als relativ sicher gelten. Zirkulierende Liposomen werden relativ schnell vom retikuloendothelialen System aufgenommen und abgebaut. Weder im Tierexperiment noch in klinischen Studien konnten akute Toxizitäten festgestellt werden. Es

konnte auch kein Gentransfer in Gonadenzellen gefunden werden, und die überwiegend transiente Natur der Genexpression stellt hinsichtlich der unerwünschten vertikalen Weitergabe von Transgenen einen weiteren positiven Sicherheitsaspekt dar.

Eine Komplexierung der DNA mit dem Kernprotein HMG₁ vor der Integration in spezielle Liposomenpräparationen führt zu einer Erhöhung der Gentransfereffizienz in vitro und in vivo [Kameda et al. 1989b]. HMG₁ (high mobility group antigen) ist ein Nicht-Histon-Kernprotein, das DNA an seiner Oberfläche zu binden vermag und darüber hinaus den Kerntransport des DNA-Proteinkomplexes zu unterstützen scheint. HMG₁ sorgt vermutlich für einen verbesserten Transport der DNA in den Zellkern und eine höhere Stabilität. HMG-vermittelter Gentransfer ist auch ohne Verwendung von Liposomen möglich, wobei die Transfereffizienz in vitro an die der Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation heranreichen kann [Boettger et al. 1988]. Die In-vivo-Anwendung ist schwierig, aber möglich [Arnold u. Boettger, pers. Mitteilung].

Der mit anionischen oder neutralen Liposomenpräparationen erreichte Gentransfer liegt niedriger als der mit kationischen Liposomenmischungen mögliche und hat daher in der Gentherapie keine Bedeutung erlangt.

2.3.3.1.3 Kombinierte Gentransfersysteme

Die derzeitige Vektorentwicklung wird von der Modifikation bestehender viraler Gentransfersysteme nach den Erkenntnissen über deren bestehende Insuffizienzen dominiert (s. unten). Daneben gibt es aber auch Bestrebungen, in synthetischen Vektoren die Vorteile verschiedener Gentransfersysteme zu kombinieren.

2.3.3.1.3.1 Rezeptor-vermittelter Gentransfer

Neben der gewebespezifischen Expression (s. oben) und der ortsgerichteten Applikation des Vektors besteht im Einsatz von zellspezifischen Rezeptoren eine Möglichkeit, die Spezifität der Therapie zu erhöhen. Es sind eine Reihe mehr oder weniger tumorspezifischer Antigene bekannt, deren Liganden potentiell für gentherapeutische Zwecke einsetzbar sind. Es ist vorstellbar, die Oberfläche viraler Vektoren zu modifizieren (s. unten) oder in synthetische Vektoren eine Rezeptorkomponente zu integrieren. Die intensivsten Untersuchungen sind bisher mit dem Hepatozytenspezifischen Asialoglykoproteinrezeptor durchge-

führt worden [Wu et al. 1989]. Ein solches Gentransfersystem besteht aus 3 Komponenten:

- Kationisches Polypeptid Polylysin
- Kovalent an das Polylysin gebundener Asialoglykoproteinrezeptor
- DNA in Plasmidform, die, negativ geladen, mit Polylysin komplexiert

Die sorgfältige Reinigung der Polylysin-Asialoglykoproteinrezeptor-Konjugate ist wichtig, ebenso wie die Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Konjugat zu DNA. Das System vereinigt den Vorteil der Protektion der DNA (durch das Polylysin) mit einem Targeting des Vektors (durch den Rezeptor), der im oben angeführten Beispiel zu einer Aufnahme von 85% der i.v. verabreichten DNA in die Leber führte [Wu u. Wu 1988]. Es ist nicht untersucht worden, in welchem Umfang das hepatische retikuloendotheliale System an diesem Effekt beteiligt war, aber die Höhe des Transfers in Leberparenchymzellen war ausreichend, um im hypercholesterinämischen Watanabe-Kaninchen eine signifikante, wenn auch nur transiente Verminderung des Serumcholesterinspiegels nach Transfer des LDL-Rezeptor-Gens zu erreichen [Wilson et al. 1992].

2.3.3.1.3.2 Virale Komponenten im Gentransfervektor

Ein Nachteil der oben beschriebenen Methode liegt im ineffizienten Transfer des Transgens von der Zellmembran zum Ort der Genexpression, dem Zellkern. Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose wird die DNA in intrazelluläre Vesikel aufgenommen. Zytoplasmatische Lysosomen fusionieren dann mit diesen Vesikeln und bilden sog. Endolysosomen. Im Rahmen eines massiven pH-Abfalls im Endolysosom wird die DNA zum Großteil durch lysosomale Nukleasen abgebaut. Eine Möglichkeit, dies zu verhindern, ist die Integration attenuierter Adenoviren in den Gentransfervektor. Humane Adenoviren gelangen über die Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle. Sie sind in der Lage, bei einer Körpertemperatur von 37°C und einem sauren pH von 5,5–6,0, bevor eine weitere Ansäuerung erfolgt, die endosomale Membran aufzubrechen, was die Aufnahme ins Zytoplasma und die Translokation in den Zellkern erlaubt. Mit diesem Ansatz konnte die Expression transferierter Gene auf das 1000fache erhöht werden [Cristiano et al. 1993, Curiel et al. 1992, Wagner et al. 1992a]. Zur Herstellung der inaktivierten Adenoviren werden diese zunächst mit Psoralen inkubiert und anschließend mit UV bestrahlt. Das in das Viruskapsid eingedrungene Psoralen führt nach UV-Akti-

vierung zur kovalenten Verknüpfung viraler DNA-Doppelstränge, wodurch die Möglichkeit zur Transkription aufgehoben wird. Anschließend werden die inaktivierten Adenoviren chemisch oder Antikörper-vermittelt an den Rezeptor-Polylysin-DNA-Komplex gebunden. Die Gentransferraten können in vitro bis zu 100% betragen. In vivo scheint die Gentransfereffizienz allerdings geringer zu sein. Um das System zu vereinfachen und die Größe des Vektors zu vermindern, wird vielfach versucht, die einzelnen viralen Proteine bzw. Peptide zu charakterisieren, für die endosomolytische Eigenschaften demonstriert wurden. Ein solches Peptid ist das fusogene Influenzavirusmembranglykoprotein, Hämagglutinin HA-2, welches bei saurem pH mit der endosomalen Membran fusioniert. Die Konjugation der HA-2-Peptide mit Transferrin-Polylysin-DNA verbesserte den Transfer in den Zellkern in erheblichem Maß [Wagner et al. 1992b].

Eine Alternative zu DNA-Polylysin-Adenovirus-Komplexen sind DNA-Liposom-Adenovirus-Komplexe. Mit diesem Gentransfersystem konnte eine intensive In-vivo-Transduktion von arteriellen Endothelzellen gezeigt werden [Raja-Walia et al. 1995].

Auch durch Zugabe des Anti-Malariamittels Chloroquin kann eine Ansäuerung des Endosoms gehemmt und die Stabilität der DNA erhöht werden.

2.3.3.1.3.3 Inaktivierte Sendai-Viren im Gentransfervektor

Eine Möglichkeit, trotz der Rezeptor-vermittelten Aufnahme die Degradation der DNA im Endosom zu vermeiden, ist die Umgehung des endosomalen Aufnahmewegs. Das nicht-humanpathogene Sendai-Virus [Hämagglutinierendes Virus aus Japan (HVJ)] bindet über Glykoproteinspikes an die Oberfläche der Wirtszelle, fusioniert mit der Zellmembran und entläßt, unter Umgehung des endosomalen Wegs, seine Inhaltsstoffe direkt in das Wirtszellzytoplasma [Kaneda et al. 1989a]. Bei der Konstruktion von Sendai-Vektoren werden zunächst DNA-HMG₁-Komplexe hergestellt. Diese werden dann durch Inkubation mit genau abgestimmten Mengen an neutralen Lipiden (Cholesterin, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin) als Liposomen verpackt. Der DNA-HMG₁-Liposomen-Suspension werden anschließend UV-inaktivierte Sendai-Viren zugesetzt. Mehrere Viren binden gleichzeitig ein Liposom. Mit Sendai-Komplexen läßt sich ein effizienter Gentransfer in eine Reihe von Zelllinien in Kultur erreichen. In-vivo-Untersuchungen mit regionaler intra-arterieller Applikation zeigten unterschiedlich gute

Transferraten in Leber, Niere und Gefäßendothelien [Dzau et al. 1993, Isaka et al. 1993, Kaneda et al. 1989a, b]. Die Genexpression ist nur transient.

2.3.3.1.3.4 Kombinierte Gentransfersysteme im Überblick

Keines der 3 beschriebenen kombinierten Gentransfersysteme wurde bisher in vivo zur Krebstherapie eingesetzt. Aufgrund der transienten Natur der Genexpression kommt eine Verwendung für Marker- und protektive Studien nicht in Betracht. Die Stärke der Rezeptor-vermittelten Verfahren liegt bei den zytotoxischen Therapieansätzen und ganz besonders bei dem regionalen, z. B. intraarteriellen, Zugang, denn hier können die Vorteile eines Targeting-Mechanismus mit fehlender Immunogenität und der Möglichkeit wiederholter Applizierbarkeit verbunden werden. Neben der Wahl geeigneter Tumorantigenliganden wird sicher die Partikelgröße der Kompositvektoren eine wichtige Rolle spielen. Es ist zu erwarten, daß in Abhängigkeit von der Partikelgröße ähnliche Schwierigkeiten bei der Penetration in das Tumorgewebe auftreten werden, wie sie für die Verteilung von tumorspezifischen Antikörpern bekannt sind. Unter Sicherheitsaspekten betrachtet, fehlen den Kompositsystemen weitgehend die typisch viralen Risiken, wie die Entstehung replikationsfähiger Wildtypviren oder insertionelle Mutagenese. Geringere Abwehrreaktionen des Körpers als bei viralen Vektoren sind zu erwarten. Allerdings sind bei der Verwendung höherer Dosen auch inaktiver Adenoviren entzündliche Reaktionen beschrieben worden, die denen vitaler Viren entsprechen und nicht auf die Expression viraler oder therapeutischer Gene zurückzuführen waren [McCoy et al. 1995].

2.3.3.1.4 Bakterielle Systeme

Kürzlich wurde ein auf Clostridien gestützter gentherapeutischer Ansatz beschrieben, der sich den Tropismus von Anaerobiern zu hypoxischen Arealen von Tumoren zunutze macht [Fox et al. 1996].

2.3.3.2 Virale Gentransfersysteme

Für einen In-vivo-Gentransfer mit Langzeitexpression des Transgens müssen folgende 5 Kriterien berücksichtigt werden:

- Stabilität des Vektors im eingebrachten Körperkompartiment
- Bindung an die Zielzellen

- Passage der Zellmembran
- Transfer in den Zellkern
- Integration in das Genom bzw. stabile extrachromosomale Etablierung

In verschiedenen Viren hat die Natur Vehikel geschaffen, die eine erstaunliche Eignung als Gentransfervektoren besitzen und die die meisten der genannten Kriterien erfüllen. Das eigentliche Ziel eines Wildtypvirus besteht aber nicht im bloßen Gentransfer, sondern in der Vermehrung durch latente oder lytische Infektion. Außerdem hat der Wirtsorganismus im Laufe der Evolution Abwehrmaßnahmen auf verschiedenen der oben genannten Ebenen entwickelt. Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß Viren noch erhebliche Insuffizienzen im Hinblick auf eine Anwendung als Gentherapievektoren besitzen. Die Aufdeckung der molekularen Natur solcher Insuffizienzen hat aber bereits zu Verbesserungen geführt, die einen nebenwirkungsarmen, effizienten Gentransfer möglich machen und zur Initiierung von über 100 klinischen Gentherapiestudien mit viralen Vektoren geführt haben.

Generell ist man aus Gründen der Kapazität, Toxizität und Immunogenität bestrebt, neben dem Transgen möglichst wenig virale Gene im Transfervektor zu behalten. Dies läßt sich erreichen, indem die aus dem Transfervektor ausgelagerten Gene von Helferviren, von einer eigens dafür konstruierten Verpackungszelllinie oder von Helferplasmiden bereitgestellt werden. Je nach dem Ausgangspunkt und dem Entwicklungsstand der verschiedenen viralen Vektorsysteme ist man diesem Ziel mehr oder weniger nahe gekommen. Die Effizienz und Spezifität des Gentransfers hängen, abgesehen von der natürlichen Transduktionseffizienz der Viren, auch von der erreichbaren Konzentration viraler Suspensionen und von den Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation ab. Auch diese Faktoren sind in den bestehenden Vektoren unterschiedlich weit entwickelt. Im folgenden werden die einzelnen viralen Vektorsysteme auf ihrem jetzigen Entwicklungsstand besprochen. Weiterführende Literatur zum Aufbau und Lebenszyklus der besprochenen Viren findet sich bei Fields [1990]. Auf Übersichtsarbeiten zu den gentherapeutischen Aspekten der Viren wird in den jeweiligen Kapiteln hingewiesen.

2.3.3.2.1 Retroviren

Retrovirale Vektoren wurden in mehr als 2/3 aller bisher durchgeführten klinischen Studien verwen-

det [Herrmann 1996]. Sie zeichnen sich vor anderen Vektorsystemen dadurch aus, daß sie sowohl eine recht gute In-vitro-Transfereffizienz für ein weites Spektrum proliferierender Zelllinien besitzen als auch in das Wirtszellgenom integrieren und damit eine Langzeitexpression des Transgens erlauben. Neuere Übersichtsartikel zum Thema unter gentherapeutischen Gesichtspunkten sind von Günzburg u. Salmons [1996] und Vile u. Russell [1995] erschienen.

2.3.3.2.1.1 Aufbau und Lebenszyklus

Die Familie der Retroviridae kann in 3 Subfamilien unterteilt werden, die alle klinische Relevanz haben:

- Oncovirinae, die mit dem murinen (Maus) Moloney-Leukämie-Virus (MoMuLV) das Virus für die Entwicklung der gentherapeutischen Standardvektoren stellen
- Lentivirinae, die mit HIV 1 und HIV 2 als Erreger von Aids und jüngst in stark modifizierter Form auch für gentherapeutische Zwecke Bedeutung haben
- Spumavirinae oder Foamy viruses, die kürzlich erstmalig für einen gentherapeutischen Einsatz evaluiert wurden.

Die genaue Kenntnis der viralen Struktur und des Lebenszyklus dieser Wildtypviren hat die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren ermöglicht und ist nach wie vor nötig, um Verbesserungen der Vektoren zu erreichen. Das Retrovirus ist behüllt und besitzt einen inneren Core, der aus einer ikosaedralen (von 20 gleichseitigen Dreiecken begrenzten) Proteinschale, dem Kapsid, 2 Kopien der viralen genomischen mRNA und den 3 zur Infektion benötigten Enzymen Protease, Reverse Transkriptase und Integrase besteht. Diese viral kodierten Strukturen (gag und pol) bringt das Virus vom letzten Zyklus in der letzten Wirtszelle mit. Eine nach außen an das Kapsid angrenzende Matrixproteinschicht stellt die Verbindung zur Hülle her, die von der Plasmamembran der letzten Wirtszelle abgeleitet ist und aus einem in etwa kugelförmigen Phospholipidbilayer besteht. In der Hülle befinden sich außerdem viral kodierte Glykoproteine (env), die in Abhängigkeit vom Wirtsspektrum der Viren eine Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche vermitteln und die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran katalysieren. Nach einer solchen Membranverschmelzung wird das Virus internalisiert, der Core gelangt ins Zytoplasma und von dort aus in den Zellkern. Nun kommen 2 der 3 mitgebrachten viralen Enzyme

zum Einsatz: Die Reverse Transkriptase schreibt die genomischen RNA in eine doppelsträngige cDNA (Provirus) um, und die Integrase baut das Provirus in das Wirtszellchromatin ein. Der Core kann bei Oncovirinae (anders als bei Lentivirinae) eine intakte Nuklearmembran nicht passieren, daher ist eine Zellteilung für die erfolgreiche Fortführung des viralen Lebenszyklus erforderlich. Die Integration des Provirus in das Genom erfolgt zufällig, möglicherweise mit einer leichten Häufung in transkriptionell aktiven Bereichen. Es entsteht immer die Abfolge LTR-Gene-LTR. Die beiden identischen Long terminal repeats (LTR) begrenzen das integrierte Provirus auf beiden Seiten und beinhalten regulatorische Sequenzen (Promotor, Enhancer, Poly-A-Schwanz). Dazwischen liegen die viralen Gene, namentlich gag für die Kernproteine, pol für die Reverse Transkriptase und Integrase sowie env für verschiedene Glykoproteine der Hülle. Aus Full-length-Transkriptionsprodukten werden gag- und gag-pol-Polypeptide translatiert, aus einem kleineren gespleißten Transkript entsteht env. Ein weiteres Full-length-Transkript wird als genomische RNA verpackt. Die genomische RNA bindet über ihre 5' gelegene Verpackungssequenz (Psi) an das gag-Polypeptid, während die gag- und gag-pol-Polypeptide oligomerisieren. Die gebildeten Komplexe verlassen die Zelle über einen als Budding bezeichneten Prozeß, bei dem das Kapsid von Bereichen der Plasmamembran, in die sich virale Hüllproteine eingelagert haben, umschlossen wird. Infektiosität erreichen die Viren dann durch Protease-vermitteltes Schneiden der gag- und gag-env-Polypeptide in ihre einzelnen Bestandteile. Dieser gesamte Prozeß der Virusproduktion scheint die Wirtszelle nicht zu beeinträchtigen.

2.3.3.2.1.2 Rekombinante Retroviren

Da Viren sich nur in Zellen vermehren können, bedient man sich auch in der Gentherapie der Zellkultur zur Virusproduktion (Abb. 2.3.1). Bei der Herstellung einer Virus-produzierenden Zelllinie (VPC) geht man so vor, daß zunächst ein volles retrovirales Genom, dem aber die Verpackungssequenz fehlt, meist auf eine Mausfibroblastenzelllinie transfiziert wird. Es werden nun Viruspartikel gebildet, die leer bleiben, da die virale RNA ohne Verpackungssequenz nicht an das gag-Polypeptid im sich aufbauenden Kapsid binden kann. Eine solche Zelllinie nennt man Verpackungszelllinie. Im nächsten Schritt wird ein retrovirales Plasmid transfiziert, bei welchem gag, pol und env durch das Transgen ersetzt wurden und das aufgrund

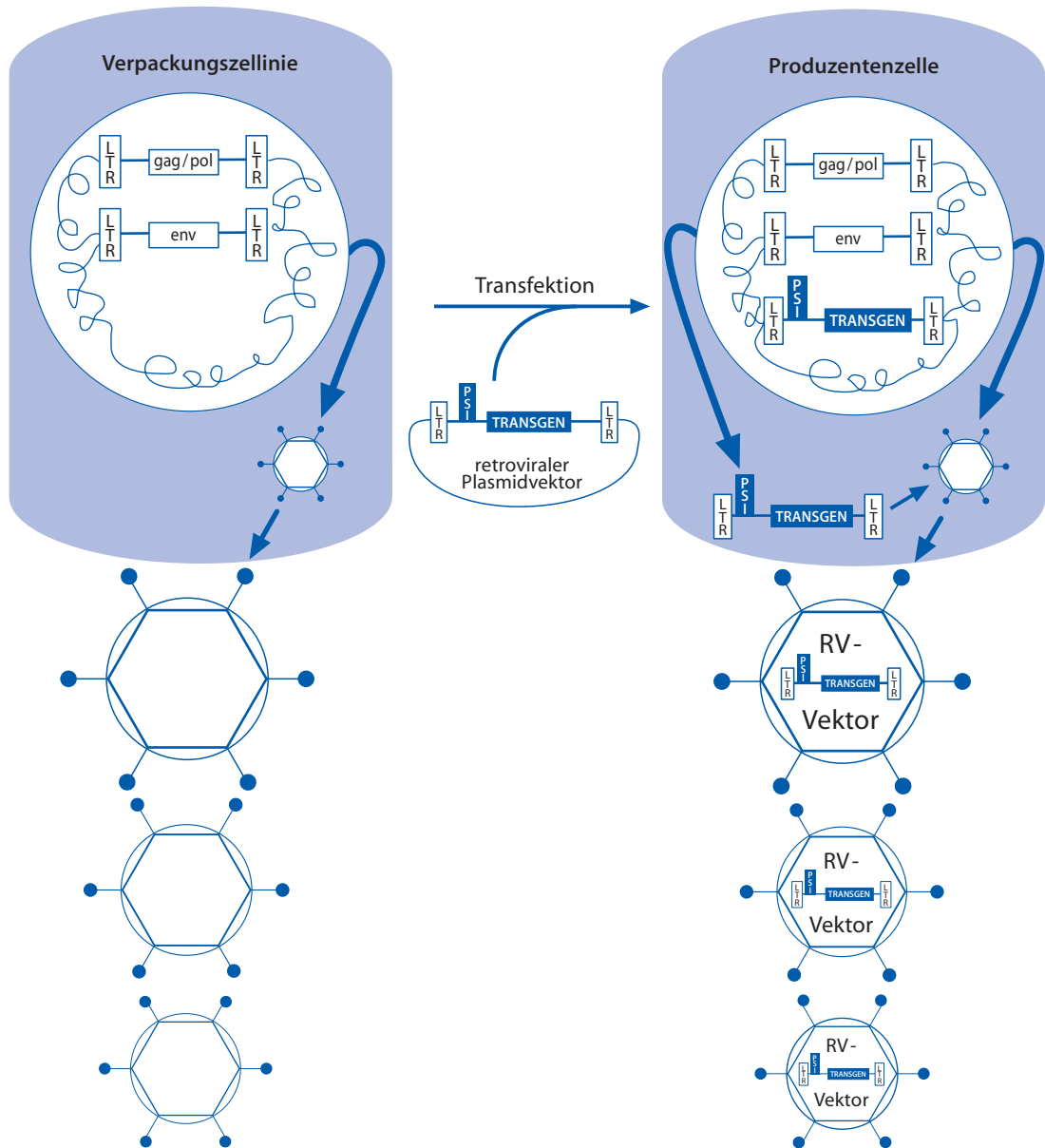


Abb. 2.3.1. Produktion retroviraler Vektoren. Durch Transfektion mit entsprechenden retroviralen Plasmiden wird eine Verpackungszelllinie generiert, die stabil ins Genom integrierte retrovirale (*gag/pol*, *env*) Sequenzen besitzt. Die Expression retroviraler Sequenzen führt zur Produktion leerer Viruspartikel, da die retrovirale mRNA (fehlende Verpackungssequenz Psi) nicht verpackt werden kann. Die Trans-

fektion der Verpackungszelllinie mit einem retroviralen, das Transgen tragenden Plasmid führt zu dessen stabiler Integration. Aufgrund des vorhandenen Verpackungssignals kann die gebildete RNA in die Virushüllen verpackt werden. Damit werden Transgen-tragende, replikationsdefiziente Viruspartikel gebildet

seiner erhaltenen Verpackungssignalsequenz von den leeren Viruspartikeln gebunden werden kann. Die VPC geben nun Viren in den Zellkulturüberstand ab, die eine Zielzelle 1malig infizieren können und auch zur Integration ins Wirtszellgenom mit Expression eines Transgens befähigt sind, aber keine neuen Virusstrukturelemente aufbauen kön-

nen, also replikationsinkompetent sind. Neben dem Verpackungssignal verbleiben auf dem transgenen Virusgenom die beiden LTR und spezifische, nahe den LTR gelegene Bereiche, die für eine korrekte reverse Transkription und Integration von Bedeutung sind. Die Aufnahmekapazität für Fremd-DNA beträgt dann bis zu 8 kb, was, je nach

Gengröße, 1–3 Transgenen entspricht. Die Aufnahme eines (Antibiotikum)-Resistenzgens neben dem eigentlichen Transgen eröffnet die Möglichkeit einer In-vitro-Selektion einer Zielzellkultur und einer Anreicherung transduzierter Zellen. Die Expression kann von einem einzelnen Promotor, gewöhnlich der 5'-LTR, gesteuert werden. Entweder wird durch entsprechendes Plazieren von Spleiß-Donor- und Akzeptor-sites ein Transkript aus einem langen Transkript gespleißt oder beide Gene liegen auf einem langen Transkript, das aufgrund einer IRES-Sequenz (IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle) differentiell translatiert wird bzw. ohne eine solche für ein Fusionsprotein kodiert. Alternativ können die beiden Gene auch durch die LTR und einen internen Promotor gesteuert werden, wobei die interne Expressionskassette auch in reverser Orientierung liegen kann, was eine geringere Beeinflussung durch die LTR zu ermöglichen scheint. Neben diesen Standardvektoren sind noch Spezialfälle mit besonderen Zielstellungen entwickelt worden: Selbst-inaktivierende (SIN) Vektoren besitzen eine Deletion in der 3'-LTR, was wegen der besonderen Art der reversen Transkription zu einem Funktionsverlust der 5'-LTR führt und damit die unbeeinflusste Expression eines Transgens durch einen internen, z. B. gewebespezifischen, Promotor (s. oben) ermöglicht [Yu et al. 1986]. Umgekehrt kann man die Expression eines Transgens in einer Zielzelle durch die Verdoppelung einer Expressionskassette erhöhen, indem man diese in die 3'-LTR des Vektors einführt und durch den Duplikationseffekt der reversen Transkription im Provirus in beiden LTR Expressionskassetten entstehen. Neben Doppelgen- oder Mehrfachgenvektoren kommen auch Einzelgenvektoren zum Einsatz, die wegen ihrer geringeren Größe zu höherkonzentrierten Virussuspensionen zu führen scheinen und bei denen keine Gefahr der Promotorinterferenz besteht.

2.3.3.2.1.3 Sicherheitsaspekte

Die größten Sicherheitsbedenken bei der Verwendung retroviraler Vektoren gehen von der Gefahr einer Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCR) mit dem Risiko der Vektor-induzierten malignen Transformation aus. Tatsächlich wurde die Entstehung aggressiver T-Zell-Lymphome in 3 von 5 Primaten dokumentiert, die hämatopoetische Stammzellen erhalten hatten, welche mit RCR-positiven Virusproben kontaminiert waren [Donahue et al. 1992].

Die ersten Verpackungszelllinien für Vektoren, die vom Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-

MuLV) abgeleitet waren (Psi 2 und Psi am), basierten auf der Transfektion mit einem MoMuLV-Genom, das in der Verpackungssignalsequenz deletiert war [Cone u. Mulligan 1984, Mann et al. 1983]. Da ein einzelnes rekombinatorisches Ereignis mit dem im 2. Schritt transfizierten, das Transgen und eine Verpackungssequenz tragenden Virusgenom genügt, um ein komplettes und verpackbares Virusgenom zu generieren, entstehen in solchen VPC relativ häufig replikationsfähige Viren. Beim retroviralen Budding wird neben dem transgenen Genom trotz fehlender Verpackungssequenz in einem geringen Prozentsatz (0,1%) auch die Strukturgen-RNA (oder Helfer-RNA) verpackt. In Abhängigkeit von der Homologie der beiden Transkripte kann bei der reversen Transkription in der Zielzelle eine homologe Rekombination stattfinden. Man ist daher bemüht, die Homologie zwischen Vektor- und Helfergenom so gering wie möglich zu halten [Martinez u. Dornburg 1996]. Verpackungszelllinien der 2. und 3. Generation wurden in den letzten Jahren außerdem so konstruiert, daß die Zahl der nötigen rekombinatorischen Ereignisse auf 2 bzw. 3 erhöht wird, ehe sich Wildtypviren entwickeln können. Die der 2. Generation zugehörige Verpackungszelllinie PA317 wurde durch Transfektion von Mausfibroblasten mit dem Plasmid pPAM3 erzeugt, das eine Deletion der Verpackungssequenz und der 3'-LTR aufweist [Miller u. Buttimore 1986]. Es hat sich gezeigt, daß 2 rekombinatorische Ereignisse nur mit äußerst geringer Frequenz auftreten und PA317, die wohl populärste unter den Verpackungszelllinien, wurde für die Herstellung der VPC der 1. klinischen Studien verwendet. Eine weitere Steigerung der Sicherheit wird mit Verpackungszellen der 3. Generation erreicht, bei denen die für gag-pol und env kodierenden Sequenzen auf 2 verschiedenen Plasmiden in die Zelle transfiziert wurden [Markowitz et al. 1988]. Bei den von diesen Verpackungszelllinien abgeleiteten VPC sind 3 rekombinatorische Ereignisse zur Generierung von Wildtypviren nötig. Auch die Spezieszugehörigkeit der Verpackungszelllinien (Maus) und der Zielzellen (z. B. Mensch) spielt eine Rolle. Einerseits können selbst Drittgenerations-VPC endogene Mausvirusgenome enthalten, verpacken und weitergeben, andererseits gewährleistet die Inaktivierung von Mausviren durch das humane Komplementsystem einen gewissen Schutz.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Arbeit mit replikationsinkompetenten Viren zwar in zahlreichen Tierexperimenten und klinischen Studien noch keine Tumorentstehung dokumen-

tiert wurde, daß aber aufgrund des grundsätzlich bestehenden Risikos der insertionellen Mutagenese und auch des erst kurzen Beobachtungszeitraums gentherapeutisch behandelter Organismen eine Optimierung der retroviren Sicherheitsaspekte angestrebt werden muß, um diese in vieler Hinsicht idealen Vektoren auf lange Sicht konkurrenzfähig zu erhalten.

2.3.3.2.1.4 Effizienz des Gentransfers

2.3.3.2.1.4.1 Retroviraler Titer. Unter optimalen Bedingungen können die am weitesten verbreiteten VPC 10^6 – 10^7 infektiöse Partikel/ml Zellkulturüberstand (Titer) generieren [Russel 1991]. Die meisten klinischen Studien sind aber mit Titern $<10^6$ durchgeführt worden. Der retrovirale Titer wird limitiert durch die Rate, mit der infektiöse Partikel von den VPC abgegeben werden, und die Rate, mit der sie ihre Infektiosität verlieren ($t_{1/2} \sim 8$ h bei 37°C). Erstere kann optimiert werden, indem eine maximale Produktion von gag-pol-Polypeptiden und env-Polypeptid einerseits und von transgener RNA andererseits angestrebt wird, was von verschiedenen Strukturmerkmalen der transfizierten Sequenzen, wie z. B. der Länge des Verpackungssignals und der transgenen RNA oder der Promotorstärke der Helferplasmide, abzuhängen scheint. Außerdem müssen extensive Subklonierungen durchgeführt werden, um unter der Vielzahl stabil transfizierter Zellen diejenigen zu ermitteln, bei denen besonders hohe Titer zu erwarten sind. Grund für die rapide Abnahme der Infektiosität der MoMuLV ist vermutlich die Dissoziation der gp70SU-Hüllproteine, und diese erschwert auch die Zentrifugation der Viren zum Zweck der Anreicherung. Durch das sog. Pseudotyping, den Austausch der empfindlichen MoMuLV-Hüllproteine durch robustere des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) war es möglich, durch Ultrazentrifugation Titer von mehr als 10^9 infektiösen Partikeln/ml zu erhalten [Burns et al. 1993, Yang et al. 1995, Yee et al. 1994].

2.3.3.2.1.4.2 In-vitro-Anwendung. Für proliferierende Zellen in Zellkultur stellen die hocheffizienten und stabil integrierenden von MoMuLV abgeleiteten Retroviren das Mittel der Wahl dar. Fast alle der bisher durchgeführten In-vitro-Markierungs-, Protektions- und Tumorstudien verwendeten retrovirale Vektoren. Zum Einsatz kommen sog. amphotrope Retroviren, die im Gegensatz zu den auf Maus und Ratte restringierten, ekotropen Retroviren anscheinend alle Säugerzellen infizieren können. Der hauptsächliche Nachteil für die In-vitro-Anwendung besteht darin, daß manche Ziel-

zelllinien wenig oder gar nicht proliferieren und entsprechend schlecht von MoMuLV infiziert werden können. Neben einer Modifikation der Viren (s. unten) versucht man, z. B. hämatopoetische Stammzellen durch Wachstumsfaktoren zur Proliferation zu bringen, ohne sie zugleich differenzieren zu lassen, damit ihre Infizierbarkeit zu erhöhen und die Resultate klinischer Studien zu verbessern bzw. die Infektionsprotokolle zu vereinfachen [Hatzfeld et al. 1996].

2.3.3.2.1.4.3 In-vivo-Anwendung. Die präferentielle Infektion proliferierender Zellen durch MoMuLV ist auch für die In-vivo-Anwendung von entscheidender Bedeutung. In der Gentherapie nicht-maligner Erkrankungen gilt dies als der entscheidende Nachteil von Retroviren, da viele Zielzellen, wie Hepatozyten, Myozyten oder Neuronen, nicht oder kaum proliferieren. Dagegen ist diese Eigenschaft in der Tumorgentherapie von Vorteil, da sie eine Schutzfunktion für das einen schnell proliferierenden Tumor umgebende Normalgewebe bietet. Mehrere klinische In-vivo-Gentransferstudien mit einem retroviralen Transfer von Suizid-, Tumorsuppressor und Antisense-Onkogenen sind bisher initiiert worden, wobei wegen der niedrigen retroviren Titer meistens die VPC selbst in den Tumor appliziert wurden [Caruso et al. 1993, Culver et al. 1992]. Angesichts des geringen Prozentsatzes der zu einem gegebenen Zeitpunkt im Tumor proliferierenden Tumorzellen ist allerdings zu überlegen, ob auf lange Sicht dem Sicherheitsaspekt nicht von anderer Seite (s. unten) Rechnung getragen werden sollte und Retroviren, die auch ruhende Zellen infizieren, in der zytotoxischen Tumorthherapie nicht einen Effizienzvorteil besitzen. Lentivirinae, wie z. B. das HIV-Virus, besitzen diese Fähigkeit, die vermutlich mit dem gag-Matrixprotein und dem vpr-Genprodukt assoziiert ist und eine Kernlokalisierung auch durch eine intakte nukleäre Membran hindurch erlaubt. Kürzlich ist ein auf HIV basierender Vektor beschrieben worden, der mit Titern bis 10^5 eine effiziente Infektion nicht-prolierender Zellen in vitro zeigte [Naldini et al. 1996]. Wenn sich, wegen der Sicherheitsbedenken, selbst massiv deletierte HIV-Vektoren vielleicht nicht durchsetzen werden, könnten doch ähnliche Ansätze, z. B. die Verwendung nur des HIV-Kernlokalisierungssignals in Verbindung mit MoMuLV-Vektoren oder andere Lentivirinae, wie das Caprine-arthritis-encephalitis-Virus (CAEV) Aussicht auf Erfolg haben.

Ein wesentlicher Punkt, der die Effizienz eines retroviren Gentransfers erheblich einschränkt

und schon zur Ablehnung eingereicherter Studienprotokolle geführt hat, ist die Sensibilität von Mausretroviren gegenüber humanem Komplement [Welsh et al. 1975] bzw. von Maus-VPC gegenüber natürlichen Antikörpern und Komplement [Rother et al. 1995], was eine rasche Inaktivierung beim Kontakt mit Serum nach sich zieht. Die Spezieszugehörigkeit sowohl der Verpackungszelllinie als auch der viralen Strukturelemente scheint Einfluß auf das Ausmaß der Komplementinaktivierung zu haben. Von HIV abgeleitete Vektoren sind z. B. komplementresistent. Kürzlich wurde eine humane Verpackungszelllinie vorgestellt, die weitgehend komplementresistente MoMuLV generierte [Cosset et al. 1995].

Ungeachtet aller Fortschritte auf molekularer Ebene wird die Lösung eines jedem Krebstherapeuten bekannten physiologischen Problems vermutlich über die Zukunft jeder Art von zytotoxischer Krebsgentherapie entscheiden: der Zugang applizierter Vektoren zum Tumor. Angesichts der Schwierigkeiten, die selbst die kleineren Antikörper oder gar Chemotherapeutika haben, einen soliden Tumor ausreichend zu perfundieren, werden besondere Applikationsformen oder Modifikationen viraler Vektoren notwendig sein, um nicht schon am 1. Schritt des Gentransfers zu scheitern. Manche Wissenschaftler sehen daher in replikationskompetenten Retroviren (oder auch Adenoviren) die einzige Chance, einen ausreichend effizienten Gentransfer zu erreichen. Solche Systeme werden sich beim Menschen vielleicht dann einsetzen lassen, wenn die Kontrollierbarkeit der Vektoren garantiert ist.

2.3.3.2.1.5 Spezifität des Gentransfers

Eine möglichst hohe Spezifität des primären Gentransfers mit einer Expression nur in den Zielzellen ist im Interesse der Sicherheit wünschenswert. Dies ist bei allen Formen des Transfers zytotoxischer Gene von besonderer Bedeutung. Eine erste Determination der Vektorverteilung ergibt sich aus der Applikationsweise der Viren in den Empfängerorganismus. Bisher wurde in Tierexperimenten und klinischen Studien hauptsächlich intratumoral appliziert. Dieser Zugang ist aber nicht immer möglich, weist erhebliche Mängel hinsichtlich einer homogenen Verteilung der Vektoren auf und ist für die Behandlung multipler oder okkult metastasen ungeeignet. Daher wurden in letzter Zeit in Anlehnung an konventionelle chemotherapeutische Methoden häufig auch regionale arterielle und systemische venöse Zugangsweisen für verschiedene virale und nicht-virale Vektoren ge-

wählt. Besonders im Hinblick auf zukünftige, wenig spezifische Applikationsmethoden ist es wichtig, einen möglichst spezifischen Effekt des Gentransfers auf molekularer Ebene zu gewährleisten. Eine Möglichkeit besteht in der Regulation des Transgens durch gewebespezifische Promotoren, was zur Bildung toxischer Transgenprodukte nur in den Zielzellen führt, selbst wenn normale Zellen transduziert wurden. Die gewebespezifische Expression bei Retroviren ist im Kapitel 2.3.2.2.2.1 „Gewebespezifische Expression in viralen Vektoren“ beschrieben.

Eine 2. Möglichkeit besteht in einer gezielten Bindung und Infektion der Zielzellen. Das Spektrum infizierbarer Zellen wird durch die Interaktion zwischen den viralen Hüllproteinen und den membranständigen Rezeptoren der Zellen bestimmt. Ekotrope MoMuLV binden an den Aminosäuretransporter, amphotrope an den Phosphattransporter und haben daher ein weites Spektrum. HIV-Viren dagegen haben wegen ihrer präferentiellen Bindung an den CD4-Rezeptor ein eher enges Spektrum. Wenn die Rezeptoren der Zielzellen bekannt sind, kann man die Retroviren so verändern, daß ein spezifisches Targeting möglich wird. So kann der für die Rezeptorbindung verantwortliche N-terminale Bereich des MoMuLV-SU-Hüllproteins gentechnisch durch heterologe Epitope ersetzt werden, für die eine Interaktion mit Zielzellrezeptoren bekannt ist [Chu u. Dornburg 1995, Kasahara et al. 1994, Valesia-Wittmann et al. 1994]. Zu diesem Ansatz sind bisher mehrere Arbeiten erschienen, eine davon mit besonderer Relevanz für die Krebsgentherapie: Der Austausch des N-terminalen SU-Proteins durch den Steel-Faktor oder Heregulin-Liganden ergab hochtitrige Viren, die, anders als die Ausgangsform, c-kit-exprimierende hämatopoetische Stammzellen bzw. den Heregulinrezeptor exprimierende Mammarkarzinomzellen infizieren konnten. Eine andere Möglichkeit besteht im Einsatz von SU-Hüllprotein-spezifischen und Membranprotein-spezifischen Antikörpern, die, über eine Streptavidinbrücke verbunden, die Retroviren an die Zielzellen binden sollen. Hier scheinen aber Schwierigkeiten bei der Internalisierung gebundener Viren aufzutreten [Roux et al. 1989].

2.3.3.2.1.6 Zusammenfassung

Seit den Anfängen der Gentherapie stellen rekombinante Retroviren die bevorzugten Vektoren für einen In-vitro-Gentransfer in der Krebsgentherapie dar. Sie infizieren eine Vielzahl von Säugerzellen, können bis zu 8 kbp fremder Sequenzen transfe-

rieren und wegen ihrer Integration ins Wirtszellgenom eine Langzeitexpression ermöglichen. Einem entsprechenden krebstherapeutischen In-vivo-Einsatz standen bisher Nachteile, wie Komplementinaktivierung, ungenügende Titer und mäßige Transduktionseffizienz, entgegen. Für jedes einzelne dieser Probleme wurden bereits ausgezeichnete Lösungen gefunden. Ein erfolgreicher Vektor der Zukunft wird aber erst durch die Kombination dieser Lösungen entstehen.

2.3.3.2.2 Adenoviren

Adenovirale Vektoren haben gegenüber anderen Transfersystemen den Vorteil eines hocheffizienten Gentransfers in vitro und v. a. auch in vivo. Daher sind sie z. Z. die Vektoren der Wahl für alle zytotoxischen In-vivo-Krebstherapien. Für Anwendungen, die eine Langzeitexpression von Transgenen erforderlich machen, sind sie bisher nur bedingt geeignet, da sie nicht in das Wirtszellgenom integrieren und eine starke Immunantwort hervorrufen, was zur Eliminierung der transgenen Zellen führen kann.

2.3.3.2.2.1 Aufbau und Lebenszyklus

Die humanen Adenoviren gehören zum Genus der Mastadenoviren. Die bisher bekannten 47 Serotypen werden in die Untergruppen A–F eingeteilt. Der Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung erreicht 90%, wobei in der überwiegenden Zahl der Fälle Erkältungskrankheiten oder inapparente Infektionsverläufe auftreten.

Die hüllenlosen Viren bestehen aus einem Kapsid mit Spikes und einem die genomische DNA enthaltenden Kern. Das ikosaedrale Kapsid besteht aus 720 Hexons und 60 Pentons, an die die Spikebildenden Fiberproteine gebunden sind. Eine Vielzahl verschiedener Polypeptide hält die Untereinheiten des Kapsids zusammen, bildet die Strukturen des Kerns und stellt die Verbindung zwischen Kern und Kapsid her. Nach Bindung der Fiberproteine an noch nicht eindeutig identifizierte Rezeptoren der Zelloberfläche [Bai et al. 1994, Mathias et al. 1994] werden die Adenoviren über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Nach der Verschmelzung des Endosoms mit dem Lysosom kommt es zu einem pH-Abfall. Dies aktiviert einen adenoviralen Mechanismus zur Rupturierung der Endolysosomenmembran, was den Übertritt der Viren ins Zytosol ermöglicht. Das Virus bindet nun an Kernporenkomplexe und entläßt seine DNA in den Zellkern. Diese integriert nicht ins Genom, sondern liegt im Zellkern episomal

vor. Die doppelsträngige virale DNA hat eine Länge von 36 kbp und wird an beiden Enden von terminalen Proteinen mit einem MG von 55 000 begrenzt, die miteinander assoziieren, um bei der Lyse des Virus die DNA zu zirkularisieren. Man kann das Genom funktionell in 2 überlappende Regionen, eine frühe und eine späte, einteilen. Die meisten frühen Regionen werden etwa bis zum Einsetzen der viralen Replikation transkribiert. Etwa 7 h nach der Infektion erfolgt das Umschalten von der frühen auf die späte Genexpression. Die 6 frühen Regionen E1A/B, E2A/B, E3 und E4 haben mit Ausnahme der E2A/B-Region eigene Promotoren im Gegensatz zu den späten Regionen L1–5, die alle vom Major-late-Promotor (MLP) reguliert werden. Jede dieser Regionen besteht aus einer Kasette von Genen, die für Polypeptide verwandter Funktionen kodieren. Jede Region wird zuerst als Full-length-RNA transkribiert und dann in Einzel-RNAs gespleißt. In Ad 2, einem der bestuntersuchtesten Serotypen, sind bisher mehr als 30 unterschiedliche mature mRNAs identifiziert worden. Die beiden E1-Promotoren werden mit Hilfe zellulärer Transaktivatoren als erste aktiviert. Die Gene der E1A- und B-Region kodieren für Proteine, die entweder Transaktivatorfunktion für andere virale Promotoren haben, die zelluläre Proteinsynthese hemmen oder mit Zellzyklus- und Apoptoseproteinen assoziieren. Die E2-Regionen kodieren für Proteine, die für die virale Replikation relevant sind. Die verschiedenen Genprodukte der E3-Region sorgen für eine Immuntoleranz des Wirtsorganismus gegenüber der infizierten Zelle. Die E4-Region scheint für ein Abschalten der Genexpression der Wirtszelle verantwortlich zu sein und die Expression von E2-Genen und Genen der späten Regionen zu erhöhen.

Etwa zu dem Zeitpunkt, an dem die Synthese der viralen DNA beginnt, startet auch die Transkription der Gene der späten Region. Diese Gene kodieren für Proteine der Virusstruktur und deren Aufbau.

2.3.3.2.2.2 Rekombinante Adenoviren

Als Gentransfersysteme kamen bisher rekombinante Adenoviren der Serotypen 2 und 5 der Gruppe C zum Einsatz. Die Verpackungskapazität des adenoviralen Genoms beträgt nur 105% der natürlichen Länge. Daher hat man die zur Replikation nicht essentielle E3-Region sowie die E1-Region aus dem Genom deletiert und damit Platz für die Verpackung von 7–8 kbp transgener DNA geschaffen. Da die E1-Region zur Replikation der Viren und damit zu ihrer Herstellung notwendig ist,

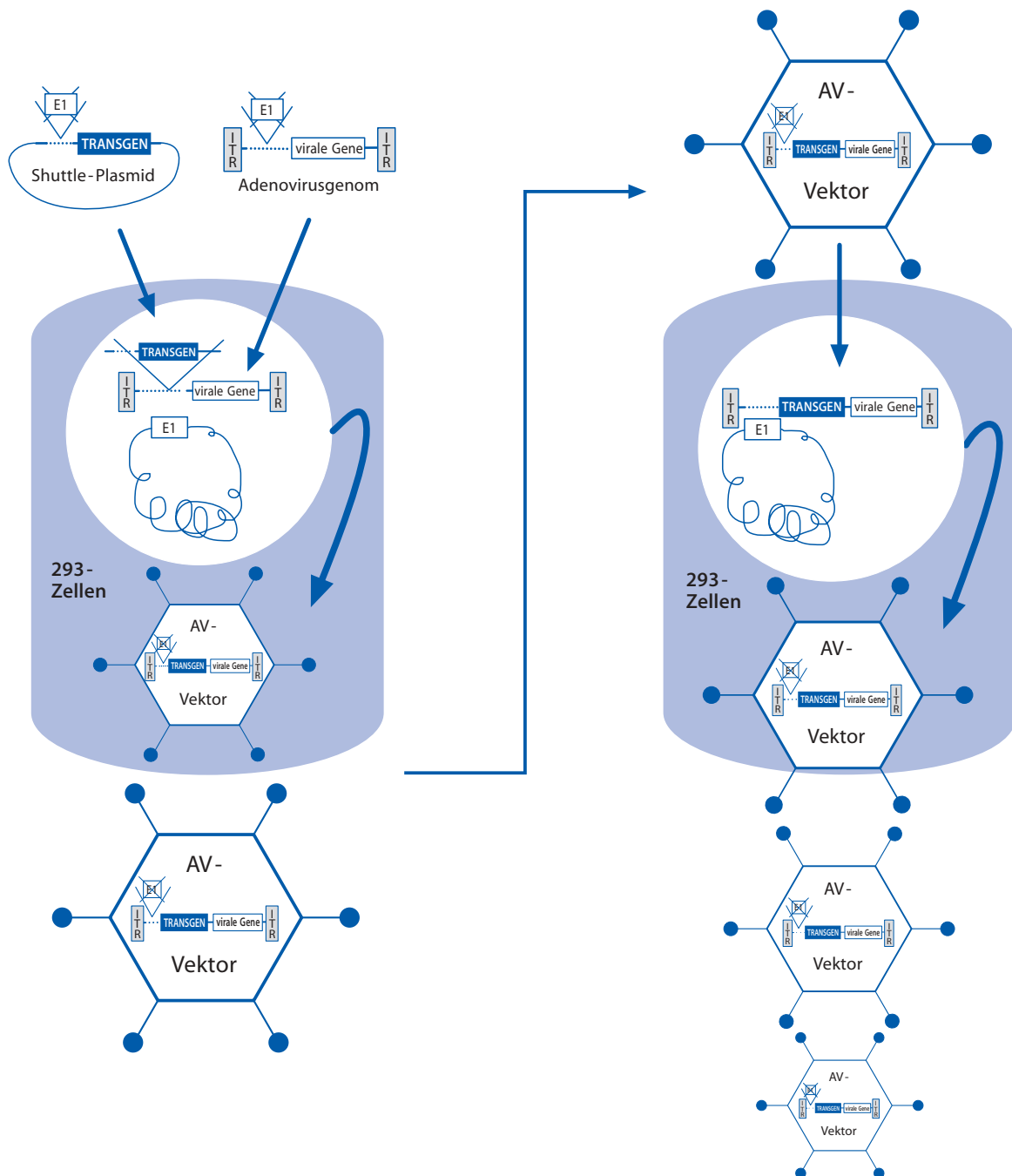


Abb. 2.3.2. Produktion adenoviraler Vektoren. Rekombinante Adenoviren werden durch Kotransfektion eines transgenen Shuttle-Plasmids mit einem genomischen E1-deletierten Adenovirusplasmid auf 293-Zellen und nachfolgende homologe Rekombination der beiden Plasmide gebildet. Die Gene der zur Replikation essentiellen E1-Region werden von der

293-Verpackungszelllinie bereitgestellt. Da die E1-Region nicht mit verpackt wird, sind die entstehenden Viren replikationsdefizient. Die entstandenen Adenoviren werden zur Transduktion von 293-Zellen verwendet, können sich in diesen vermehren und werden schließlich freigesetzt

muß diese Funktion von einer Verpackungszelllinie (in trans) bereitgestellt werden (Abb. 2.3.2). Dazu wurden menschliche embryonale Nierenzellkarzi-

nomzellen mit einem entsprechenden Helferplasmid stabil transfiziert (293-Zellen [Graham et al. 1977]). Da die E1-Region beim Aufbau der Virus-

partikel nicht mit verpackt wird, sind die entstehenden Viren replikationsinkompetent. Ein adenoviraler Vektor wird hergestellt, indem 2 verschiedene Plasmide auf 293-Zellen kotransfiziert werden. Das eine Plasmid (z. B. pJM17) besteht aus einem adenoviralen Genom und einer zusätzlichen Füllsequenz, die dieses Genom zu groß für eine Verpackung macht. Das 2. sog. Shuttle-Plasmid (z. B. pΔE1sp1A) trägt das Transgen, flankiert von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen sind, die das Füllgen im genomischen Plasmid flankieren [McGrory et al. 1988]. In einem bestimmten Prozentsatz von Fällen findet eine homologe Rekombination der beiden Plasmide statt, und es entsteht ein transgenes, um die E1A-Region deletiertes adenovirales Genom. Dieses kann verpackt werden, da man das Transgen kleiner hält als die Füllsequenz des genomischen Plasmids und, nach Austausch der beiden durch homologe Rekombination, das resultierende Virusgenom die Verpackungskapazität nicht übersteigt.

2.3.3.2.2.3 Effizienz und Stabilität des Gentransfers

2.3.3.2.2.3.1 Adenoviraler Titer. Adenoviren sind relativ stabil und lassen sich gut reinigen und konzentrieren. Üblicherweise infiziert man 293-Zellen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI: Verhältnis von Viren zu Zelle) von MOI=10:1. Nach 2–3 Tagen kommt es zur Abrundung und Aufblähung der Zellen, dem zytopathischen Effekt (CPE), der die Bildung intrazellulärer Viren anzeigt. Dann werden die Zellen geerntet, aufgeschossen und die freigesetzten Viren durch Ultrazentrifugation in einem Zäsiumchloridgradienten gereinigt. Die Viruskonzentration in den entstehenden Virusbanden liegt, je nach Virus, zwischen 10^9 und $5 \cdot 10^{11}$ infektiösen Partikeln/ml. Diese Banden können ggf. noch weiter konzentriert werden, so daß der erreichbare Titer, der eine wesentliche Limitierung z. B. bei retroviralen Vektoren ausmacht, bei Adenoviren keine Rolle spielt.

2.3.3.2.2.3.2 In-vitro-Anwendung. Adenoviren infizieren ein weites Spektrum humaner Zellen in vitro, viele davon mit 100%iger Transfereffizienz. Der Gentransfer führt, vermutlich wegen des Vorliegens multipler Kopien, zu einer außerordentlich hohen Expression des Transgens. Bei einer zu hohen MOI muß allerdings mit einer erheblichen Toxizität gerechnet werden, die vermutlich ebenfalls auf die hohe Kopienzahl intrazellulärer Viren mit einer Rekrutierung auch essentieller zellulärer Funktionen für die Virusproduktion (auch replika-

tionsdefizienter Viren, s. unten) zurückzuführen ist. Aufgrund der transienten Natur der adenoviral vermittelten Fremdgenexpression hat man Adenoviren bisher in vitro nur dort eingesetzt, wo Retroviren eine ungenügende Transfereffizienz besitzen oder wo eine besonders hohe Fremdgenexpression erwünscht und eine Langzeitexpression nicht erforderlich ist. Dies trifft z. B. für Makrophagen zu, die sich physiko-chemisch oder retroviral sehr schlecht, aber adenoviral zu 80% transduzieren lassen. Die Ex-vivo-Transduktion von Tumorzellen zur Zytokin-vermittelten Vakzinierung scheint ebenfalls ein aussichtsreiches Verfahren zu werden.

2.3.3.2.2.3.3 In-vivo-Anwendung. Bei der In-vivo-Anwendung liegt augenblicklich die Domäne adenoviraler Vektoren. Besonders für zytotoxische Therapieformen scheint dieser Ansatz wegen des breiten Wirtszellspektrums und der hohen Transfereffizienz bestens geeignet zu sein. Es liegen noch keine systematischen Untersuchungen über den Prozentsatz transduzierter Tumorzellen nach In-vivo-Gentransfer vor, aber in mehreren Studien wurde über komplette Remissionen nach direkter Injektion von Maustumoren bis etwa 5 mm Größe berichtet [Chen et al. 1995, Jin et al. 1995, Kaneko et al. 1995, Liu et al. 1995]. Es bleibt zu klären, ob Tumoren klinisch relevanter Größe mit dieser Methode ähnlich gut behandelbar sind. Mehrere klinische Studien mit Suizid- und Apoptosegenen sind bereits initiiert. Wie bei Retroviren wird bei Adenoviren über replikationskompetente Vektoren nachgedacht.

Immunologische Therapieansätze, die bisher v.a. ex vivo durchgeführt wurden, bedienen sich zunehmend adenoviraler Vektoren zum In-vivo-Gentransfer, der z. B. die technischen Schwierigkeiten und Kosten einer Kultivierung explantierter autologer Tumorzellen umgeht [Haddada et al. 1993]. Eine entsprechende klinische Studie ist angelaufen. Von geringerer Bedeutung für zytotoxische und immunologische Verfahren stellt die nur transiente Expression adenoviral eingebrachter Fremdgene das große Problem von Markierungs- und protektiven Studien und so gut wie allen nicht-krebstherapeutischen Gentherapieansätzen dar. Von Ausnahmen abgesehen, bei denen eine Transgenexpression von über 1 Jahr gesehen wurde, liegt die Dauer der Expression bei erwachsenen Tieren gewöhnlich bei maximal 8 Wochen. Ein Grund für diesen raschen Wirkungsverlust liegt bei proliferierenden Zellen vermutlich in einem Ausdünnen der adenoviralen DNA, die, episomal vorliegend, mit dem Wirtszellgenom nicht

mitrepliziert. Eine Möglichkeit, zu einer stabilen extrachromosomalen Expression zu kommen, ist die Verwendung von Sequenzen viraler Replikationsmechanismen, die eine 1malige Replikation episomaler DNA/Zellzyklus erlauben. Die Verwendung solcher Sequenzen in adenoviralen Vektoren, wird gegenwärtig untersucht [Sandig, pers. Mitteilung]. Aber auch wenig oder nicht-proliferierende Gewebe zeigen einen raschen Expressionsabfall adenoviral transferierter Gene [Barr et al. 1995, Grossman et al. 1994, Li et al. 1993]. Ursache hierfür ist eine zelluläre und humorale Immunantwort auf adenovirale Expressionsprodukte, die zu einer Eliminierung der Wirtszellen führt und auch die Wirksamkeit wiederholter Vektorapplikationen verringert. Eine wiederholte Applikation von Adenoviren könnte nach jüngsten Ergebnissen durch einen sog. Sero-switch gelingen, indem man Adenoviren unterschiedlichen Serotyps verwendet [Mastrangeli et al. 1996]. Außerdem wirken bestimmte adenovirale Gene immunsuppressiv, wie z. B. gp19k. Dieses Protein aus der E3-Region vermindert die Expression der Antigen-präsentierenden MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Wirtszelloberfläche und die zytolytische Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) gegenüber transduzierten Mausfibroblasten. Andere Strategien zur Verminderung der Immunantwort sind die Immunsuppression z. B. durch Cyclosporin, die Antikörpervermittelte Immundepletion von CD4-positiven T-Helferzellen [DeMatteo et al. 1996, Kolls et al. 1996, Sawchuk et al. 1996] oder die selektive Hemmung der Aktivierung bestimmter T-Helferzellen durch Interleukin-12 oder Interferon- γ . Die nebenwirkungsärmere Strategie ist aber vermutlich die Modifikation des Vektors. Schließlich sei noch angemerkt, daß bei der Behandlung von Tumoren die immunstimulatorische Wirkung der Adenoviren auch einen erwünschten zytotoxischen Effekt haben kann.

Die Zytotoxizität viraler Proteine als weiterer Grund für den raschen Abfall adenoviral vermittelter Transgenexpression wird im folgenden Abschnitt behandelt.

2.3.3.2.2.4 Spezifität des Gentransfers und Sicherheitsaspekte

Die Sicherheitsbedenken gegenüber adenoviralen Vektoren sind nicht unerheblich. Immerhin mußte bereits eine Studie mit Gentransfer ins Bronchialepithel wegen des Auftretens eines Pneumonie-ähnlichen Bilds vorzeitig abgebrochen werden [Crystal et al. 1994]. Andererseits sind es nicht zuletzt die Vorteile der Adenoviren, wie hohe Effizienz

des Gentransfers und hohe Expression des Transgens, die zugleich ein Sicherheitsrisiko darstellen. Die Problematik starker Nebenwirkungen bei hoher Effizienz ist auch in der klassischen Pharmakologie gut bekannt. Im Fall der Adenoviren muß versucht werden, die Toxizität eines primär hocheffizienten Systems auf Kosten der Effizienz zu verringern, während bei verschiedenen anderen Vektoren die Effizienz bei primär geringer Toxizität gesteigert werden muß. Beide Ansätze haben sicher ihre Berechtigung.

Die Infektion mit adenoviralen Vektoren der 1. Generation ist ab einer bestimmten MOI zytotoxisch, was durch In-vitro-Experimente eindeutig gezeigt wurde. Auch in vivo tritt z. B. eine erhebliche Hepatotoxizität auf, wenn die (i.v. applizierte) Virusmenge einen gewissen Grenzwert überschreitet [Li et al. 1993]. Grund hierfür ist eine trotz der Deletion der E1-Region vorhandene Restaktivität viraler Gene. Adenovirale Vektoren der 1. Generation enthalten noch etwa 80% ihres Genoms und die Deletion der E1-Region reicht anscheinend nicht aus, um die Expression der anderen viralen Gene völlig zu verhindern. Eine Auslagerung möglichst vieler viraler Gene auf die Verpackungszelllinie, in Analogie zu der retroviralen Methode, oder die Bereitstellung der Gene durch Helferviren könnten die Toxizität des Vektorsystems verringern. (Außerdem könnte die Verpackungskapazität bis auf theoretische 37 kbp erhöht werden.) Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von Helferviren liegt im Abtrennen dieser von den eigentlichen Vektoren. Über eine weitgehende Abtrennung der Helfervirusfraktion von einer Vektorfraktion, die nur das Transgen, das Verpackungssignal und die ITR (inverted terminal repeat, mit dem Startpunkt der Replikation) besitzt, wurde kürzlich berichtet [Fisher et al. 1996a, b]. Allerdings war die Ausbeute an transgenen Vektoren um 3–4 Größenordnungen niedriger als bei der herkömmlichen Vektorherstellung.

Die Anzahl der auf die Verpackungszelllinie auslagerbaren viralen Gene ist vermutlich durch deren Zytotoxizität limitiert. Ein Kandidat für eine Deletion ist die E2A-Region, die für ein komplexes Gen kodiert, dessen N-terminale Domäne die Expression der späten Gene reguliert [Yang et al. 1994]. Kürzlich wurde über E4-deletierte Adenoviren berichtet, die mit einem akzeptablen Titer generiert werden konnten. Die E4-Region bringt die zelluläre Transkription zum Erliegen und aktiviert außerdem die Transkription der E2- und der späten Regionen. Durch Auslagerung der E4-Region auf die 293-Verpackungszelllinie konnten Adenoviren

mit erheblich reduzierter Zytotoxizität generiert werden. Auch die virale DNA-Polymerase konnte stabil auf Verpackungszellen transfiziert werden [Amalfitano et al. 1996].

Ein anderer Sicherheitsfaktor ist die gute Infizierbarkeit sowohl ruhender als auch proliferierender Gewebe durch Adenoviren, was dann ein Problem darstellt, wenn sich Normalgewebe besser infizieren läßt als Zielgewebe. Ein solcher Fall ist in einer Serie eigener Experimente aufgetreten, bei denen nach i.v.-Injektion von Adenoviren bei Nacktratten die Leber um Größenordnungen besser transduzierbar war als der in ihr wachsende Tumor. Selbst bei einer direkten intratumoralen Injektion war die Toxizität des Suizidtherapieansatzes noch erheblich [Brand et al. 1997]. Eine Möglichkeit, dies zu kompensieren, besteht in der gewebespezifischen Expression des Transgens (s. oben). Noch sicherer wäre es, wenn die Viren erst gar nicht zur Infektion von Nicht-Zielgewebe kommen würden. Während bei Retroviren bereits einige Ansätze zur Modifikation der Oberflächeneigenschaften, um spezifisches Targeting zu erreichen, unternommen wurden, beginnt man bei Adenoviren erst, in diese Richtung zu denken [Michael et al. 1995].

Ähnlich wie bei den Retroviren besteht auch bei Adenoviren die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Vektoren. Bei den Vektoren der 1. Generation genügt ein rekombinatorisches Ereignis, um die E1-Region in den Vektor zu bringen. Bei den bisher in klinischen Studien eingesetzten adenoviralen Stammsuspensionen von Vektoren sind aufwendige Testungen auf Kontamination mit replikationskompetenten Rekombinanten nötig. Selbst bei der Applikation einwandfreier Suspensionen besteht im Organismus eine gewisse Gefahr, daß eine Replikation stattfindet, indem die Deletion der E1A-Region durch E1A-ähnliche zelluläre oder von anderen Viren stammende Faktoren in der Wirtszelle kompensiert wird. HeLa-Zervixkarzinomzellen z. B. exprimieren einen E1A-ähnlichen Transkriptionsfaktor. Eine gewisse, wenn auch niedrige Replikationsrate rekombinanter Adenoviren in HeLa-Zellen bei hoher MOI wurde festgestellt. Da rekombinante Adenoviren mit Wildtypadenoviren der gleichen Gruppe rekombinieren können und der Durchseuchungsgrad der Bevölkerung bei über 80% liegt, ist auch hier die Gefahr der Entstehung rekombinanter Wildtypviren gegeben. Eine Auslagerung möglichst vieler adenoviraler Sequenzen auf die Verpackungszelllinie würde auch dieses Sicherheitsproblem verbessern.

2.3.3.2.5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer hohen In-vivo-Transfereffizienz in viele Gewebe und ihrer guten Handhabbarkeit besteht z. Z. größtes Interesse an adenoviralen Vektoren. Dem stehen eine gewisse Toxizität und Immunogenität entgegen. Für den Einsatz von Adenoviren in der Krebsgentherapie muß der Erhöhung der Spezifität von Gentransfer und Genexpression vermutlich die größte Bedeutung beigemessen werden. Aber auch die Probleme im Bereich der Gentherapie nichtmaligner bzw. genetischer Erkrankungen, wie Langzeitexpression und Verringerung der Immunogenität, berühren krebstherapeutische Verfahren, wie Stammzellprotektion oder Mehrfachapplikation der Vektoren.

2.3.3.2.3 Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) vereinigen den Vorteil von Retroviren, die langandauernde Expression des Transgens, und den der Adenoviren, eine gute In-vivo-Transfereffizienz, auf sich. Eine Limitierung besteht in der geringen Verpackungskapazität von nur 4,7 kbp, was die Wahl der Kandidatengene zum Gentransfer einschränkt. Das bisher dringendste Problem, die Vereinfachung der Produktion hochtitriger Viren, scheint lösbar zu sein. Damit besitzen die nicht-toxischen Viren, die in bisher 2 initiierten klinischen Studien verwendet werden, eine gute Chance, in den Kreis der etablierten Vektorsysteme aufgenommen zu werden. Übersichtsartikel zum Thema haben Berns u. Giraud [1995] sowie Flotte u. Carter [1995] veröffentlicht.

2.3.3.2.3.1 Aufbau und Lebenszyklus

Adeno-assoziierte Viren (AAV), die zu den Parvoviren gehören, sind hüllenlose, nur 18–26 nm große Partikel mit einem ikosaedrischen Kapsid. Strukturbildend sind 3 nichtglykosylierte Proteine mit einem MG von 87 000, 73 000 und 62 000 Größe. Gesicherte Daten zum Aufnahmemechanismus der Partikel in die Wirtszellen liegen noch nicht vor. Im Zellkern wird die lineare einzelsträngige AAV-DNA zu einem doppelsträngigen Molekül repliziert und integriert über noch nicht bekannte Mechanismen ins Wirtszellgenom. Die Integration scheint präferentiell in einen auf Chromosom 19 gelegenen Ort (19q13.4) stattzufinden, eine Eigenschaft die bei rekombinanten AAV nicht mehr ausgeprägt vorhanden ist. Die AAV-DNA hat eine Länge von 4680 Nukleotiden mit 2,145 Nukleotide umfassenden ITRs. Zur Replikation in der Zielzelle benötigt das AAV Fremdproteine, die gewöhnlich

von Helferviren gestellt werden. Es ist aber auch schon die Helfervirus-unabhängige Replikation von AAV beschrieben worden, welche durch Kanzerogene und chemische Agenzien, die mit Zellzyklusfunktionen interagieren, induziert wird. Die am besten charakterisierten Helfervirionen sind die der Adenoviren. Als Helferviren können aber auch Herpesviren, Epstein-Barr-Viren und SV40-Viren fungieren. AAV scheinen die adenoviralen E1A-51000-, E1B-55000-, E4-35000- und E2A-Bindungsproteine zu benötigen. Drei Promotoren sind unter Mithilfe der oben angeführten Proteine verantwortlich für die Transkription z. B. des gut studierten AAV2-Genoms, die in 3 überlappenden Regionen mit der Entstehung von insgesamt 7 primären Transkripten erfolgt. Die wesentlichen kodierenden Regionen sind rep und cap, wobei rep für transkriptions- und replikationsrelevante Proteine und cap für Strukturproteine kodiert.

2.3.3.2.3.2 Rekombinante AAV

Schon Wildtyp-AAV erinnern an Gentherapievektoren insoweit, als sie ohne Helfervirus replikationsinkompetent sind. Allerdings wurde durch das wohl evolutionäre Ereignis des Verlusts essentieller viraler Sequenzen kein Platz für die Insertion neuer Sequenzen geschaffen. Um Transgene inserieren zu können, hat man daher auch den Großteil der restlichen AAV-Sequenzen, v. a. rep und cap, ausgelagert (Abb. 2.3.3). Diese werden von einem ITR-losen Plasmid bereitgestellt, welches mit dem transgenen Plasmid auf die Verpackungszelllinie (293) transfiziert wird. Auf dem Vektor verbleiben nur noch die ITR, die für die Expression und die Verpackung verantwortlich sind. Dadurch wird eine Verpackungskapazität von 4,7 kbp erreicht. Vor der Kotretransfektion der Plasmide werden die Verpackungszellen mit Adenoviren infiziert, die die notwendigen Initialfaktoren bereitstellen. Nach dem Auftreten des CPE (72 h) werden die Zellen geerntet, lysiert und die Viren gereinigt (s. unten).

2.3.3.2.3.3 Effizienz des Gentransfers

2.3.3.2.3.3.1 In-vitro-Anwendung. AAV infizieren wie Adenoviren ein breites Spektrum von Zellen, darunter Affennieren- (COS), Zervixkarzinom- (He-La), verschiedene Leukämie-, Bronchialepithel-, lymphatische, maligne epidermale, Bindegewebs- und primäre hämatopoetische Zellen. Die Transduktionseffizienz liegt im Mittel etwas niedriger als bei Adenoviren, aber Transfereffizienzen von 20–40% in Kolonie-bildenden hämatopoetische Stammzellen [Miller et al. 1994] und von 75% in

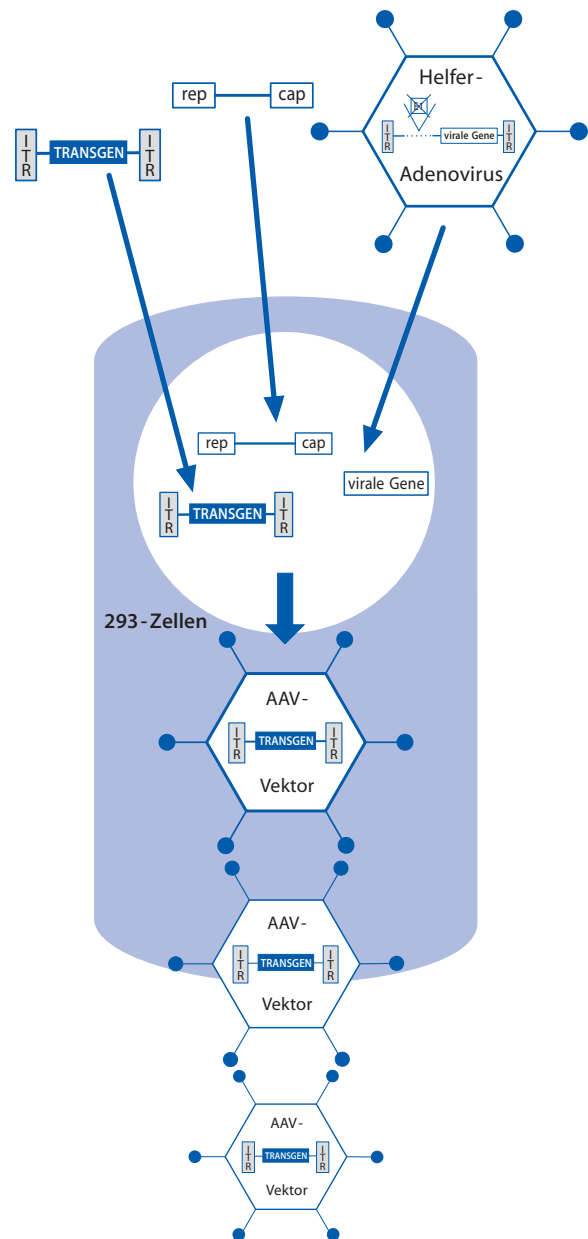


Abb. 2.3.3. Produktion von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren. Initial werden Verpackungszellen mit replikationsdefizienten Adenoviren transduziert, die wichtige Gene zur AAV-Produktion bereitstellen. Dann werden die AAV-Gene rep/cap und das Transgen mit den AAV-ITR, die die Verpackungssequenz beinhalten, kotretransfiziert. Die entstehenden Viren tragen nur die ITR und das Transgen und sind replikationsdefizient

humane Nasenpolypenzellen [Flotte et al. 1993] wurden beschrieben. Hierbei wird mit nicht-toxischen MOI bis 1000 gearbeitet. AAV scheinen präferentiell S-Phase-Zellen zu transduzieren [Russell et al. 1994], aber eine Transduktion während aller

Zellzyklusstadien ist möglich. Da AAV außerdem ins Genom integrieren oder zumindest stabil episomal vorliegen, kann mit einer Langzeitexpression des Transgens gerechnet werden. Diese ist für hämatopoetische Zellen noch nicht systematisch untersucht worden (bisher 3 Wochen), aber im positiven Fall wären AAV-Vektoren aufgrund der hohen Transfereffizienz beim Gentransfer für Markierungs- und protektive Studien sowie für den nicht-krebstherapeutischen Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen mit den Retroviren zu vergleichen [Flotte u. Carter 1995].

2.3.3.2.3.3.2 In-vivo-Anwendung. In vivo ist die Langzeitexpression (> 6 Monate) in mehreren Experimenten gezeigt worden [Flotte u. Carter 1995, Flotte et al. 1993, Kaplitt et al. 1994]. Eine klinische Studie zur Behandlung der Mukoviszidose durch den AAV-vermittelten Gentransfer des defekten Gens in Bronchialepithelien ist initiiert. Der Einsatz von AAV für zytotoxische Krebsgentherapien wird von einer Verbesserung der erreichbaren Titer abhängen. Obwohl sich AAV gut durch Ultrazentrifugation anreichern lassen, sind die erreichbaren Titer im Vergleich zu Adenoviren sehr niedrig. Typische Titer liegen bei 10^6 infektiösen Einheiten/ml [Kotin 1994], was im wesentlichen auf eine begrenzte Gesamtausbeute zurückzuführen ist. Grund hierfür ist die Notwendigkeit der Transfektion von Vektor- und Helferplasmid mit der bekannten niedrigen Rate des Gentransfers. Um dieses Problem zu umgehen, wurden verschiedene Modifikationen des Verpackungssystems getestet: Eine 50fache Erhöhung der Virusausbeute im Vergleich zu konventionellen Verfahren wurde durch die Expression des rep-Gens von der HIV-LTR in Kombination mit dem stabilen Einbringen des Vektorplasmids auf die Zielzellen erreicht [Flotte et al. 1995]. Eine andere Möglichkeit besteht im Einbringen der Vektorsequenzen auf das Helferadenovirus, womit dessen hohe Transduktionskapazität genutzt wird. Bisher konnte noch keine Titererhöhung erreicht werden [Thrasher et al. 1995], aber dies wäre dann zu erwarten, wenn zusätzlich auch die rep-cap-Sequenzen z. B. auf ein paralleles Adenovirus ausgelagert werden könnten. Unter verschiedenen anderen Versuchen sei ein kürzlich publizierter Ansatz hervorgehoben, bei dem es gelang, ohne die bisher beschriebenen Toxizitätsprobleme HeLa-Zellen stabil mit einem AAV-Vektor-rep-cap-neo^R-Gen zu transfizieren und zu selektieren. Die Verwendung dieser Zellpopulation führte zu Virusausbeuten, die nur noch 1–2 Zehnerpotenzen unter den adenoviralen Ausbeuten liegen [Clark et al. 1995].

Ein Vorteil der AAV gegenüber den Adenoviren besteht in ihrer geringeren Größe, was eine bessere Penetrationsfähigkeit in solide Tumoren bedingen könnte. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen Immunogenität der (abgesehen vom Transgen) quasi für keine Proteine kodierenden AAV, was ihre wiederholte Applikation und damit eine Erhöhung der Transfereffizienz ermöglichen könnte.

2.3.3.2.3.4 Spezifität des Gentransfers

Die gute Eignung von AAV zur gewebespezifischen Expression von Transgenen ist im Kapitel 2.3.2.2.2.1 „Gewebespezifische Expression in viralen Vektoren“ beschrieben. Publiizierte Ansätze für ein spezifisches Rezeptor-Targeting des Vektors bestehen unseres Wissens nach z. Z. noch nicht.

2.3.3.2.3.5 Sicherheitsaspekte

AAV gelten als apathogen für den Menschen und sind von dieser Seite her als attraktive Vektoren anzusehen. Die Relevanz einer etwaigen Integration des Virus ins Genom ist noch nicht sicher geklärt. Während Wildtyp-AAV gezielt an einer vermutlich ungefährlichen Stelle ins Genom integrieren, geht diese Eigenschaft, die wahrscheinlich rep-assoziert ist [Kotin 1994], den rep-negativen Rekombinanten verloren. Damit besteht die Möglichkeit der Mutagenese bei einer zufälligen Integration ins Genom. Die Gefahr einer Aktivierung von Onkogenen (nicht aber einer Inaktivierung von Suppressorgenen) ist allerdings als geringer einzuschätzen als bei den Retroviren, da beide AAV-ITR-Promotoren auf das virale Genom und nicht die zelluläre DNA hin orientiert sind [Kotin 1994]. Schließlich ist noch offen, in welchem Ausmaß AAV tatsächlich ins Genom integrieren und nicht nur in einem stabilen episomalen Zustand vorliegen [Flotte u. Carter 1995].

Die Gefahr der Entstehung von Wildtypviren durch eine Rekombination von kotransfizierten Vektor- und Helferplasmiden läßt sich durch eine Minimierung der Homologie von Vektor- und Helferplasmid so weit verringern, daß Wildtyp-freie Suspensionen generiert werden können. Durch neuere Methoden läßt sich diese Gefahr weiter minimieren [Thrasher et al. 1995]. Weiterhin muß eine Kontamination mit Helferadenoviren verhindert werden, die per se toxisch sein können (s. oben). Dies wird durch eine Hitzebehandlung der hitzebeständigen AAV (60 °C) und/oder Trennung im Zäsiumchloridgradienten erreicht. Bestehen bleibt ein Restrisiko, daß integrierte Wildtyp-AAV prinzipiell in vivo durch eine Infektion mit Helferviren aktiviert werden könnten.

2.3.3.2.4 Herpes-simplex-Viren

Herpes-simplex-Viren beeindrucken durch ihre hohe Verpackungskapazität und ein großes Potential noch ungenutzter Möglichkeiten der Modifikation des Vektordesigns. Hinsichtlich ihrer Transfereffizienz und Stabilität der Expression zeichnen sie sich in ihrem jetzigen Entwicklungsstand allerdings noch nicht vor anderen Vektoren aus. Der wesentliche Nachteil ist außerdem z. Z. noch die Toxizität. Die wohl komplexesten unter den derzeit verwendeten viralen Gentransfersystemen sind sicher noch erheblich entwicklungsfähig und -bedürftig. Eine Übersichtsarbeit zu diesem Thema wurde von Glorioso et al. [1995a, b] veröffentlicht.

2.3.3.2.4.1 Aufbau und Lebenszyklus

Das Herpes-simplex-Virus ist ein etwa 180 nm großes, umhülltes DNA-Virus mit einem ikosaedralen Kapsid. Zwischen Kapsid und Hülle liegt eine dünne Proteinschicht, das Tegument. Das Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von 152 kbp Länge. HSV ist ein bekannter humanpathogener Erreger. Eintrittsorte sind üblicherweise die Epithelien von Haut oder Schleimhaut. Über Glykoproteine der Hülle bindet das Virus an zelluläre Rezeptoren. Hierbei können mehrere Glykoproteine beteiligt sein, die neben einer Modulation der Immunantwort auch die Bindung an spezifische Zelltypen vermitteln. Die virale Hülle verschmilzt mit der Plasmamembran und die freigesetzten Kapside werden, vermutlich unter Beteiligung des Zytoskeletts, zur Kernmembran transportiert, wo die virale DNA durch die Kernporen in den Kern gelangt. Hier initiiert das Virus die synthetische Phase eines replikativen Zyklus. Dies beginnt mit der Aktivität 2er Tegumentproteine deren eines, VP16, die virale Transkription verbessert und deren anderes, VHS, die Wirtszellreplikation hemmt. Nun erfolgt die Expression aller bekannten Gene in einer zeitlichen Kaskade von 3 Phasen: Die Immediate-early-Gene (IE-Gene) kodieren für Proteine, die im wesentlichen für die Initiation und Kontrolle der Expression der frühen und späten Gene relevant sind. Die frühen Gene kodieren für Enzyme der Replikation und der Wirtszellmodifikation. Die DNA-Synthese erfolgt nach dem sog. Rolling-circle-Mechanismus, der miteinander verbundene, identische Genomeinheiten (Konkatamere) erzeugt. Die späten Gene kodieren für virale Strukturproteine. Nach der Expression der späten Gene wird das Kapsid zusammengesetzt, die virale DNA geschnitten, über die Erkennung von Verpackungssequenzen verpackt

und die Tegumentproteine werden integriert. Durch die Umhüllung mit einem Teil der Kernmembran erhält das Virus seine Hülle und wird dann, vermutlich unter Beteiligung des Golgi-Apparats und einen Membranaustausch, freigesetzt. Nach der Lyse der initial infizierten Epithelzellen erfolgen der Eintritt der Viren in die Enden sensibler Neuronen und der retrograde Transport in den Körper der Nervenzelle. In einem Teil der betroffenen Neuronen kommt es zur produktiven Infektion. In einigen Neuronen wird aber nur eine latente Infektion etabliert, die zu einem lebenslangen Persistieren der Viren ohne Beeinträchtigung der Zellfunktion führen kann. Eine Reaktivierung der produktiven (lytischen) Infektion ist möglich. Während der Latenzzeit liegt das Virus episomal vor. Es ist nicht ganz klar, wie es zum Status der latenten Infektion kommt, aber möglicherweise handelt es sich um eine Alternative zur lytischen Infektion, falls diese, wegen viraler Mutationen oder fehlender Voraussetzungen in der Zielzelle, nicht zustandekommt. Während der Latenzzeit sind die viralen lytischen Gene, die den replikativen Zyklus kennzeichnen, abgeschaltet und nur das Latenz-assoziierte Transkript (LAT) ist aktiv. Dieses wiederum ist für die Etablierung einer latenten Infektion nicht unbedingt notwendig, was bedeutet, daß der LAT-Promotor zur Expression von Transgenen genutzt werden könnte.

2.3.3.2.4.2 Rekombinante Herpes-simplex-Viren

Unter Zellkulturbedingungen auf hochpermissiven Zellen ist ungefähr die Hälfte der etwa 70 viralen Strukturgene zur Replikation nicht notwendig. Diese akzessorischen Gene sind aber für eine optimale lytische Replikation und einen optimalen Lebenszyklus in vivo wichtig. Durch entsprechende Deletionen kann man Platz für Transgene schaffen (bis zu 50 kbp) und zugleich die Virulenz der Viren bzw. ihre Replikationsfähigkeit in bestimmten Zielzellen vermindern. Durch eine entsprechende Wahl der Deletionen ist es denkbar, replikationskompetente Viren zu generieren, die aber vollkommen apathogen sind.

Da auch viele HSV-Genprodukte zur Replikation notwendig sind, kann man durch entsprechende Deletionen auch replikationsinkompetente Viren generieren. Die Replikation der Viren wird gewährleistet, indem die deletierten Gene in die Verpackungszelllinie transfiziert und die essentiellen Genprodukte dann von dieser bereitgestellt werden (Abb. 2.3.4).

Eine weitere routinemäßig angewandte Herstellung rekombinanter HSV-Vektoren besteht in der

Auslagerung sämtlicher HSV-Gene aus dem transgenen Vektor, was eine theoretisch mögliche Kapazität von 150 kbp erlauben würde. Die viralen Gene können aus Toxizitätsgründen aber nicht alle von der Verpackungszelllinie bereitgestellt werden. Daher bedient man sich eines replikationsinkompetenten (s. oben) HSV-Virus mit ansonsten vollständigem Genom (Helfervirus). Praktisch geht man so vor, daß zunächst eine Verpackungszelllinie, die z.B. IE-3 bereitstellt (z. B. RR1-Zellen), mit dem transgenen Plasmid transfiziert wird. Durch Verwendung des HSV-Origin of replication ist eine Replikation der Vektor-DNA gewährleistet. Ein ebenfalls inseriertes Verpackungssignal führt zur Verpackung des als Amplikon bezeichneten Vektors in die vom Helferplasmid bereitgestellten Viruspartikel. Daneben wird aber auch das Helferplasmid verpackt, so daß eine Mischpopulation rekombinanter Viren freigesetzt wird. Während der folgenden Passagen auf den Verpackungszellen scheint sich das Verhältnis von Vektor zu Helfervirus, vermutlich wegen des besseren Wachstumsverhaltens der DNA, zugunsten des transgenen Vektors zu verschieben [Geller et al. 1990].

2.3.3.2.4.3 Effizienz des Gentransfers

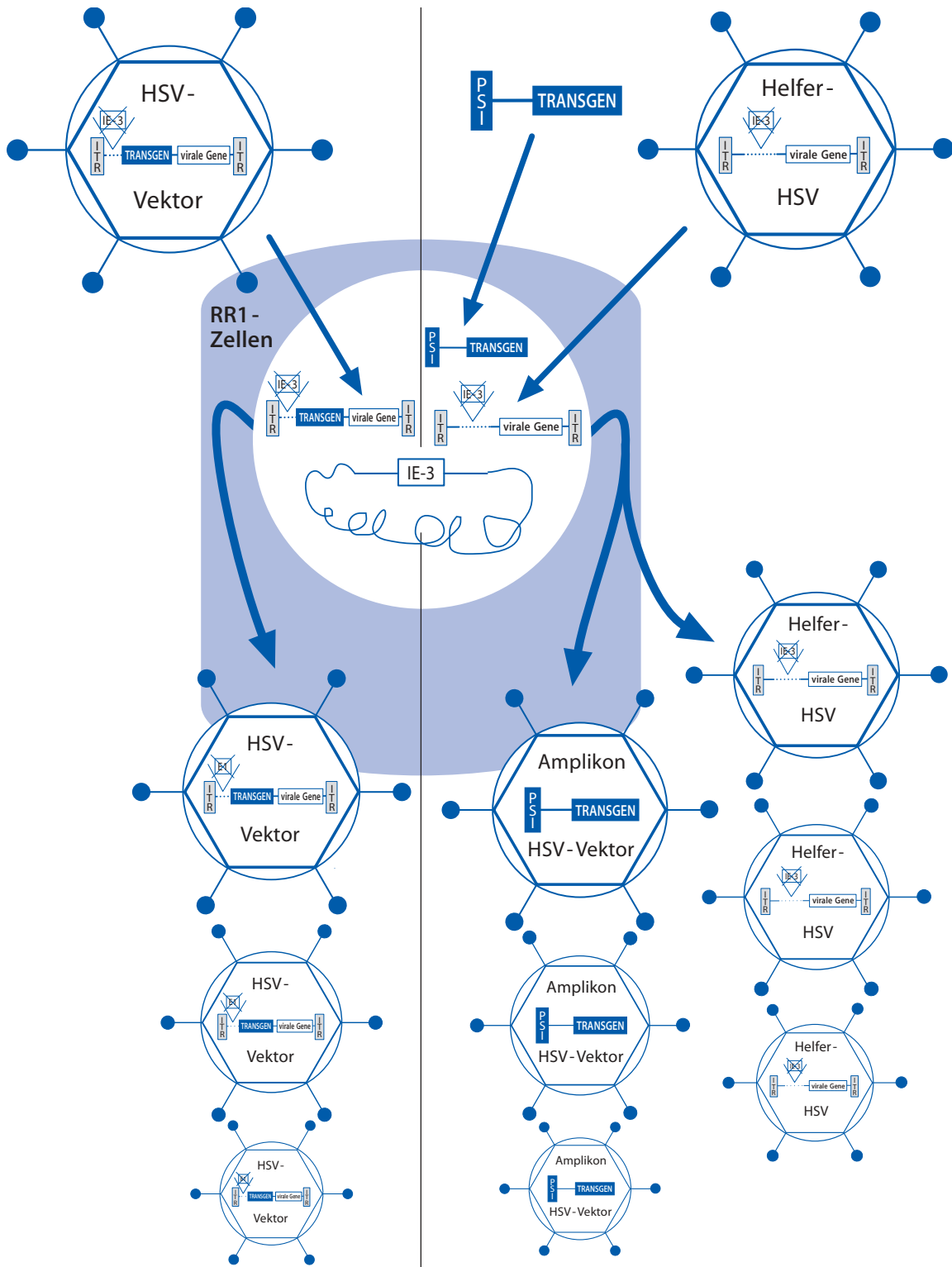
2.3.3.2.4.3.1 Titer. Die in der Literatur beschriebenen Titer liegen bei 1 fach deletierten HSV-Vektoren zwischen 10^8 und 10^9 infektiösen Partikeln/ml [Huard et al. 1995], bei doppelt deletierten 1 Titerstufe niedriger [Wang et al. 1995b], aber auch Titer von 10^{10} sind beschrieben worden. Bei Amplikonvektoren sind infektiöse Titer von $2 \cdot 10^8$ [Wood et al. 1994], $4 \cdot 10^7$ [Pakzaban et al. 1994] und $2 \cdot 10^7$ [Geller et al. 1990] erreicht worden. HSV-Vektoren sind durch Ultrazentrifugation konzentrierbar [Geschwind et al. 1996].

2.3.3.2.4.3.2 In-vivo-Anwendung. HSV haben einen sehr weiten Zelltropismus und scheinen, unabhängig vom proliferativen Status, fast alle menschlichen Zellen zu infizieren. Wenn auch Experimente mit Zellen neuronalen Ursprungs im Vordergrund stehen, sind z. B. Infektionen von Muskel-, Gliom-, Leber- und Endothelzellen zu therapeutischen Zwecken beschrieben worden. Üblicherweise werden MOI von 0,1–10 eingesetzt, was etwa 2 Zehnerpotenzen unter den adenoviralen MOI liegt. Allerdings scheinen auch sowohl die Transfereffizienz als auch die Toxizität von HSV mehrfach höher zu liegen als bei Adenoviren [Huard et al. 1995]. Eine besonders gute Transduktionseffizienz im Vergleich mit retroviralen VPC und Adenovi-

ren wurde bei der Injektion von 9L-Gliosarkomhirntumoren bei Ratten festgestellt [Boviatsis et al. 1994b]. Die Zytotoxizität selbst kann, wenn sie auf die Tumorzellen beschränkt bleibt, auch als Effizienzvorteil angesehen werden. In eine solche Richtung argumentiert ein Vergleich der Toxizität von unterschiedlich deletierten HSV-Vektoren für 9L-Gliosarkomzellen [Boviatsis et al. 1994a]. Ein signifikanter Gentransfer in disseminierte Metastasen im ZNS konnte durch die intrathekale Applikation replikationskompetenter HSV erreicht werden, die wegen eines defekten Ribonukleotidreduktasegens vorzugsweise in sich teilenden Zellen replizieren [Kramm et al. 1996]. Allerdings wurden auch eine nennenswerte Transduktion von Normalgewebe und eine erhebliche Toxizität mit Ataxie und Apathie aller behandelten Tiere festgestellt. Die Kombination der natürlichen Toxizität mit zytotoxischen Genen unter exakter gewebespezifischer Kontrolle, die, angesichts der hohen Verpackungskapazität des HSV-Genoms, gut möglich erscheint, könnte eine ernstzunehmende Alternative für die zytotoxische Gentherapie solider Tumoren werden.

2.3.3.2.4.3.3 Expressionsdauer. Weniger weit entwickelt ist ein Ex-vivo-Einsatz von HSV z. B. für Markerstudien oder hämatopoetische Stammzellen. In proliferationsaktiven Zellen muß mit einem Ausdünnen des Transgens gerechnet werden, da das episomal vorliegende rekombinante Virus nicht zur autonomen Replikation befähigt ist. Ähnlich wie bei Adenoviren könnte hier das Einführen eines Replikationsmechanismus eine wichtige Verbesserung sein. Wie bei den Adenoviren konnte bisher noch keine Langzeitexpression nachgewiesen werden. Als Grund hierfür wird u. a. die Zytotoxizität viraler Proteine diskutiert (s. unten). Eine attraktive, evtl. gentherapeutisch nutzbare Eigenschaft ist die Fähigkeit der Viren zur Etablierung eines latenten Stadiums der Persistenz.

Einen bedeutenden und auch HSV-typischen Anteil an der Dauer der Expression von Transgenen in HSV-Vektoren hat die Wahl eines geeigneten Promotors. Eine transiente Expression konnte mit den meisten der bisher getesteten Promotoren erreicht werden, darunter HSV-Promotoren des lytischen Zyklus, der RSV-LTR und der HCMV-IE-Promotor. Sowohl bei Amplikonvektoren als auch bei defizienten HSV-Vektoren stellt die Langzeitexpression mit diesen Promotoren jedoch ein Problem dar. Als Kandidat für eine Langzeitexpression erscheint der LAT-Promotor (s. oben) besonders geeignet, der natürlicherweise während einer



latenten Infektion auf unbestimmte Zeit aktiv ist. So bewirkten CMV- und HSV-IE4/5-Promotoren im murinen und im Rattenmodell nur eine transiente Expression, während sich die Reportergenaktivität unter dem HSV-LAT-Promotor für 4 Monate nachweisen ließ. Entsprechend ließ sich die Faktor-IX-Expression in der murinen Leber unter dem HSV-LAT-Promotor für 3–5 Wochen nachweisen, während es unter dem CMV-Promotor wieder nur zu einer transienten Expression kam. Ansätze zur weiteren Optimierung des homologen HSV-LAT-Promotors bestehen. Es scheint weiterhin, als ob der Insertionsort heterologer Promotoren im HSV-Genom und die Nähe zum LAT-Promotor eine besondere Bedeutung für die Aktivitätserhaltung hätten. Dies wird zu berücksichtigen sein, wenn die gewebespezifische Langzeitexpression von Transgenen erwünscht ist, was die Integration heterologer Promotoren nötig macht. Aber auch dort, wo eine transiente gewebespezifische Expression ausreicht, wie bei der zytotoxischen Therapie, bieten HSV-Vektoren mit ihrem komplexen Genom und ihrer hohen Verpackungskapazität besondere Verhältnisse und Möglichkeiten. Prinzipiell ist auch eine induzierbare Expressionsregulation in einem modifizierten Amplikonvektor möglich, wie z. B. die Glukokortikoid-induzierbare Genexpression [Lu u. Federoff 1995].

2.3.3.2.4.4 Sicherheitsaspekte

Eines der Hauptprobleme von HSV-Vektoren ist die Zytotoxizität, die die Langzeitexpression in Zielgeweben verhindern kann und bei der Transduktion von Normalgewebe Sicherheitsbedenken aufwirft. Man versucht, dem entgegenzuwirken, indem man bei Deletionsvektoren die virale Genexpression in einem möglichst frühen Stadium blockiert.

Von Amplikonvektoren dürfte keine Zytotoxizität zu erwarten sein, wenn es gelingt, die Helfervirusfraktion wirkungsvoll abzutrennen. Dies war

bisher noch nicht möglich, da die verpackte DNA immer 152 kbp lang ist und eine Unterscheidung der Viren mit üblichen physiologischen Methoden nicht gelingt.

Weitere Möglichkeiten der Toxizitätsbegrenzung bestehen in der Applikation von Interferon- α [Johnson et al. 1992] oder Nervenwachstumsfaktor [Wang et al. 1995b] bzw. der Konstruktion von Viren, die Interferon- α [Mester et al. 1995], Nervenwachstumsfaktoren oder bcl-2-Onkogen-Anti-Apoptosegen [Wang et al. 1995b] produzieren.

HSV-Vektor-Suspensionen sind z. Z. noch regelmäßig mit replikationskompetenten Viren kontaminiert. Es gibt In-vivo- und In-vitro-Testsysteme für replikationskompetente Viren, aber noch keine sicheren Methoden, die Entstehung der Rekombinanten zu verhindern. Aufgrund der hohen Rekombinationsrate in vivo bestehen weiterhin erhebliche Sicherheitsbedenken v. a. hinsichtlich der Entstehung einer Enzephalitis bei einer Rekombination der Vektoren mit Wildtypviren im produktiven oder auch latenten Status.

2.3.3.2.5 Vakziniaviren

Vakziniaviren gelten als relativ sicher und haben eine hohe Verpackungskapazität. Im Rahmen einer breitflächigeren Testung der erreichbaren Transfer-effizienz sollte die Bedeutung dieser Vektoren für die transiente In-vivo-Genexpression in nächster Zeit zunehmen.

2.3.3.2.5.1 Aufbau und Lebenszyklus

Vakziniaviren gehören zur Familie der Pockenviren. Sie sind die am besten studierten unter den Pockenviren, da sie seit dem Beginn des letzten Jahrhunderts routinemäßig zur Pockenschutzimpfung eingesetzt wurden. Nach 200jähriger Geschichte in Mensch und Tier ist man sich über die letztliche Herkunft des Vakziniavirus nicht sicher, aber eine Verwandtschaft mit Variola (dem Pockenerreger), Kuhpocken und anderen Mitgliedern der Pockenfamilie ist sehr wahrscheinlich.

Infektiöse Viren haben eine ziegelsteinartige Form und einen Durchmesser von 300–400 nm, was sie zu den größten Viren des Tierreichs macht [Moss 1991]. Eine Lipoproteinhülle umgibt die komplexe Core-Struktur, die eine lineare doppelsträngige 200 kbp lange DNA sowie verschiedene virale Proteine beinhaltet. Nach Bindung des Virus an die Zellmembran und Membranfusion wird das Core in das Zytoplasma abgegeben. Hier erfolgen die Replikation der viralen DNA und die Synthese viraler Bestandteile. Dazu werden weitgehend vi-

←
Abb. 2.3.4. Zwei herkömmliche Möglichkeiten der HSV-Vektor-Produktion. *Linker Teil* Die Verpackungszelllinie stellt zur Replikation von HSV notwendige virale Sequenzen, wie die IE-3-Region. Transgen-tragende, IE-3-deletierte, rekombinante HSV können so in der Zelle replizieren. Da die IE-3-Region in die entstehenden Viruspartikel nicht verpackt wird, sind die entstehenden Viren replikationsdefizient. *Rechter Teil* Die Transfektion der Zellen erfolgt durch ein Transgen-tragendes Plasmid, welches über die Verpackungssequenz Psi verpackt werden kann. Die IE-3-Gene werden durch die Verpackungszelle, die restlichen Gene durch ein Helfervirus bereitgestellt. Das Transgen wird in mehreren hintereinander geschalteten Kopien als sog. Amplikon verpackt. Daneben entstehen replikationsdefiziente Helfer-HSV

ruseigene, mitgebrachte Proteine verwendet. Entsprechend kommt es nicht zur Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom. Nach der Synthese der späten Strukturproteine werden Vorläuferviruspartikel gebildet, von denen ein Teil unter Mitnahme von Golgi-Membranen freigesetzt wird.

2.3.3.2.5.2 Rekombinante Vakziniaviren

Rekombinante Vakziniaviren werden nach einem ähnlichen Prinzip wie Adenoviren hergestellt. Das mit einer Häufigkeit von etwa 0,1% stattfindende Ereignis der homologen Rekombination zwischen dem Transferplasmid und dem viralen Genom führt zur Entstehung rekombinanter Viren, die ein Transgen transferieren können. Allerdings ist im Unterschied zu Adenoviren die Verwendung ganzer Viruspartikel anstelle der genomischen DNA notwendig, da ohne die mitgebrachten Enzyme und Faktoren des Cores keine infektiösen Partikel entstehen [Mackett et al. 1982, Qin u. Chatterjee 1996]. Es können mindestens 25 kbp transgener Sequenzen in das virale Genom inseriert werden, ohne daß Deletionen nötig sind. Allerdings muß mit Intron-freier cDNA gearbeitet werden, da kein Spleißen möglich zu sein scheint. Üblicherweise ist die Selektion rekombinanter Plaques dadurch möglich, daß das Transgen in das virale Thymidinkinasegen inseriert, welches als negativer Selektionsmarker fungiert und dessen Inaktivierung eine Selektion mit dem entsprechenden Selektionsmedium erlaubt [Mackett et al. 1982, O'Neil et al. 1993].

2.3.3.2.5.3 Effizienz und Sicherheit

Vakziniaviren infizieren eine Vielzahl von Zelllinien mit hoher Transfereffizienz. Als Tumorstoffe sind Vakziniavektoren bereits mehrfach ex vivo eingesetzt worden, da hier keine Langzeitexpression notwendig ist. Die hohe eigene Immunogenität des Virus wirkt sich vermutlich verstärkend auf eine Antitumorimmunität aus. Zwei klinische Studien, bei denen Vakziniaviren, die tumorspezifische Antigene exprimieren, eingesetzt werden, wurden kürzlich initiiert. Ein früher klinischer Einsatz erfolgte bereits vor mehreren Jahren zur Behandlung der HIV-Infektion. Die behandelten Patienten zeigten keine Nebenwirkungen [Cooney et al. 1991]. Routinemäßig wird heute mit Viren gearbeitet, die aufgrund verschiedener Deletionen im Genom die Fähigkeit verloren haben, Säugerzellen produktiv zu infizieren, ein Transgen aber exprimieren können. Ein solches Virus ist der durch multiple Passagen in Hühnerembryofibroblasten entstandene MVA-Stamm [Sutter u. Moss

1992, Sutter u. Moss 1995]. Alternativ kann man auch andere Mitglieder der Pockenvirenfamilie mit restringiertem Wirtsspektrum, wie z. B. Vogelpockenviren, einsetzen [Baxby u. Paoletti 1992, Roth et al. 1996, Somogyi et al. 1993, Wang et al. 1995a]. Diese Viren infizieren im günstigen Fall Säugetierzellen und bringen das Transgen zur Expression, ohne sich in ihnen vermehren zu können.

Vakziniavektoren könnten aufgrund ihrer hohen Verpackungskapazität dort, wo eine hohe Spezifität verlangt wird und längere Promotorsequenzen nötig sind, wie bei zytotoxischen Therapieformen, Bedeutung erlangen. Allerdings bleibt abzuwarten, ob die relativ großen Partikel eine gute Penetrationsfähigkeit in solide Tumoren besitzen und wie gut die In-vivo-Transfereffizienz in Tumorzellen ist.

2.3.3.2.6 Andere Viren

Eine Vielzahl noch nicht genannter Viren wurde bisher auf die Eignung als Gentransfervehikel überprüft. Es wird sicher das ein oder andere, im Augenblick noch unbekannte virale Transfersystem aufgrund entscheidender Verbesserungen plötzlich in den Mittelpunkt des Interesses gerückt werden, um dann von einer breiten wissenschaftlichen Gemeinschaft getestet werden zu können.

Das zur Familie der Herpesviren gehörende Epstein-Barr-Virus (EBV) kann ähnlich wie das Herpes-simplex-Virus (s. oben), von den meisten seiner kodierenden Sequenzen befreit, als Minivirus eingesetzt werden [Bloss u. Sugden 1994]. Damit kann das transformierende Potential des Virus vermindert werden. EBV hat einen natürlichen Tropismus für B-Lymphozyten und wurde bereits in Vakzinierungsstudien eingesetzt [Vos 1994]. Eine Ex-vivo-Transfereffizienz von 45% wurde beschrieben [Banerjee et al. 1995]. Es wäre interessant, zu testen, ob eine ähnlich hohe In-vivo-Effizienz für zirkulierende B-Zell-Leukämie- oder B-Zell-Lymphom-Zellen erreichbar ist, was EBV zu einem guten Kandidaten für zytotoxische Therapien machen würde. Die viralen Elemente Origin of replication (EBV-ORI) und Trans-acting-nuclear-Protein (EBNA-1) bedingen eine episomale Persistenz des Virus und eine Replikation des Genoms analog zur Zellteilung. Dies ermöglicht die Herstellung stabil transduzierter Zellen, sofern EBNA-1, das sich nicht auf den gängigen Minivektoren befindet, von natürlich infizierten Zellen bereitgestellt oder kotransduziert wird. Der wesentliche Nachteil von EBV-Vektoren besteht z. Z. noch

in der Ungewissheit über die Häufigkeit rekombinatorischer Ereignisse, die potentiell zu einem transformierenden Virus führen könnten.

Ein anderes Virus mit einem natürlichen hohen Wirtzelltrophismus ist das Baculovirus. Die großen, mit einer Hülle versehenen Viren infizieren präferentiell Leberzellen [Hofmann et al. 1995]. Rekombinante Viren werden durch Kotransfektion von viraler DNA und einem Transferplasmid, welches das Transgen enthält, auf Insektenzellen generiert. Das Transferplasmid enthält ein essentielles Gen, welches auf der transfizierten viralen DNA deletiert ist. Nur bei homologer Rekombination von viraler DNA und Transferplasmid kann ein lebensfähiges Virus entstehen, was die Selektion rekombinanter Viren erheblich erleichtert [Kitts et al. 1990]. Die Tatsache, daß die Infektion von Säugerhepatozyten nicht produktiv zu sein scheint, also keine Replikation der Viren stattfindet [Hofmann et al. 1995], und auch von Hepatozyten abgeleitete Tumorzellen infizierbar zu sein scheinen, eröffnet die Möglichkeit, Baculoviren zur Therapie von Lebertumoren einzusetzen. Allerdings konnte bisher noch kein erfolgreicher In-vivo-Gentransfer nachgewiesen werden, wofür möglicherweise eine Komplementinaktivierung verantwortlich ist [Hofmann u. Sandig, pers. Mitteilung]. Sollte sich dieses Problem lösen lassen, könnten die anscheinend nicht-toxischen, nicht transformierenden und über eine hohe Aufnahmekapazität verfügenden Baculoviren ihren Platz in der zytotoxischen Therapie von Lebertumoren finden.

Relativ neu unter den Gentransfersystemen sind die α -Viren und hier insbesondere das Sindbisvirus [Xiong et al. 1989] und das Semliki-Forest-Virus [Berglund et al. 1993]. Diese Viren haben ein breites Wirtsspektrum für Säugerzellen [Liljeström 1994]. Die mit einer Hülle ausgestatteten α -Viren haben ein 12 kbp großes RNA-Genom (Sindbis), welches im Zytoplasma der infizierten Zelle vielfach repliziert wird und zu einer hohen Expression eingeschleuster Transgene führen kann. Die Expression ist transient. Zur Herstellung rekombinanter Viren werden z. Z. noch transgene und Helfer-RNA [Bredenbeek et al. 1993] sowie neuerdings auch die entsprechende cDNA in Plasmidform [Dubensky et al. 1996, Herweijer et al. 1995] auf empfängliche Zellen kotransfiziert. An der Herstellung von Verpackungszelllinien in Analogie zu den Retroviren wird gearbeitet [Dubensky et al. 1996]. Hochtitrige Suspensionen mit 10^{10} Viren, produziert von 10^7 Zellen, sind beschrieben worden [Liljeström u. Garoff 1991]. Diese Eigenschaften machen α -Viren hochgeeignet für die Im-

mungentherapie, bei der eine transiente Expression ausreicht und eine hohe Expression wünschenswert ist [Zhou et al. 1995].

Autonome Parvoviren gehören zu den abhängigsten unter den DNA-Viren. Während die ebenfalls zu den Parvoviren gehörenden AAV (s. oben) einen Helfervirus zur Replikation benötigen, sind die autonomen Parvoviren von Helferfunktionen der Wirtszelle abhängig. Sie können nur replizieren, wenn kurz nach Infektion der Zelle eine S-Phase im Zellzyklus abläuft. Dabei integriert die DNA nicht in den Zellkern. Rekombinanten der 25 nm großen unbehüllten Viren, zu denen B19, H1, MVM und LuIII gehören, werden nach dem Prinzip der Kotransfektion von Transferplasmid und viraler DNA generiert [Maxwell et al. 1993]. Da sich in den Viren die gewebespezifische Expression anscheinend erhalten läßt [Maxwell et al. 1996] und aufgrund ihrer Kleinheit eine gute Penetrationsfähigkeit in Tumorgewebe zu erwarten ist, könnten autonome Parvoviren besonders für zytotoxische Krebsgentherapien interessant sein. Sollten replikationsfähige Parvoviren zu generieren sein, die den gestellten Sicherheitsansprüchen genügen, könnte die Abhängigkeit vom replizierenden Status der Tumorzellen einen wichtigen Spezifitätsfaktor darstellen.

Polioviren sind ikosaedrale, hüllenlose RNA-Viren mit einem 7,5 kbp großen Genom [Kitamura et al. 1981]. Eine Deletion im P1-Kapsidproteingen erlaubt die Insertion transgener Sequenzen. Das deletierte Strukturgen wird in trans von einem Vakziniavirus bereitgestellt [Ansardi et al. 1993]. Polioviren integrieren nicht ins Genom und infizieren eine Vielzahl von Säugerzellen. Bisher konnten 1,5 kbp und 2,4 kbp transgener Sequenz erfolgreich verpackt werden [Ansardi et al. 1994, Porter et al. 1995]. Die Fähigkeit der transferierten RNA, in den Zielzellen zu replizieren, empfiehlt Polioviren für Tumorstimmungsstrategien.

2.3.4 Ausblick

Auf dem jetzigen Stand der Forschung sind die beschriebenen Gentransfersysteme je nach gewünschter Anwendung unterschiedlich gut geeignet. Kein System kann bisher als so gut angesehen werden, daß keine Verbesserungen mehr nötig wären. Bei einer langfristigen Planung ist es sinnvoll, sich die natürlichen Limitierungen und Vorteile eines Vektors genau anzusehen. So wird man bei ei-

nem geplanten Schwerpunkt auf der gewebespezifischen Expression großer Gene nicht unbedingt Viren mit beschränkter Verpackungskapazität, wie Retroviren oder α -Viren wählen. Andererseits hat es sicher Sinn, den hohen Lebertrophismus von Adenoviren auszunutzen, um In-vivo-Lebergentherapie zu betreiben, auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt die Langzeitexpression nach adenoviralem Gentransfer noch nicht gegeben ist. Gleichmaßen werden sicher Herpesvektoren wegen ihres Neurotropismus für neurale Anwendungen erste Priorität haben, auch wenn die Toxizität z. Z. noch ein Problem darstellt.

Nach 1/2 Jahrzehnt klinischer Phase-I-Studien mit dem primären Ziel, Toxizität auszuschließen, hat nun in der klinischen Gentherapie eine Phase begonnen, in welcher die Forderung nach therapeutischer Wirksamkeit größer geworden ist. Die enormen molekularen Möglichkeiten zum Design künstlicher und zur Modifikation natürlicher Vektoren erlauben die Prognose, daß sich die Gentherapie diesem Anspruch stellen kann.

2.3.5 Literatur

- Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R et al. (1993) Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice [published erratum appears in *Nat Genet* 1993 5: 312]. *Nat Genet* 5: 135–142
- Amalfitano A, Begy CR, Chamberlain JS (1996) Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3352–3356
- Ansardi DC, Porter DC, Morrow CD (1993) Complementation of a poliovirus defective genome by a recombinant vaccinia virus which provides poliovirus P1 capsid precursor in trans. *J Virol* 67: 3684–3690
- Ansardi DC, Moldoveanu Z, Porter DC, Walker DE, Conry RM, LoBuglio AF, McPherson S, Morrow CD (1994) Characterization of poliovirus replicons encoding carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 54: 6359–6364
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* 79: 137–158
- Bai M, Campisi L, Freimuth P (1994) Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2. *J Virol* 68: 5925–5932
- Banerjee S, Livanos E, Vos JM (1995) Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. *Nat Med* 1: 1303–1308
- Barr D, Tubb J, Ferguson D, Scaria A, Lieber A, Wilson C, Perkins J, Kay MA (1995) Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains. *Gene Ther* 2: 151–155
- Baxby D, Paoletti E (1992) Potential use of non-replicating vectors as recombinant vaccines. *Vaccine* 10: 8–9
- Beermann F, Ruppert S, Hummler E, Bosch FX, Muller G, Ruther U, Schutz G (1990) Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *EMBO J* 9: 2819–2826
- Berglund P, Sjöberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P (1993) Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology* 11: 916–920
- Berns KI, Giraud C (1995) Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy. *Ann NY Acad Sci* 772: 95–104
- Bloss TA, Sugden B (1994) Optimal lengths for DNAs encapsidated by Epstein-Barr virus. *J Virol* 68: 8217–8222
- Boettger M, Vogel F, Platzer M, Kiessling V, Grade K, Strauss M (1988) Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMG1 results in efficient transfection. *Biochim Biophys Acta* 950: 221–228
- Bonifer C, Vidal M, Grosveld F, Sippel AE (1990) Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J* 9: 2843–2848
- Boviatsis EJ, Chase M, Wei MX, Tamiya T, Hurford RK Jr, Kowall NW, Tepper RI, Breakefield XO, Chiocca EA (1994a) Gene transfer into experimental brain tumors mediated by adenovirus, herpes simplex virus, and retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 5: 183–191
- Boviatsis EJ, Scharf JM, Chase M, Harrington K, Kowall NW, Breakefield XO, Chiocca EA (1994b) Antitumor activity and reporter gene transfer into rat brain neoplasms inoculated with herpes simplex virus vectors defective in thymidine kinase or ribonucleotide reductase. *Gene Ther* 1: 323–331
- Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M, Dörken B (1997) Liver-associated toxicity of the HSV-tK/6CV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 4: 9–16
- Bredenbeek PJ, Frolov I, Rice CM, Schlesinger S (1993) Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J Virol* 67: 6439–6446
- Burkholder JK, Decker J, Yang NS (1993) Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J Immunol Methods* 165: 149–156
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non-mammalian cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8033–8037
- Caplen NJ, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D, Coutelle C, Huang L, Alton EW, Williamson R (1995) In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther* 2: 603–613
- Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D (1993) Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7024–7028
- Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL (1995) Combination gene therapy for liver me-

- tastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2577–2581
- Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS (1993) In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4455–4459
- Chu TH, Dornburg R (1995) Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J Virol* 69: 2659–2663
- Chu G, Hayakawa H, Berg P (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 15: 1311–1326
- Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR (1995) Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 6: 1329–1341
- Collis P, Antoniou M, Grosveld F (1990) Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J* 9: 233–240
- Cone RD, Mulligan RC (1984) High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6349–6353
- Cooney EL, Collier AC, Greenberg PD, Coombs RW, Zarling J, Arditti DE, Hoffman MC, Hu SL, Corey L (1991) Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein [see comments]. *Lancet* 337: 567–572
- Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK (1995) High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 69: 7430–7436
- Cristiano RJ, Smith LC, Kay MA, Brinkley BR, Woo SL (1993) Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11548–11552
- Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangelo A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, Danel C (1994) Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis [see comments]. *Nat Genet* 8: 42–51
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaise RM (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors [see comments]. *Science* 256: 1550–1552
- Curiel DT, Wagner E, Cotten M, Birnstiel ML, Agarwal S, Li CM, Loechel S, Hu PC (1992) High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum Gene Ther* 3: 147–154
- Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG (1993) Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 4: 733–740
- Delort JP, Capecchi MR (1996) TAXI/UAS: a molecular switch to control expression of genes in vivo. *Hum Gene Ther* 7: 809–820
- DeMatteo RP, Markmann JF, Kozarsky KF, Barker CF, Raper SE (1996) Prolongation of adenoviral transgene expression in mouse liver by T-lymphocyte subset depletion. *Gene Ther* 3: 4–12
- Dillon N (1993) Regulating gene expression in gene therapy. *Trends Biotechnol* 11: 167–173
- Dillon N, Grosveld F (1993) Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet* 9: 134–137
- Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R et al. (1992) Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176: 1125–1135
- Dubensky TW Jr, Driver DA, Polo JM, Belli BA, Latham EM, Ibanez CE, Chada S, Brumm D, Banks TA, Mento SJ, Jolly DJ, Chang SM (1996) Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer. *J Virol* 70: 508–519
- Dzau VJ, Morishita R, Gibbons GH (1993) Gene therapy for cardiovascular disease. *Trends Biotechnol* 11: 205–210
- Eisenberg JC, Elgin SC (1991) Boundary functions in the control of gene expression. *Trends Genet* 7: 335–340
- Fields BN (ed) (1990) *Virology*. Raven Press, New York
- Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM (1996a) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217: 11–22
- Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM (1996b) Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 70: 520–532
- Flotte TR, Carter BJ (1995) Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2: 357–362
- Flotte TR, Afione SA, Conrad C, McGrath SA, Solow R, Oka H, Zeitlin PL, Guggino WB, Carter BJ (1993) Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10613–10617
- Flotte TR, Barraza Ortiz X, Solow R, Afione SA, Carter BJ, Guggino WB (1995) An improved system for packaging recombinant adeno-associated virus vectors capable of in vivo transduction. *Gene Ther* 2: 29–37
- Fox ME, Lemmon MJ, Mauchline ML, Davis TO, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM (1996) Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther* 3: 173–178
- Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB (1990) An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors: potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8950–8954
- Geschwind MD, Hartnick CJ, Liu W, Amat J, Vandewater TR, Federoff HJ (1996) Defective HSV 1 vector expressing BDNF in auditory ganglia elicits neurite outgrowth: model for treatment of neuron loss following cochlear degeneration. *Hum Gene Ther* 7: 173–182
- Glorioso JC, Bender MA, Goins WF, Fink DJ, DeLuca N (1995a) HSV as a gene transfer vector for the nervous system. *Mol Biotechnol* 4: 87–99
- Glorioso JC, DeLuca NA, Fink DJ (1995b) Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol* 49: 675–710
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547–5551
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766–1769
- Graham FL, Eb AJ van der (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456–460

- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59–74
- Greaves DR, Wilson FD, Lang G, Kioussis D (1989) Human CD2 3'-flanking sequences confer high-level, T-cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* 56: 979–986
- Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia [see comments]. *Nat Genet* 6: 335–341
- Günzburg WH, Salmons B (1996) Development of retroviral vectors as safe, targeted gene delivery systems. *J Mol Med* 74: 171–182
- Haddada H, Ragot T, Cordier L, Duffour MT, Perricaudet M (1993) Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 4: 703–711
- Hatzfeld A, Batard P, Panterne B, Taieb F, Hatzfeld J (1996) Increased stable retroviral gene transfer in early hematopoietic progenitors released from quiescence. *Hum Gene Ther* 7: 207–213
- Herrmann F (1996) Clinical application of gene transfer. *J Mol Med* 74: 213–221
- Hersh J, Crystal RG, Bewig B (1995) Modulation of gene expression after replication-deficient, recombinant adenovirus-mediated gene transfer by the product of a second adenovirus vector. *Gene Ther* 2: 124–131
- Herweijer H, Latendresse JS, Williams P, Zhang G, Danko I, Schlesinger S, Wolff JA (1995) A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther* 6: 1161–1167
- Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M (1995) Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10099–10103
- Huard J, Goins WF, Glorioso JC (1995) Herpes simplex virus type 1 vector mediated gene transfer to muscle. *Gene Ther* 2: 385–392
- Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E (1993) Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92: 2597–2601
- Jin X, Nguyen D, Zhang WW, Kyritsis AP, Roth JA (1995) Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector. *Cancer Res* 55: 3250–3253
- Johnson PA, Miyanohara A, Levine F, Cahill T, Friedmann T (1993) Cytotoxicity of a replication-deficient mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 66: 2952–2965
- Kaneda Y, Iwai K, Uchida T (1989a) Increased expression of DNA cotransduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* 243: 375–378
- Kaneda Y, Iwai K, Uchida T (1989b) Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem* 264: 12126–12129
- Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, Nakabayashi H, McGarrity G, Tamaoki T, Anderson WF, Chiang YL (1995) Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression. *Cancer Res* 55: 5283–5287
- Kaplit MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8: 148–154
- Kas E, Poljak L, Adachi Y, Laemmli UK (1993) A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin. *EMBO J* 12: 115–126
- Kasahara N, Dozy AM, Kan YW (1994) Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions [see comments]. *Science* 266: 1373–1376
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, Werf S van der, Anderson CW, Wimmer E (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291: 547–553
- Kitts PA, Ayres MD, Possee RD (1990) Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res* 18: 5667–5672
- Kolls JK, Lei DH, Odom G, Nelson S, Summer WR, Gerber MA, Shellito JE (1996) Use of transient Cd4 lymphocyte depletion to prolong transgene expression of E1 deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7: 489–497
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [see comments]. *Nature* 351: 117–121
- Kotin RM (1994) Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 5: 793–801
- Kramm CM, Rainov NG, Senaesteves M, Chase M, Pechan PA, Chiocca EA, Breakefield XO (1996) Herpes vector mediated delivery of marker genes to disseminated central nervous system tumors. *Hum Gene Ther* 7: 291–300
- Kries JP von, Buhrmester H, Stratling WH (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell* 64: 123–135
- Ledley FD (1995) Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6: 1129–1144
- Lem J, Flannery JG, Li T, Applebury ML, Farber DB, Simon MI (1992) Retinal degeneration is rescued in transgenic rd mice by expression of the cGMP phosphodiesterase beta subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4422–4426
- Lesoonwood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD, Mixson AJ (1995) Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther* 6: 395–405
- Lew D, Parker SE, Latimer T, Abai AM, Kuwahararundell A, Doh SG, Yang ZY, Laface D, Gromkowski SH, Nabel GJ, Manthorpe M, Norman J (1995) Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther* 6: 553–564
- Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford Perricaudet LD, Woo SL (1993) Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 4: 403–409
- Liljeström P (1994) Alphavirus expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 5: 495–500
- Liljeström P, Garoff H (1991) A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9: 1356–1361
- Liu TJ, Naggar AK el, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL, Clayman GL (1995) Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 55: 3117–3122

- Lu B, Federoff HJ (1995) Herpes simplex virus type 1 amplicon vectors with glucocorticoid-inducible gene expression. *Hum Gene Ther* 6: 419–428
- Mackett M, Smith GL, Moss B (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7415–7419
- Mann R, Mulligan RC, Baltimore D (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33: 153–159
- Markowitz D, Goff S, Bank A (1988) A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62: 1120–1124
- Martinez I, Dornburg R (1996) Partial reconstitution of a replication competent retrovirus in helper cells with partial overlaps between vector and helper cell genomes. *Hum Gene Ther* 7: 705–712
- Mastrangeli A, Harvey BG, Yao J, Wolff G, Kovesdi I, Crystal RG, Falckpedersen E (1996) Sero switch adenovirus mediated in vivo gene transfer: circumvention of anti adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype. *Hum Gene Ther* 7: 79–87
- Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G (1994) Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol* 68: 6811–6814
- Matthews KE, Dev SB, Toneguzzo F, Keating A (1995) Electroporation for gene therapy. *Methods Mol Biol* 48: 273–280
- Maxwell IH, Maxwell F, Rhode SL, Corsini J, Carlson JO (1993) Recombinant LuIII autonomous parvovirus as a transient transducing vector for human cells. *Hum Gene Ther* 4: 441–450
- Maxwell IH, Spitzer AL, Long CJ, Maxwell F (1996) Autonomous parvovirus transduction of a gene under control of tissue-specific or inducible promoters. *Gene Ther* 3: 28–36
- McCoy RD, Davidson BL, Roessler BJ, Huffnagle GB, Janich SL, Laing TJ, Simon RH (1995) Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles. *Hum Gene Ther* 6: 1553–1560
- McGrory WJ, Bautista DS, Graham FL (1988) A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163: 614–617
- Mester JC, Pitha PM, Glorioso JC (1995) Antiviral activity of herpes simplex virus vectors expressing murine alpha 1-interferon. *Gene Ther* 2: 187–196
- Michael SI, Hong JS, Curiel DT, Engler JA (1995) Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther* 2: 660–668
- Miller AD, Buttimore C (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6: 2895–2902
- Miller JL, Donahue RE, Sellers SE, Samulski RJ, Young NS, Nienhuis AW (1994) Recombinant adeno-associated virus-(rAAV)-mediated expression of a human gamma-globin gene in human progenitor-derived erythroid cells [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92: 646]. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10183–10187
- Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926–932
- Moss B (1991) Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252: 1662–1667
- Naldini I, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263–267
- O'Neil BH, Kawakami Y, Restifo NP, Bennink JR, Yewdell JW, Rosenberg SA (1993) Detection of shared MHC-restricted human melanoma antigens after vaccinia virus-mediated transduction of genes coding for HLA. *J Immunol* 151: 1410–1418
- Pakzaban P, Geller AI, Isacson O (1994) Effect of exogenous nerve growth factor on neurotoxicity of and neuronal gene delivery by a herpes simplex amplicon vector in the rat brain. *Hum Gene Ther* 5: 987–995
- Palmeter RD, Sandgren EP, Avarbuck MR, Allen DD, Brinster RL (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 478–482
- Porter DC, Ansardi DC, Morrow CD (1995) Encapsulation of poliovirus replicons encoding the complete human immunodeficiency virus type 1 gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans. *J Virol* 69: 1548–1555
- Qin HX, Chatterjee SK (1996) Construction of recombinant vaccinia virus expressing gm csf and its use as tumor vaccine. *Gene Ther* 3: 59–66
- Qiu P, Ziegelhoffer P, Sun J, Yang NS (1996) Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther* 3: 262–268
- Raja Walia R, Webber J, Naftilan J, Chapman GD, Naftilan AJ (1995) Enhancement of liposome-mediated gene transfer into vascular tissue by replication deficient adenovirus. *Gene Ther* 2: 521–530
- Roth J, Dittmer D, Rea D, Tartaglia J, Paoletti E, Levine A (1996) p53 as a target for cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor cell challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4781–4786
- Rother RP, Squinto SP, Mason JM, Rollins SA (1995) Protection of retroviral vector particles in human blood through complement inhibition. *Hum Gene Ther* 6: 429–435
- Roux P, Jeanteur P, Piechaczyk M (1989) A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9079–9083
- Russell SJ (1991) Making high titre retroviral producer cells. *Methods Mol Biol* 8: 29–60
- Russell DW, Miller AD, Alexander IE (1994) Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8915–8919
- Sawchuk SJ, Boivin GP, Duwel LE, Ball W, Bove F, Trapnell B, Hirsch R (1996) Anti T-cell receptor monoclonal antibody prolongs transgene expression following adenovirus mediated in vivo gene transfer to mouse synovium. *Hum Gene Ther* 7: 499–506
- Schofield JP, Caskey CT (1995) Non-viral approaches to gene therapy. In: Lever AML, Goodfellow P (eds) *Gene therapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh London New York, pp 56–71
- Shimotohno K, Temin HM (1981) Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26: 67–77

- Sippel A, Saueressig H, Winter D, Grewal T, Faust N, Hecht A, Bonifer C (1992) In: Grosveld F, Kollias G (eds) *Transgenic animals*. Academic Press, New York London, pp 1–26
- Somogyi P, Frazier J, Skinner MA (1993) Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication, and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology* 197: 439–444
- Staubinger RM (1993) pH-sensitive liposomes for delivery of macromolecules into cytoplasm of cultured cells. *Methods Enzymol* 221: 361–370
- Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG, Nabel GJ (1992) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 3: 267–275
- Su H, Chang JC, Xu SM, Kan YW (1996) Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum Gene Ther* 7: 463–470
- Sugaya S, Fujita K, Kikuchi A, Ueda H, Takakuwa K, Kodama S, Tanaka K (1996) Inhibition of tumor growth by direct intratumoral gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene with DNA liposome complexes. *Hum Gene Ther* 7: 223–230
- Sutter G, Moss B (1992) Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10847–10851
- Sutter G, Moss B (1995) Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* 84: 195–200
- Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg RA (1982) Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol Cell Biol* 2: 426–436
- Tatum EL (1966) Molecular biology, nucleic acids and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 10: 19–32
- Thrasher AJ, Alwis M de, Casimir CM, Kinnon C, Page K, Lebkowski J, Segal AW, Levinsky RJ (1995) Generation of recombinant adeno-associated virus (rAAV) from an adenoviral vector and functional reconstitution of the NADPH-oxidase. *Gene Ther* 2: 481–485
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A et al. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [see comments]. *Science* 259: 1745–1749
- Vahlsing HL, Yankauckas MA, Sawdey M, Gromkowski SH, Manthorpe M (1994) Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *J Immunol Methods* 175: 11–22
- Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G, Aumailley M, Heard JM, Danos O, Verdier G, Cosset FL (1994) Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol* 68: 4609–4619
- Vile R, Russell SJ (1994) Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gen Ther* 1: 88–98
- Vile RG, Russell SJ (1995) Retroviruses as vectors. In: Lever AML, Goodfellow P (eds) *Gene therapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh London New York, pp 12–30
- Vos JM (1994) Herpesviruses as genetic vectors. In: Vos JM (ed) *Viruses in human gene therapy*. Carolina Academic Press, Durham, NC, pp 108–140
- Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML (1992a) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7934–7938
- Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos H, Mechtler K, Curiel DT, Birnstiel ML (1992b) Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6099–6103
- Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP (1995a) Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol* 154: 4685–4692
- Wang MJ, Friedmann T, Johnson PA (1995b) Differentiation of PC12 cells by infection with an HSV-1 vector expressing nerve growth factor. *Gene Ther* 2: 323–335
- Watson JD, Crick FHC (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964–969
- Wei CM, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM (1981) Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39: 935–944
- Welsh RM Jr, Cooper NR, Jensen FC, Oldstone MB (1975) Human serum lyses RNA tumour viruses. *Nature* 257: 612–614
- Wigler M, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng YC, Axel R (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11: 223–232
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC (1991) Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2726–2730
- Wilson JM, Grossman M, Wu CH, Chowdhury NR, Wu GY, Chowdhury JR (1992) Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J Biol Chem* 267: 963–967
- Wolff JA, Lederberg J (1994) An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 5: 469–480
- Wood MJ, Byrnes AP, Pfaff DW, Rabkin SD, Charlton HM (1994) Inflammatory effects of gene transfer into the CNS with defective HSV-1 vectors. *Gene Ther* 1: 283–291
- Wu GY, Wu CH (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* 263: 14621–14624
- Wu CH, Wilson JM, Wu GY (1989) Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. *J Biol Chem* 264: 16985–16987
- Wu XY, Holschen J, Kennedy SC, Ponder KP (1996) Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression. *Hum Gene Ther* 7: 159–171
- Xiong C, Levis R, Shen P, Schlesinger S, Rice CM, Huang HV (1989) Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 243: 1188–1191
- Yang NS, Sun WH (1995) Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med* 1: 481–483
- Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9568–9572

- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM (1994) Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 7: 362–369
- Yang Y, Vanin EF, Whitt MA, Fornerod M, Zwart R, Schneiderman RD, Grosveld G, Nienhuis AW (1995) Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther* 6: 1203–1213
- Yee JK, Friedmann T, Burns JC (1994) Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43: 99–112
- Yu SF, Ruden T von, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Ruther U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3194–3198
- Zhou XZ, Berglund P, Zhao HX, Liljestrom P, Jondal M (1995) Generation of cytotoxic and humoral immune responses by nonreplicative recombinant semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3009–3013
- Zhou SZ, Li Q, Stamatoyannopoulos G, Srivastava A (1996) Adeno associated virus 2 mediated transduction and erythroid cell specific expression of a human beta globin gene. *Gen Ther* 3: 223–229
- Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261: 209–211
- Zinder ND, Lederberg J (1952) Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol* 64: 679–699

Tumorerkrankungen

Ganten, D.; Ruckpaul, K. (Hrsg.)

1998, XIV, 270 S. 4 Abb., Hardcover

ISBN: 978-3-540-62463-9