

# 10 Aktueller Stand der Gentherapie

SIGRID NIKOL

Inhaltsverzeichnis	
10.1	Einleitung . . . . . 297
10.2	Theoretischer Hintergrund . . . . . 298
10.2.1	Wahl des therapeutischen Gens . . . . . 298
10.2.2	Zielzellen der Transfektion . . . . . 299
10.2.3	Art und Weise des Transfers . . . . . 300
10.3	Meilensteine in der klinischen Gentherapie seit 1989 . . . . . 302
10.4	Erste Ergebnisse in der klinischen Gentherapie seit 1989 . . . . . 302
10.4.1	Monogene Erkrankungen . . . . . 304
10.4.1.1	Adenosindeaminasemangel . . . . . 304
10.4.1.2	LDL-Rezeptor-Mangel . . . . . 306
10.4.1.3	Mukoviszidose . . . . . 309
10.4.1.4	Fanconi-Anämie . . . . . 313
10.4.1.5	Aspartoazyklasemangel . . . . . 313
10.4.1.6	Glukozerebrosidasemangel . . . . . 314
10.4.1.7	Faktor-IX-Mangel . . . . . 315
10.4.1.8	Chronische granulomatöse Krankheit . . . . . 315
10.4.2	Tumorerkrankungen . . . . . 316
10.4.2.1	Melanom . . . . . 317
10.4.2.2	Glioblastom (malignes Astrozytom) . . . . . 320
10.4.2.3	Lungenkarzinom . . . . . 322
10.4.2.4	Mesotheliom . . . . . 325
10.4.2.5	Nierenzellkarzinom . . . . . 327
10.4.2.6	Kolonkarzinom . . . . . 328
10.4.2.7	Leberzellkarzinom (hepatozelluläres Karzinom) . . . . . 330
10.4.2.8	Ovarialkarzinom . . . . . 332
10.4.2.9	Mammakarzinom . . . . . 335
10.4.2.10	Hämatologische Tumoren: myeloische Leukämien und Lymphome . . . . . 337
10.4.2.11	Multiples Myelom . . . . . 341
10.4.2.12	Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals . . . . . 341
10.4.2.13	Knochentumoren . . . . . 342
10.4.2.14	Fortgeschrittene komplexe Tumoren . . . . . 343
10.4.3	Infektionskrankheiten . . . . . 344
10.4.3.1	Human immunodeficiency virus(HIV)-Infektion/Aquired immunodeficiency syndrom (Aids) . . . . . 344
10.4.4	Kardiovaskuläre Erkrankungen: periphere und koronare Gefäßkrankheit . . . . . 350
10.4.4.1	Arteriosklerose . . . . . 350
10.4.5	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) . . . . . 354
10.4.6	Rheumatoide Arthritis . . . . . 354
10.5	Verbesserungsmöglichkeiten der Gentherapie . . . . . 356
10.5.1	Verbesserung der Vektoren . . . . . 356
10.5.1.1	Retrovirale Vektoren . . . . . 356
10.5.1.2	Adenovirale Vektoren . . . . . 359
10.5.1.3	Adenoassoziierte Virusvektoren . . . . . 361
10.5.1.4	Neue virale Vektoren . . . . . 362
10.5.1.5	Nichtvirale Vektoren . . . . . 362
10.5.2	Lokale Applikation . . . . . 363
10.5.3	Neue Target-Gene . . . . . 364
10.5.3.1	Antiangiogenese . . . . . 365
10.5.3.2	Thrombose . . . . . 365
10.5.3.3	Diabetes mellitus . . . . . 366
10.5.3.4	Morbus Parkinson . . . . . 367
10.5.4	In-vivo-Imaging der Expression transferierter Gene . . . . . 368
10.6	Zukunftsperspektive . . . . . 368
10.7	Literatur . . . . . 369

## 10.1 Einleitung

Molekularbiologische Methoden, einschließlich der Gentherapie, sind in den letzten Jahren zunehmend ins Rampenlicht gerückt. Nach experimentellen Erfolgen und einer dementsprechend hohen Erwartungshaltung insbesondere bei der Therapie

von Patienten mit hohem Leidensdruck, bei denen konventionelle Therapien bisher versagten, erfolgte bereits nach wenigen Jahren der Übergang in die klinische Testung. Nach der 1. therapeutischen Anwendung 1990 hat sich das große Potential der Gentherapie bestätigt, wenn auch der Weg zur routinemäßigen Anwendung länger als erwartet ist.

Potenzielle Vorteile der Gentherapie sind die Langzeitwirkung, die systemische oder lokale Regulierbarkeit der Genexpression, die relativ milde Einflussnahme auf physiologische Prozesse und die geringen Nebenwirkungen. Ergebnisse aus 367 klinisch-therapeutischen Studien weltweit (Stand 1.12.1998, Wiley 1998), sofern verfügbar, zeigten allenfalls partielle Erfolge, in Einzelfällen jedoch auch dauerhafte Korrekturen. Um die Effizienz der Gentherapie zu verbessern und gleichzeitig größte Therapiesicherheit zu erreichen, geht die Entwicklung zunehmend in die In-vivo-Anwendung, kombiniert mit unterschiedlichen, optimierten Vektoren mit induzierbaren und im Idealfall sogar zellspezifischen Promotoren sowie neuerdings auch speziellen lokalen Applikationstechniken.

## 10.2 Theoretischer Hintergrund

Der wesentliche Unterschied zwischen Gentherapie und konventioneller medikamentöser Therapie besteht darin, dass der eigentliche Wirkstoff nicht mehr direkt verabreicht, sondern der Körper dazu gebracht wird, sich die Wirkstoffe, die er braucht, selbst herzustellen. Vorteile sind im Idealfall die Langzeitwirkung, die systemische oder lokale Regulierbarkeit der Genexpression, die relativ milde Einflussnahme auf physiologische Prozesse und

die geringen Nebenwirkungen. Auch wenn gelegentlich die Vorteile der Keimzelltherapie diskutiert werden (Juengst 1995), ist heute im Zusammenhang mit der klinischen Anwendung von Gentherapie in der Regel die Behandlung von somatischen, d.h. differenzierten Zellen gemeint. Gentherapie bedeutet also üblicherweise nicht eine Veränderung von Keimzellen, gleichbedeutend mit der Schaffung eines transgenen Organismus durch die Veränderung des Genoms aller Körperzellen, sondern lediglich eine Korrektur dort, wo eine Erkrankung oder Fehlbildung vorliegen.

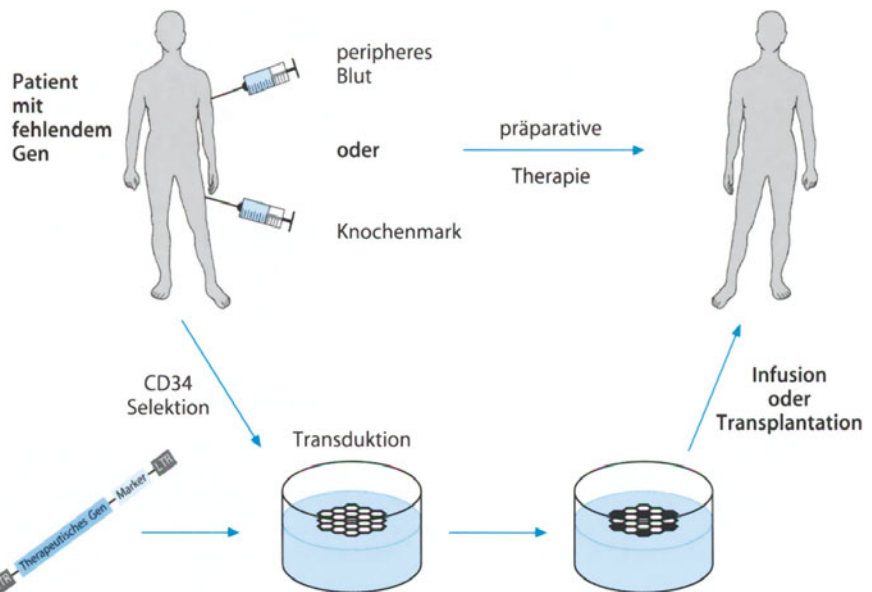
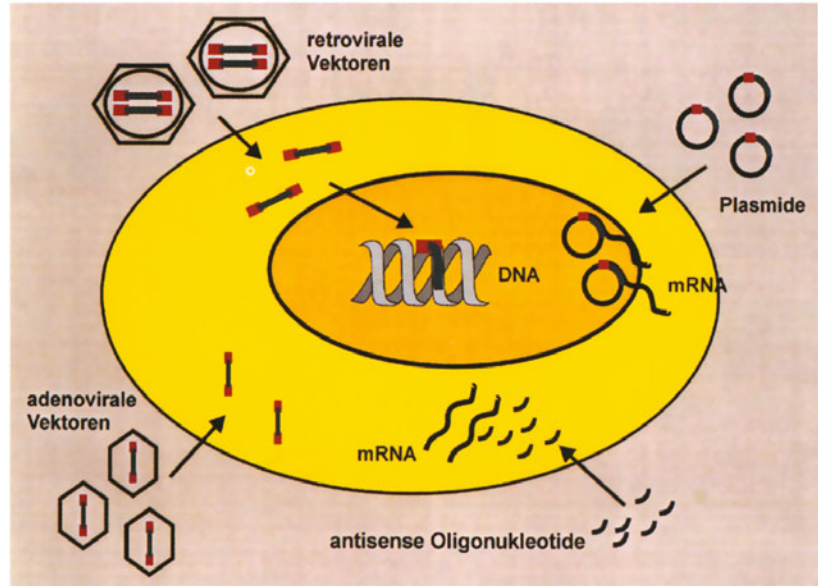
### 10.2.1 Wahl des therapeutischen Gens

Die Wahl des therapeutischen Gens hängt im Wesentlichen von der Grundkrankheit ab: Fehlende oder defekte Gene können bei singulärem Genmangel oder -defekt ersetzt werden; bei proliferativen Erkrankungen können körperfremde, therapeutische Gene (z. B. Suizidgene, Resistenzgene) oder bereits vorhandene Gene zusätzlich eingeschleust werden, die in die Regulation natürlich vorkommender Gene eingreifen (z. B. zellzyklusregulierende Gene oder Immunmodulation mit Zytokinen). Es besteht die Wahl, auf DNA-Ebene einzugreifen, und zwar durch DNA-Transfer oder Transkriptionshemmung mittels kompetitiv wirkender DNA-Fragmente, wie *tripel-helix*-formenden Oligonukleotiden, oder auf RNA-Ebene mit Hilfe von Antisense-Oligonukleoti-

Tabelle 10.1. Vergleich von Vektorsystemen

Vektor	Vorteil	Nachteil
Retrovirus	1–30% Transduktionseffizienz Permanente Modifikation Infiziert hämatopoetische und epitheliale Zellen Erfahrung aus vielen klinischen Studien	Virus instabil Integriert nur in replizierende Zellen 9–12 kb Insertionslimit
Adenovirus	Hohe Infektionsfrequenz für epitheliale Zellen Zellproliferation nicht erforderlich	Infiziert nicht Knochenmark Immunogen Temporärer Effekt
Adenoassoziiertes Virus	Virus stabil Integriert in geringer Frequenz (5 kb) in nichtproliferierende Zellen	Geringe Kapazität für DNA Nur Ansätze mit geringen Virusmengen
Herpes-simplex-Virus Typ I	Infiziert viele Zelltypen Sehr hohe Virustiter Relativ lange Expression von transfizierten fremden Genen	Keine Integration in das Genom infizierter Zellen Zytotoxisch Komplexe Biologie, deshalb schwierige Entwicklung
„Nackte“ DNA	Viren nicht involviert Einfach zu verwenden Einfach zu entwickeln	Geringe Integrationsfrequenz Temporäre Expression Schneller intrazellulärer Abbau
Liposomen und DNA Adenovirales Hüllprotein	Viren nicht involviert Nichtinfektiöses Agens Zellspezifische Anwendung möglich	Für bestimmte Zellen zytotoxisch Begrenzte Anwendung Schwierig zu konstruieren

**Abb. 10.1.** Repräsentative Gentransferwege: Beim retroviralen Transfer ist die stabile Integration der DNA in das Wirtszellgenom mit entsprechend langer Wirkdauer möglich; beim adenoviralen und liposomalen Gentransfer erreicht die transferierte DNA nur Zytoplasma oder Zellkern, sodass der Effekt transient ist. Eine „negative“ Regulation ist durch die gezielte Inhibition der Translation von mRNA durch den Einsatz von Oligonukleotiden (oder Antisense-Genkonstrukten) möglich



**Abb. 10.2.** Beim Ex-vivo-Gen-transfer werden dem Patienten autologe Zellen entnommen, außerhalb des Körpers transduziert und schließlich in den Patienten reinjiziert oder retransplantiert

den, katalytischen Oligonukleotiden oder Ribozymen die Translation der genetischen Information in das biologisch aktive Protein zu verhindern.

### 10.2.2 Zielzellen der Transfektion

Soll eine besonders hohe Transfektionseffizienz erreicht werden, werden die unselektiven Adeno-, Lenti- und Sendaiviren bevorzugt. Ist eher eine Limitierung auf proliferierende Zellen gewünscht, wie bei Tumor- und anderen proliferativen Erkrankungen, werden die selektiven Retroviren und adenoassoziierte Viren verwendet. Je nach betroffener

Zellart kann die Selektivität des Gentransfers durch bestimmte Übertragungshelfer (Vektoren) gesteigert werden (Tabelle 10.1). Man macht sich hier v.a. den Tropismus verschiedener Viren zunutze, wie z.B. die Vorliebe der Herpesviren für Zellen des ZNS oder der Adenoviren für Lungenzellen. Neben den viralen Vektoren (Abb. 10.1) gibt es chemische und mechanische Möglichkeiten der Verbesserung der Transfereffizienz, z.B. den Einsatz von Liposomen oder den bisher fast ausschließlich experimentell verwendeten „Beschuss“ mit beschichteten Partikeln oder die Kombination verschiedener Methoden, wie z.B. die Verwendung des Liposomen-Sendaivirus-Komplexes.

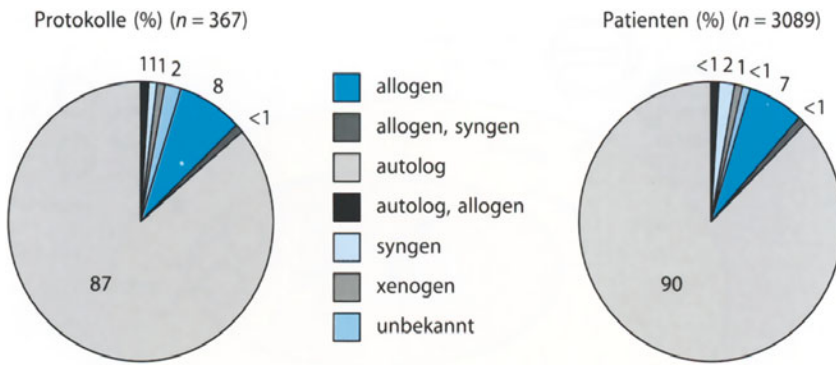


Abb. 10.3. Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach Target-Zellen für den Transfer. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

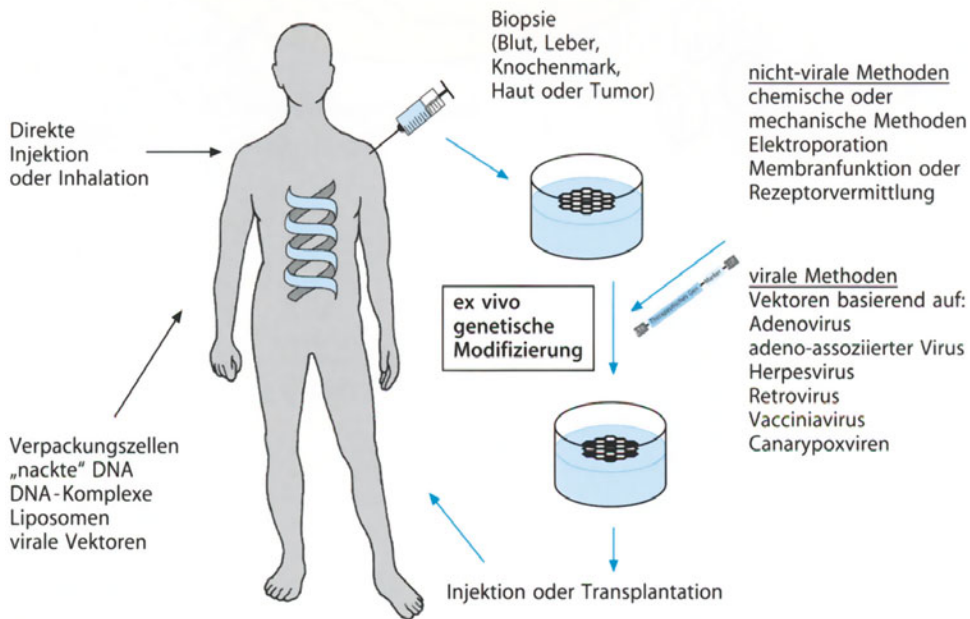


Abb. 10.4. Die 2 Möglichkeiten der somatischen Genterapie: *Links* Die direkte Injektion oder Inhalation von Genkonstrukten können wahlweise mit einem Gentransfervehikel (Vektor) kombiniert werden. Idealerweise wird das therapeutische Gen ausschließlich in die Zielzelle transferiert, wo es zu einem kontrollierbaren Zeitpunkt in gewünschter Intensität exprimiert wird. Die Entwicklung ist hier erst am Anfang, jedoch birgt diese Möglichkeit das größte Potential für eine weitverbreitete, kostengünstige Anwendung. *Rechts* Die Ex-vivo-Modifikation der Gene wird bisher noch häufi-

ger als die obige Möglichkeit angewendet. Zellen aus Biopsiegewebe werden in Kultur meist mit Hilfe eines Vektors genetisch modifiziert und in den Patienten zurücktransplantiert. Idealerweise wird das therapeutische Gen in Zellen eingeschleust, die in vivo extensiv proliferieren können, wobei die Expression der exogenen Gene ausreichender hoch bleibt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Sicherheit und Effizienz des Gentransfers überprüft werden können, bevor die Zellen in den Patienten zurückgeführt werden. Modifiziert nach Dube und Cournoyer (1995)

### 10.2.3 Art und Weise des Transfers

Neben der Effizienz des Gentransfers ist v.a. auch die Sicherheit der Therapie von Bedeutung. Hier bieten sich mit dem In-vivo- und dem Ex-vivo-Verfahren oder dem „out of the body approach“ 2 verschiedene Verfahren an. Historisch gesehen war zu Beginn der klinischen Versuche das Ex-vivo-Verfahren vorherrschend (Abb. 10.2). Meist werden hierbei autologe Zellen aus den jeweils betroffenen Organen oder aus dem Blut gewonnen (Abb.

10.3), in Kultur mit dem gewünschten Gen transfiziert und anschließend reinjiziert. Der Gentransfer findet so unter kontrollierten Bedingungen statt. Voraussetzung für die Überprüfbarkeit des Gentransfers sind allerdings ein erheblicher technischer Aufwand, ein eventuelles Verletzungsrisiko bei der Zellgewinnung und das Risiko einer Infektion der extrakorporal durch das Immunsystem ungeschützten Körperzellen. Deshalb entstanden zunehmend Bestrebungen, Gene oder Genfragmente in vivo direkt zu applizieren (Abb. 10.4).

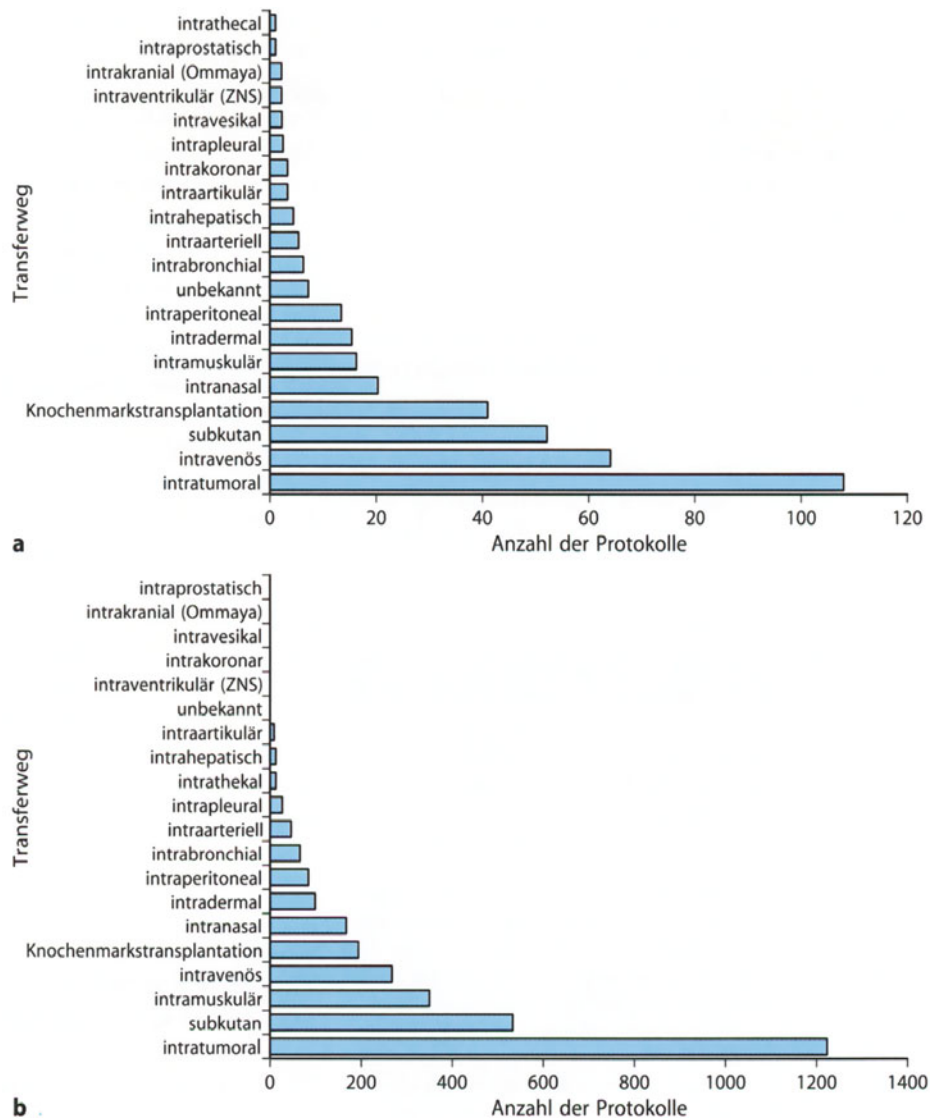


Abb. 10.5a,b. Protokolle (a) und Patienten (b) im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach Transferwegen. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

Bei der Markierung von Tumorgenen und der Applikation von Genen, die Resistenz gegen Chemotherapeutika vermitteln sollen (*multi-drug resistance genes*) ist die systemische Anwendung erwünscht. Bei der Behandlung von bestimmten Gendefekten und proliferativen Erkrankungen wird dagegen die lokale Therapie bevorzugt. So werden Aerosole bei der Behandlung der Mukoviszidose verwendet, transfizierte Leberzellen beim LDL-Rezeptor-Mangel und die lokale oder regionale Gentherapie bei der Restenose nach Angioplastie oder zur Angiogeneese bei der chronischen arteriellen Verschlusskrankheit (Abb. 10.5). Die Sicherheit des Transfers kann verbessert werden, indem besondere Antriebsaggregate (Promotoren) verwendet werden, die die Transkription der DNA in

RNA steuern. Sie können durch körpereigene Substanzen oder extern zugeführte Medikamente angeschaltet (induziert) werden. Die Selektivität des Gentransfers kann durch Promotoren, die lediglich in bestimmten Zelltypen oder Geweben aktiv sind, verbessert werden oder gar eine lokale Applikation unnötig machen (Hatzoglou et al. 1990, als Übersicht Harris und Lemoine 1996). Auch die Anwendung eines rezeptorvermittelten Gentransfers ermöglicht eine lokale Therapie bei systemischer Applikation: Es werden Polyplexe mit Liganden kombiniert, die selektiv an gewebespezifische Rezeptoren auf der Target-Zell-Oberfläche binden. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt dann über eine rezeptorvermittelte Endozytose (Wagner et al. 1990; Kircheis et al. 1997).

Wird nun das geeignetste Transferverfahren mit dem individuell günstigsten Vektor mit einem induzierbaren und im Idealfall sogar zelltypspezifischen Promotor kombiniert und durch eine spezielle lokale Applikationstechnik verabreicht, lässt sich maximale Sicherheit schaffen, ohne auf größte Effizienz verzichten zu müssen.

### 10.3 Meilensteine in der klinischen Gentherapie seit 1989

Die viralen Vektoren erwiesen sich für den Gentransfer als die effektivsten Transferhelfer. Sie stellen ein natürliches Vektorsystem dar, das bereits

Tabelle 10.2. Meilensteine der Gentherapie

Jahr	Ereignis
1967	Der Nobelpreisträger Nirenberg äußert die Prognose „ <i>My guess is that cells will be programmed with synthetic messages within 25 years.</i> “ (Ich glaube, dass Zellen innerhalb von 25 Jahren mit synthetischer Information programmiert werden können)
80er Jahre	Erwartung, dass die technische Möglichkeit der Isolierung und Reinigung von humanen Genen schnell zur Gentherapie führen würde
1989	Erste RAC-genehmigte klinische Testung: retroviraler Transfer eines bakteriellen Markergens in tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL)
1990	Erste klinische Anwendung bei einem Gemangel: retroviraler Ex-vivo-Transfer des Adenosindeaminasegens in Lymphozyten von Patienten mit „ <i>severe combined immunodeficiency</i> “
1991	Erster klinischer Einsatz der Gentherapie bei Tumorkrankheit: Ex-vivo-Gentransfer des Tumornekrosefaktorgens in TIL
1992	Erste In-vivo-Gentherapiestudie: retroviraler Gentransfer eines Selbstmordgens, der HSV- <i>tk</i> , in Glioblastome 1. Gentherapiestudie zur Behandlung einer Infektionskrankheit: retroviraler Gentransfer ex vivo von HSV- <i>tk</i> in T-Lymphozyten von HIV-Patienten Erster ex-vivo-retroviraler Transfer des LDL-Rezeptor-Gens in Hepatozyten von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie
1993	Ex-vivo-retroviraler Transfer des Faktor-IX-Gens in autologe Fibroblasten von Patienten mit Hämophilie B
1994	Erster klinischer Gentherapieversuch für eine kardiovaskuläre Erkrankung: In-vivo-Transfer des Gens von VEGF in Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit Grad IV

Millionen von Jahren Zeit hatte, sich zu entwickeln, und das bezüglich Spezifität, Expressionseffizienz und Verringerung der Pathogenität während der Infektion optimiert ist (Tolstoshev 1993). Am besten untersucht sind die Retroviren, weshalb sie für alle frühen klinischen Versuche verwendet wurden. Voraussetzung für die Entwicklung der retroviralen Gentherapie war die Erkenntnis, dass Tumolviren Körperzellen onkogen transformieren können, indem sie ihr virales Genom stabil in die DNA der Wirtszellen integrieren. Der nächste Schritt war die Entwicklung effektiver Möglichkeiten, DNA in die Zellen von Säugetieren zu transferieren. Zu Hilfe kamen Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie, die es erlauben, große Mengen von reinen Gensequenzen zu isolieren und herzustellen. Erst die Charakterisierung von genetischen Erkrankungen und das Verständnis der Regulation des Zellzyklus machten allerdings die Auswahl geeigneter therapeutischer Ziele (*targets*) möglich. Die 1. genetischen Erkrankungen, die charakterisiert werden konnten, waren die Hämoglobinopathien. Die Meilensteine der klinisch angewandten Gentherapie sind in Tabelle 10.2 zusammengefasst.

### 10.4 Erste Ergebnisse in der klinischen Gentherapie seit 1989

Die 1. klinischen Gentherapiestudien wurden in den USA durchgeführt und ausführlich dokumentiert. Die Genehmigung und Registrierung dieser Protokolle erfolgten durch das *Recombinant DNA Advisory Committee* (RAC) der *National Institutes of Health* (NIH) [Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der NIH 1995; 1996]. Mittlerweile gibt es auch publizierte Zahlen der *European Working Group of Gene Therapy* 1996, des TMC-Development-Unternehmens in Paris (Marcel und Grausz 1996) und von Gentherapiegruppen unterschiedlicher Länder selbst. Am vollständigsten sind die Aufschlüsselungen der internationalen Aktivitäten im Bereich der klinischen Gentherapie durch den Verlag Wiley (Wiley 1998). Seit 1989 wurden 367 Gentransferprotokolle (Stand 1.12.1998), davon 326 therapeutische Protokolle für die klinische Testung registriert (Abb. 10.6), wobei die Anzahl in den ersten Jahren exponentiell zunahm (Abb. 10.7). Während sich der größte Teil der Programme zunächst mit der gentechnologischen Markierung von Zellen zum besseren Ver-

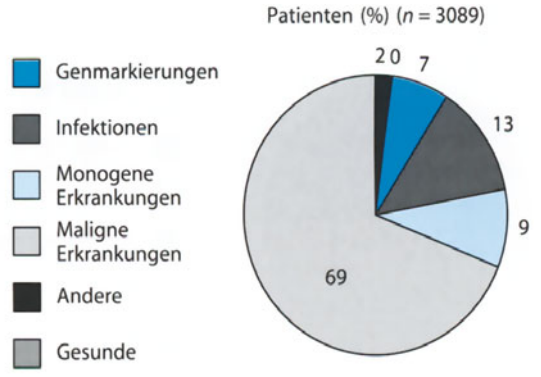
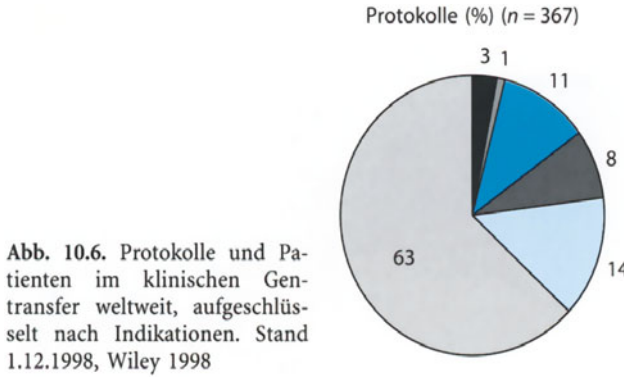


Abb. 10.6. Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach Indikationen. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

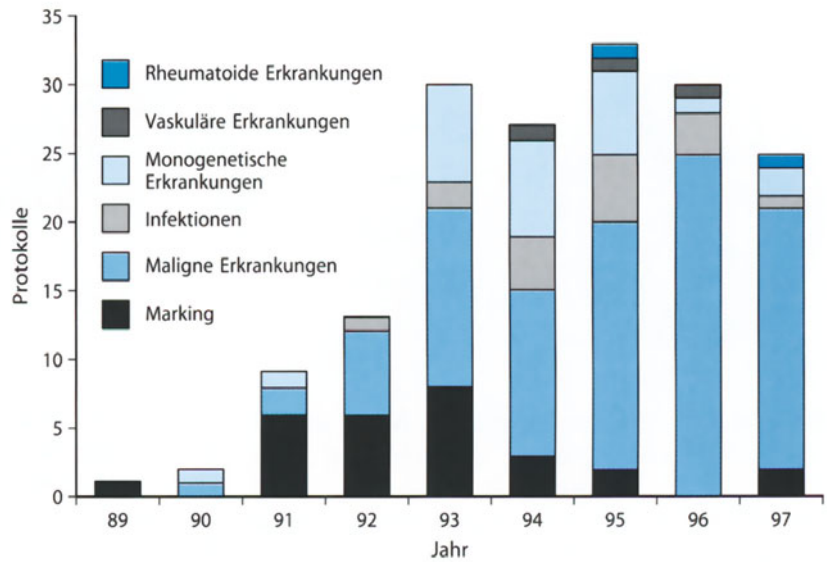


Abb. 10.7. Vom Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der National Institutes of Health (NIH) genehmigte Gentransferprotokolle, aufgeschlüsselt nach Indikationen. Entwicklung von 1989–1997. Stand 6/97

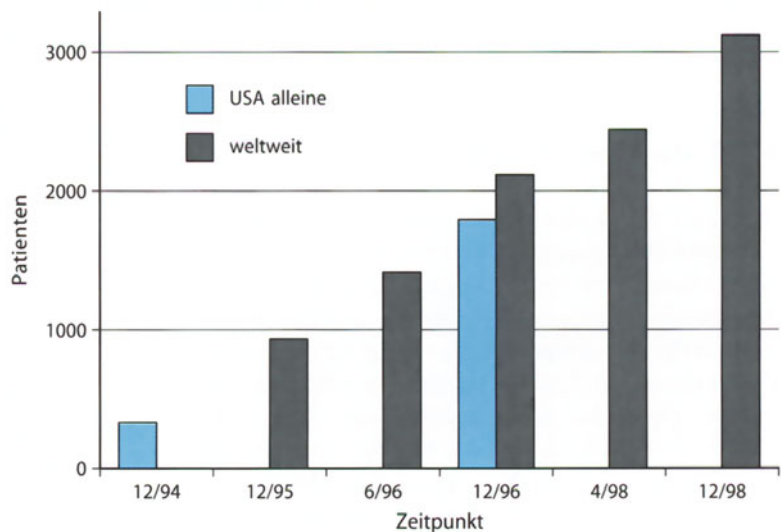
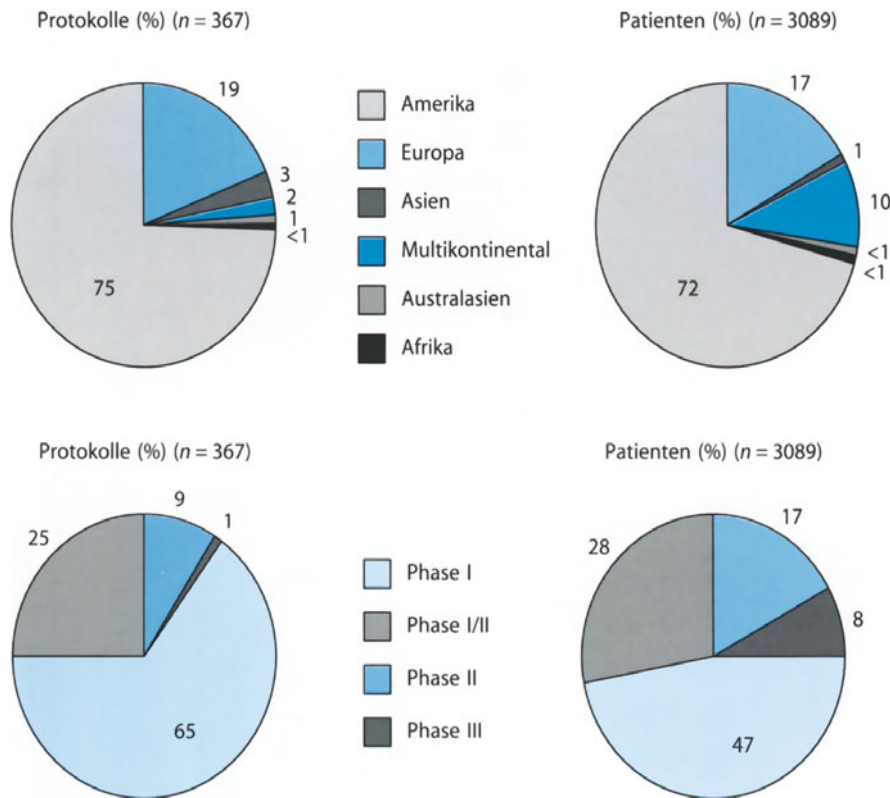


Abb. 10.8. Patienten, die bisher in den USA und weltweit Genterapie erhielten (TCM-Report 12/1996, Wiley 4/1998 und 12/1998)

ständnis von Tumorausbreitung und frühzeitiger Diagnosestellung beschäftigte, überwiegen heute die therapeutischen Studien (Abb. 10.7). Schwerpunkte bilden die Behandlungsversuche von malignen,

monogenen und infektiösen Erkrankungen, neuerdings finden sich jedoch auch Therapieansätze bei chronischen Erkrankungen aus dem kardiovaskulären und rheumatischen Formenkreis.



**Abb. 10.9.** Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach Kontinenten. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

**Abb. 10.10.** Protokolle und Patienten im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach klinischen Phasen. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

Bis zum 1.12.1998 wurden weltweit 3089 Patienten in die klinischen Studien eingeschlossen (Abb. 10.8, 10.9). Die überwiegende Anzahl von Studien befindet sich in Phase I, nur sehr wenige erreichten bisher Phase III (Abb. 10.10). Die meisten Behandlungen erfolgen erst seit Anfang 1995, dementsprechend wenige Daten sind über bisherige Erfolge verfügbar.

#### 10.4.1 Monogene Erkrankungen

Bis 1.12.1998 wurden 286 Patienten im Rahmen von 53 Protokollen genterapeutisch behandelt (Wiley 1998). Besonders bedeutend ist der Einsatz beim Adenosindeaminasemangel (*severe combined immunodeficiency disease*, SCID), beim CFTR-Mangel (Mukoviszidose), beim LDL-Rezeptor-Mangel (familiäre Hypercholesterinämie), beim Faktor-IX-Mangel (Hämophilie B) und bei der chronischen granulamatösen Krankheit. Ergebnisse liegen weiterhin bei der Fanconi-Anämie, beim Glukozerebrosidasemangel (Morbus Gaucher, synonym Glukosylzeramidlipidose) und beim Aspartozyklasemangel (Canavan-Krankheit) vor. Im Folgenden werden diese Erkrankungen einzeln abgehandelt. Weiterhin wurde die Genterapie auch beim Iduronosulfatsulfatasemangel (Morbus Hunter, synonym Mu-

kopolysaccharidose Typ II, 1 Studie, 1 Patient), bei der Hämophilie B (1 Studie, 4 Patienten), beim  $\alpha$ -Antitrypsin(AAT)-Mangel (1 Studie, 3 Patienten), bei der chronischen granulamatösen Krankheit (3 Studien, 8 Patienten), beim Ornithin-Transcarbamylase(OTC)-Mangel (1 Studie, 5 Patienten) und beim „*adult respiratory distress syndrome*“ (ARDS) aufgrund eines kongenitalen Mangels (mindestens 3 Patienten) eingesetzt. Für den Morbus Hurler, das Hunter-Syndrom, den Leukozytenadhärenzmangel, den Purinnukleosidphosphorylasemangel (PNP-Mangel) (schwerer selektiver T-Zell-Funktionsmangel), den  $\alpha$ -Iduronidase-Mangel (Morbus Hurler bei Kindern bzw. Scheie-Keratopathie bei Erwachsenen), den Fumarylazetoazetathydrolyasemangel (hereditäre Tyrosinämie) und die Mutation eines Gens der gewöhnlichen  $\gamma$ -Globulinkette (X-chromosomale Immundefizienz, *X-linked SCID*) wurden Protokolle entwickelt und genehmigt, in die jedoch bisher wahrscheinlich keine Patienten eingeschlossen wurden.

##### 10.4.1.1 Adenosindeaminasemangel

Am besten dokumentiert ist die Behandlung des Adenosindeaminasemangels beim schweren kombinierten Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency disease*, SCID).



**Pathogenese und Diagnose.** Dieses relative seltene Syndrom (1:100 000) ist durch eine weitreichende Funktionseinschränkung des humoralen und zellvermittelten Immunsystems gekennzeichnet. Die Folge ist eine erhebliche Anfälligkeit der betroffenen Kinder für gravierende bakterielle, virale und Pilzinfektionen mit oft tödlichem Ausgang. Die Krankheit ist in 25% der Fälle auf ein abnormales Adenosindeaminasegen zurückzuführen, wobei sie meist als ein autosomal-rezessiver Defekt vererbt wird, sporadisch kommt es auch zu Spontanmutationen. Betroffene Kinder überleben ohne Behandlung das 1. Lebensjahr meist nicht. Dieses Syndrom wurde mit unterschiedlichsten Fehlentwicklungen immunkompetenter Zellen in Verbindung gebracht, von denen einige auf spezifische enzymatische Fehlfunktionen zurückzuführen sind.

**Klinische Erscheinungsformen.** Das klassische Beispiel von SCID, die Schweizer Agammaglobulinämie, ist durch eine schwere Lymphopenie charakterisiert und wird durch einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus erworben. Die Fehlentwicklungen des B- und T-Zell-Systems kann durch einen genetischen Defekt im Immunglobulin und T-Zell-Rezeptor-Rekombinationsmechanismus (TCR-Rekombinationsmechanismus) verursacht werden. Selten kommt es auch durch Fehlbildungen in anderen hämatopoetischen Zelllinien zu einer SCID-Variante, der retikulären Dysgenese. Über die Hälfte der Patienten mit autosomal-rezessivem SCID weisen einen Defekt des Enzyms Adenosindeaminase (ADA) auf, das für den Purinmetabolismus von Wichtigkeit ist. Hierbei liegen entweder Deletionen oder Punktmutationen des ADA-Gens vor. Untersuchungen der pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen ADA-Mangel und abortiver Lymphoiddifferenzierung lassen vermuten, dass die Akkumulation von Adenosin- und Deoxyadenosinnukleotiden kritische metabolische Funktionen einschließlich der DNA-Synthese beeinträchtigt. Nach Behandlung mit exogenem ADA konjugiert mit Polyethylenglykol zur Verlängerung der Halbwertszeit wurde in einigen Patienten eine Verbesserung der klinischen und immunologischen Funktionen beobachtet. Der zelluläre Defekt der lymphopenischen Form von SCID liegt naturgemäß in den Vorläuferzellen sowohl für die T- als auch für die B-Zell-Linie. Die immunologischen Defekte dieses Typs von SCID-Patienten konnten durch die Transplantation von Knochenmark oder fetaler Leber als Ressourcen für Stammzellen repariert werden. Hiermit wurde die Hypothese bestätigt, dass Thymus und Knochenmark dieser Pa-

tienten tatsächlich in der Lage sind, die Differenzierung normaler Stammzellen zu ermöglichen.

Die Behandlung von SCID-Patienten erfolgt gewöhnlich nur in Zentren mit einem großen wissenschaftlichen Interesse an der Behandlung dieser Krankheit. Wichtig ist es, diese Patienten frühzeitig zu erkennen und die Impfung mit lebenden viralen Vakzinen und Bluttransfusionen zu vermeiden, da hierdurch fatale Graft-versus-host-Reaktionen verursacht werden können.

**Gentherapie.** Die SCID-Krankheit hat zwar schwerwiegende und vielseitige klinische Aspekte, ist jedoch aus dem genetischen Gesichtspunkt vergleichsweise einfach. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Transduktion eines funktionierenden humanen ADA-Gens in die Lymphozyten der betroffenen Patienten ausreichen könnte, eine signifikante klinische Verbesserung oder gar Heilung zu erzielen. Historisch gesehen handelte es sich hierbei auch um die 1. Gentherapiestudie überhaupt, die auf die Heilung einer Krankheit abzielte. Die vorangegangenen Genmarkierungsstudien hatten lediglich die Machbarkeit eines somatischen Gentransfers im Menschen gezeigt.

Der Beginn der Behandlung der ersten von insgesamt 16 SCID-Patienten im Rahmen von 7 Protokollen (Culver et al. 1991a; Blaese et al. 1995; Sakiyama 1996a; Sakiyama 1996b; Onodera et al. 1998, Kohn et al. 1993, 1998, Bordignon et al. 1995b, Hoogerbrugge et al. 1996) mittels retroviraler Gentherapie erfolgte am 14.9.1990. Ausgewählt wurden ADA-defiziente Kinder, bei denen alternative Therapien, wie die PEG-ADA-Verabreichung, bei der Wiederaufrichtung eines adäquaten Immunsystems versagt hatten. Die 4-jährige Ashanti DeSilva war somit die 1. Patientin, die am 14.9.1990 in den USA mittels Gentherapie behandelt wurde (Blaese et al. 1990, Culver et al. 1991a). Sie und die anderen Neonaten und Kinder erhielten wöchentliche Injektionen von ex vivo gentechnologisch veränderten, autologen Lymphozyten und/oder Knochenmarkzellen. Diese klinischen Studien sind inzwischen in Phase I/II, und zwar mit unterschiedlichen Target-Optionen: Lymphozyten, CD34<sup>+</sup>-Zellen und Blutstammzellen von Neugeborenen.

Für die Therapie der 1. langzeitbeobachteten Kinder von Blaese et al. (1995) wurden periphere Blutlymphozyten gewonnen und ex vivo expandiert. Sie wurden mit LASN infiziert, einem retroviralen Vektor, der das humane ADA-Gen unter der Kontrolle des MoMuLV-LTR-Promotors exprimiert. 9 Tage nach Amplifikation mit OKT3 und

IL-2 (IL-2) wurden 700 Mio. autologe Lymphozyten pro kg Körpergewicht infundiert. Dieser Vorgang wurde monatlich wiederholt und erfolgte zuletzt im Oktober 1992. Die frühere alternative Therapie mit PEG-ADA wurde mit 50% der ursprünglichen Dosis fortgeführt. Auf ähnliche Weise wie in der amerikanischen Studie erfolgte am 1.8.1995 auch die Behandlung 1 Kinds mit ADA-SCID in Japan (Sakiyama 1996 a,b, Onadera et al. 1998). 7 Tage nach Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten wurden 800 Mio. transduzierte Zellen infundiert, wobei mehrere dieser Infusionen bis Tag 34 erfolgten, an dem das Kind letztmalig 2,5 Mrd. transduzierte Zellen erhielt. Trotz der hohen Dosen wurde keine Toxizität beobachtet. Kohn et al. (1993) transduzierten und infundierten Plazenta- und Nabelschnurzellen, die natürlicherweise relativ reich an Blutstammzellen sind. Bordignon et al. (1995b) verwendeten 2 verschiedene retrovirale Vektoren, wobei ein Vektor für die Transduktion peripherer Blutzellen und der andere Vektor für die Transduktion von Knochenmarkzellen eingesetzt wurde. Somit konnte später der Ursprung der transduzierten Zellen im Patienten verfolgt werden. Auch Hoogerbrugge et al. (1996) zogen die Transduktion von Knochenmarkzellen vor.

Die Expression des transduzierten Gens konnte in bis zu 50% der Lymphozyten und 10% der Knochenmarkzellen nachgewiesen werden. Während die Expression in Lymphozyten aufgrund der begrenzten Lebensdauer derselben teilweise nur 1 Jahr anhielt (Bordignon et al. 1995b), teilweise auf einem Niveau von 10–20% ADA-positiven Zellen konstant blieb (Onadera et al. 1998), war die Expression in den Knochenmarkzellen noch nach mindestens 18 Monaten (Kohn et al. 1995) bzw. mindestens 3 Jahren stabil (Blaese et al. 1995; Bordignon et al. 1995b). Als günstig erwies sich die kombinierte Transduktion von peripheren Blutlymphozyten und Knochenmarkzellen, da ein schneller therapeutischer Erfolg durch Veränderung der Blutlymphozyten, die langanhaltende therapeutische Wirkung jedoch nur durch Integration des ADA-Gens in die Knochenmarkzellen erreicht werden können. Tatsächlich konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass während des 1. Therapiejahrs fast alle ADA-exprimierenden Lymphozyten von transduzierten peripheren Blutlymphozyten abstammen, später jedoch durch Lymphozyten ersetzt werden, die von dem transduzierten Knochenmark abstammen (Bordignon et al. 1995b).

2 Jahre nach der Behandlung von Neonaten mit Nabelschnur- und Plazentazellen exprimierten unterschiedliche Zelllinien die ADA-Sequenzen. 4

Jahre nach der Infusion von Nabelschnurzellen war die Zahl der ADA-positiven T-Lymphozyten auf 1–10% gestiegen, während andere hämatopoetische und lymphozytäre Zellen nur bei 0,01–0,1% lagen (Kohn et al. 1998). In 1 Kind war die Expression des substituierten Gens allerdings therapeutisch nicht ausreichend, sodass weiter PEG-ADA verabreicht werden musste.

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

#### 10.4.1.2 LDL-Rezeptor-Mangel

*Low-density-Lipoprotein* (LDL) hat die Funktion, eine Reihe von extrahepatischen Parenchymzellen wie Nebennierenrindenzellen, Lymphozyten und Nierenzellen mit Cholesterin zu versorgen. Diese Zellen tragen LDL-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. An diese Rezeptoren gebundenes LDL wird durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und in Lysosomen verdaut. Die Cholesterylesterbindungen von LDL werden durch eine lysosomale Cholesterylesterase hydrolysiert. Das hierdurch freigesetzte Cholesterin dient der Membransynthese, als Vorläufer für die Steroidhormonsynthese und als regulatorisches Molekül zur Suppression der Synthese neuer LDL-Rezeptoren. So wie im extrahepatischen Gewebe befinden sich auch in der Leber selbst zahlreiche LDL-Rezeptoren. Hier wird das LDL-Cholesterin zur Synthese von Gallensäuren und zur Herstellung von freiem Cholesterin verwendet, welches in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird. Im Menschen werden 70–80% des LDL über den LDL-Rezeptor-Weg aus dem Plasma entfernt. Ein großer Teil des verbleibenden LDL wird durch das Scavenger-Zell-System in phagozytischen Zellen des retikuloendothelialen System ab-

gebaut. Im Gegensatz zur rezeptorvermittelten LDL-Degradation wird angenommen, dass der Abbau über Scavenger-Zellen nur bei hohen Lipoproteinspiegeln eintritt und nicht primär zur Versorgung der Zellen mit Cholesterol dient.

Durch eine Mutation des Gens für den LDL-Rezeptor kommt es in etwa 1 von 500 Personen zu der weit verbreiteten, autosomal-dominanten familiären Hypercholesterinämie. Bei heterozygoten Trägern manifestiert sich dieser Gendefekt mit einer 2- bis 3fachen Erhöhung des Gesamtcholesterinspiegels im Serum, die auf eine Erhöhung des Serum-LDL-Spiegels zurückzuführen ist. Patienten mit 2 mutierten LDL-Rezeptor-Genen (Homozygote für familiäre Hypercholesterinämie) haben 6- bis 8fach erhöhte LDL-Cholesterin-Spiegel.

**Klinisches Erscheinungsbild.** Heterozygote mit familiärer Hypercholesterinämie können bereits zum Zeitpunkt der Geburt diagnostiziert werden: das Umbilikalblut enthält bereits 2- bis 3fach erhöhte LDL-Konzentrationen und dementsprechend erhöhte Gesamtcholesterinspiegel. Die erhöhten Plasma-LDL-Spiegel persistieren lebenslang, zu Symptomen kommt es typischerweise jedoch nicht vor der 3. oder 4. Lebensdekade. Das wichtigste Kennzeichen ist das Auftreten einer vorzeitigen und erheblich akzelerierten Koronarsklerose, assoziiert mit einer abnormal hohen LDL-HDL-Ratio. Myokardinfarkte beginnen in den betroffenen Männern ab der 3. Dekade aufzutreten, mit einem Gipfel in der 4. und 5. Lebensdekade. Mit dem 60. Lebensjahr haben etwa 85% der Betroffenen einen Myokardinfarkt durchgemacht. Auch in Frauen ist die Inzidenz von Myokardinfarkten vermehrt, die jedoch im Mittel etwa 10 Jahre später als bei Männern auftreten. Heterozygote dieser Erkrankung machen etwa 5% aller Patienten mit Myokardinfarkten aus.

Xanthome im Bereich von Sehnen stellen die zweitwichtigste klinische Manifestation von Heterozygoten dar. Es handelt sich dabei um knotenartige Schwellungen, die typischerweise an der Achillessehne und anderen Sehnen im Bereich des Knies, des Ellbogens und des Handrückens auftreten. Sie werden durch Ablagerungen von aus LDL stammenden Cholesterylestern in Gewebsmakrophagen verursacht. Durch die Einlagerung von Lipidtröpfchen sind die Makrophagen geschwollen und werden zu Schaumzellen. Cholesterol wird auch im weichen Gewebe von Augenlidern (Xanthelasma) und in der Kornea (Arcus corneae) abgelagert. Während Sehnenxanthome pathognomonisch für die familiäre Hypercholesterinämie sind,

treten Xanthelasma und der Arcus corneae auch in vielen Erwachsenen mit normalen Serumlipidspiegeln auf. Die Inzidenz von Sehnenxanthomen steigt mit dem Alter, und bis zu 70% der Heterozygoten weisen dieses Symptom auf. Auf der anderen Seite schließt das Nichtvorhandensein von Sehnenxanthomen eine familiäre Hypercholesterinämie nicht aus.

Etwa 1 von 1 Mio. Personen der Gesamtbevölkerung ererbt 2 Kopien des Gens für die familiäre Hypercholesterinämie und ist somit homozygot für diese Fehlbildung. Die Betroffenen haben ebenfalls von der Geburt an erheblich erhöhte Serum-LDL-Spiegel. Eine einzigartige Form von plantaren Hautxanthomen ist oft bereits bei der Geburt präsent oder entwickelt sich in den ersten 6 Lebensjahren. Diese Xanthome sind erhabene, gelbliche, plaqueähnliche Läsionen, die bevorzugt an Stellen mit Hautverletzungen entstehen, v.a. an Knien, Ellbogen und der Glutäalregion. Fast immer kommen Xanthome auch in den Zwischenfingerräumen der Hände, v.a. zwischen Daumen und Zeigefinger vor. Sehnenxanthome, Arcus corneae und Xanthelasma sind ebenfalls typisch. Die Koronarsklerose beginnt sich oft bereits vor dem 10. Lebensjahr klinisch bemerkbar zu machen. Über Myokardinfarkte im Alter von 18 Monaten wurde berichtet. Außerdem kann es durch Cholesteroleinlagerungen in der Aortenklappe zu symptomatischen Aortenklappenstenosen kommen. Homozygote versterben oft bereits vor dem 20. Lebensjahr an den Komplikationen von Myokardinfarkten.

**Pathogenese.** Der zugrunde liegende Defekt liegt im LDL-Rezeptor-Gen. Untersuchungen an Betroffenen zeigten, dass in diesem Locus wenigstens 150 Mutationsallele erscheinen. Diese können in 3 verschiedene Klassen eingeteilt werden. Am weitesten verbreitet ist die rezeptornegative Form, wobei hier ein nichtfunktionierendes Genprodukt vorliegt. Bei der zweithäufigsten Mutante mit Rezeptordefekt besitzt der Rezeptor 1-10% der normalen LDL-Bindungsaktivität, während bei der 3. Form ein „Internalisierungsdefekt“ vorliegt, wobei der Rezeptor in der Lage ist, LDL normal zu binden, jedoch nicht in der Lage ist, das rezeptorgebundene Lipoprotein in die Zelle zu transportieren. Phänotypisch Homozygote besitzen 2 Mutationsallele am LDL-Rezeptor-Locus, sodass ihre Zellen eine komplette oder nahezu vollständige Unfähigkeit zur LDL-Bindung oder -Aufnahme aufweisen. Heterozygote haben ein normales und ein mutiertes Allel am LDL-Rezeptor-Locus, weshalb

ihre Zellen noch etwa 50% der normalen Bindungs- bzw. Aufnahmeleistung aufweisen.

Aufgrund der Reduktion der LDL-Rezeptor-Aktivität wird der LDL-Katabolismus gehemmt, wodurch die Serum-LDL-Spiegel invers zur Verminderung der LDL-Rezeptoren ansteigen. Zusätzlich zum gestörten LDL-Katabolismus ist die LDL-Produktion vermehrt. Die vermehrte LDL-Produktion wird auf den Mangel an LDL-Rezeptoren auf Leberzellen zurückgeführt. Die Leber ist nicht in der Lage, *Intermediate-density-Lipoprotein* (IDL) wie gewöhnlich aus dem Plasma zu entfernen, wodurch vermehrt IDL zu LDL konvertiert wird. Diese Überproduktion von LDL kombiniert mit einem wenig effektiven Katabolismus führt zu den hohen Serumspiegeln in den betroffenen Patienten. Diese erhöhten LDL-Spiegel führen zu einer vermehrten Aufnahme durch Scavenger-Zellen, die sich an verschiedenen Lokalisationen des Körpers ansammeln und Xanthome formieren.

Die akzelerierte Koronarsklerose in Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie wird durch die hohen LDL-Spiegel verursacht, die im Anschluss an Episoden endothelialer Verletzungen zu einer verstärkten Infiltration von LDL in die Arterienwand führen. Die großen Mengen von LDL, die die Arterienwand durchdringen, können durch Scavenger-Zellen nicht ausreichend aus dem Interstitium entfernt werden, sodass es schließlich zur Arterioskleroseentwicklung kommt. Einige der Lipide des LDL können oxidiert werden, wenn das Lipoprotein in die Arterienwand eintritt, wobei die daraus resultierenden Produkte für Endothelzellen toxisch sein können und somit den Prozess u.U. noch weiter beschleunigen. Hohe LDL-Spiegel können auch zu einer vermehrten Plättchenaggregation im Bereich endothelialer Verletzungen führen, wodurch das Wachstum von arteriosklerotischen Plaques verstärkt wird.

**Diagnose.** Als Kriterium für die Diagnose der heterozygoten familiären Hypercholesterinämie wurde die isolierte Erhöhung von Serumcholesterinspiegeln bei normalen Triglyzeridkonzentrationen vorgeschlagen. Solch eine isolierte Cholesterinerhöhung ist gewöhnlich auf eine alleinige Erhöhung des LDL zurückzuführen (Typ-IIa-Muster). Die meisten Menschen jedoch, die in der allgemeinen Bevölkerung eine Hyperlipoproteinämie vom Typ IIa aufweisen, leiden nicht an einer familiären Hypercholesterinämie. Bei ihnen liegt vielmehr eine Form der polygenetischen Hypercholesterinämie vor, weshalb sie Cholesterinspiegel im oberen Bereich der glockenartigen Kurve für die allgemeine

Bevölkerung aufweisen. Die Typ-IIa-Hyperlipoproteinämie wird auch durch Hyperlipidämien vom multiplen Lipoproteintyp sowie durch familiäre Apolipoprotein-B100-Defekte verursacht. Weiterhin können auch eine Reihe metabolischer Störungen einschließlich Hypothyreose und nephrotisches Syndrom einer Hypolipoproteinämie vom Typ IIa zugrunde liegen.

Unter den Menschen mit Hypolipoproteinämie vom Typ IIa lassen sich diejenigen mit familiärer Hypercholesterinämie von denen mit polygenetischer Hypercholesterinämie und vom multiplen Lipoproteintyp auf verschiedene Weise unterscheiden. Bei familiärer Hypercholesterinämie sind die Cholesterinspiegel tendenziell höher. Ein Serumspiegel von 350–400 mg/dl ist sehr verdächtig für eine heterozygote familiäre Hypercholesterinämie. Viele Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie haben Cholesterinspiegel zwischen 285 und 350 mg/dl, einem Bereich, in dem andere Störungen des Fettstoffwechsels nicht ausgeschlossen werden können. Das Auftreten von Sehnenxanthomen allerdings beweist geradezu die Diagnose der familiären Hypercholesterinämie, da solche Xanthome bei anderen Formen der Hyperlipidämie gewöhnlich nicht auftreten. In Fällen, in denen Zweifel bezüglich der Diagnose bestehen, sollten auch andere Familienmitglieder untersucht werden. Bei familiärer Hypercholesterinämie zeigen die Hälfte der Verwandten 1. Grads ebenfalls erhöhte Serumcholesterinspiegel. Die Hypercholesterinämie ist besonders dann richtungsweisend, wenn sie in Kindern auftritt, da erhöhte Cholesterinspiegel in der Kindheit besonders typisch für die familiäre Hypercholesterinämie und nicht für andere Störungen sind.

Ungefähr 10% der Heterozygoten mit familiärer Hypercholesterinämie zeigen gleichzeitig eine Erhöhung der Serumtriglyzeridspiegel (Typ-IIb-Muster). In diesen Fällen ist die familiäre Hypercholesterinämie schwer von der Hyperlipidämie vom multiplen Lipoproteintyp zu unterscheiden. Finden sich ein Sehnenxanthom oder ein hypercholesterinämisches Kind in der Familie, kann meist die Diagnose der familiären Hypercholesterinämie gestellt werden.

Die heterozygote familiäre Hypercholesterinämie vom familiären Apo-B100-Defekt zu unterscheiden, ist schwieriger. Letzterer wird durch eine Missense-Mutation der Aminosäure 3500 im Apo B100 verursacht. Diese Mutation beeinflusst die Fähigkeit der Bindung von Apo B100 an LDL-Cholesterin-Rezeptoren, was schließlich in einer Hypercholesterinämie resultiert. Betroffene Heterozy-

gote haben oft eine positive Familienanamnese mit Hypercholesterinämie, Koronarsklerose und Sehnenxanthomen. Der einfachste Weg, diese Störung von der familiären Hypercholesterinämie zu unterscheiden, ist der Direktnachweis der Apo-B100-Mutation mittels auf PCR basierenden molekularbiologischen Techniken.

Die Diagnose der homozygoten familiären Hypercholesterinämie bereitet gewöhnlich keine Schwierigkeiten, sofern der behandelnde Arzt mit dem klinischen Bild vertraut ist. Die meisten der Patienten werden in der Kindheit wegen Xanthomen der Haut zuerst einem Dermatologen vorgestellt. Gelegentlich verzögert sich diese Vorstellung bis zum Auftreten von Angina pectoris oder einer kindlichen Synkope aufgrund einer xanthomatösen Aortenstenose. Findet sich bei einem Kind ohne Ikterus ein Cholesterinspiegel von >600 mg/dl, ist dies bei normalen Triglyzeridspiegeln hochverdächtig für die Diagnose der homozygoten familiären Hypercholesterinämie. Beide Eltern sollten dann auch erhöhte Serumcholesterinspiegel oder andere Zeichen einer familiären Hypercholesterinämie aufweisen.

In spezialisierten Laboratorien kann die Diagnose der heterozygoten und homozygoten familiären Hypercholesterinämie durch die direkte Messung von LDL-Rezeptoren auf kultivierten Hautfibroblasten oder frisch isolierten Blutlymphozyten gestellt werden. Die homozygote familiäre Hypercholesterinämie wurde *in utero* aufgrund der Abwesenheit von LDL-Rezeptoren auf kultivierten Fruchtwasserzellen diagnostiziert. Die mutierten Gene für den LDL-Rezeptor können auch durch Restriktionsenzymanalyse, Southern-Blot oder PCR-Analyse genomischer DNA sichtbar gemacht werden.

**Gentherapie.** Bei bisher 5 Patienten mit homozygotem LDL-Rezeptor-Mangel erfolgte seit dem 11.1.1991 die Behandlung der familiären Hypercholesterinämie mittels Transfer des Gens für den LDL-Rezeptor. Grossmann et al. (1994) publizierten den Fall eines 29-jährigen Patienten ohne funktionstüchtiges LDL-Gen. Autologe Hepatozyten wurden durch partielle Hepatektomie gewonnen und für den Gentransfer kultiviert. Die Zellen wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor, der das Wildtypgen für den LDL-Rezeptor unter der Kontrolle eines Zytomegalievirus-Enhancers und des  $\beta$ -Aktin-Promotors des Hühnchens exprimierte, inkubiert. 3 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen in die *V. mesenterica inferior* injiziert. Dieser Patient war der 1. von 5 Patien-

ten, die auf diese Art und Weise behandelt wurden (Grossmann et al. 1995). Die Vektor-DNA wurde 4 Monate nach dieser 1-maligen Behandlung mittels In-situ-Hybridisierung in Leberbiopsien nachgewiesen. Es wurde keine immunologische Reaktion gegen diesen Autograft nachgewiesen.

Als Zeichen der partiellen Korrektur konnte im 1. Patienten eine Senkung des LDL-Cholesterinspiegels und der LDL-HDL-Ratio stabil über 18 Monate bewirkt werden, wobei die LDL-HDL-Ratio von vor der Behandlung 10 auf danach 5 zurückging (Grossman et al. 1994, Wilson 1995). Klinisch kam es zu keinem Fortschreiten der koronaren Herzkrankheit während der 18-monatigen Nachbeobachtungszeit. Leberbiopsien mehrere Monate nach Reinfusion der modifizierten Hepatozyten in die Patienten zeigten, dass höchstens 5% der gesamten Leberzellpopulation das normale Gen *in vivo* exprimierten (Grossman et al. 1994, Wilson 1995). Trotz dieser minimalen Korrektur konnten in einigen der Genempfänger Veränderungen in LDL-abhängigen Parametern beobachtet werden, die darauf schließen lassen, dass die LDL-Rezeptor-Funktion der Leber teilweise wiedergewonnen wurde.

#### 10.4.1.3 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose, auch Zystische Fibrose genannt, ist eine autosomal-rezessive Störung von exokrinen Drüsen, die typischerweise in der Lunge zu einer Ansammlung von zähflüssigem Schleim, bakteriellen Infektionen und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung mit ausgeprägten Bronchiektasen und parenchymalen Umorganisationen führen.

**Pathogenese.** Es handelt sich um die häufigste tödlich verlaufende genetische Störung, die die kaukasische Rasse betrifft: bei etwa 1 von 2500 Lebendgeborenen von Kaukasiern, 1 von 17000 Schwarzen Amerikanern und 1 von 90000 hawaiianischen Asiaten wird Mukoviszidose diagnostiziert. Das betroffene Gen ist das CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*), lokalisiert innerhalb von etwa 300 kb innerhalb der q21-31-Region von Chromosom 7. Extensive Analysen des CFTR-Gens führten zur Identifizierung von mehr als 200 Mutationen, die meisten davon in den 27 enkodierenden Exons des 250-kb-Gens. Eine Mutation, eine In-Phasen-Deletion des Kodons für Phe508 ist für 50-80% aller Mukoviszidosenallele verantwortlich.

Die Sequenz des CFTR-Gens lässt darauf schließen, dass es für ein Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von 168 000 kodiert, das die Plasmamembran umfassen kann und 2 Domänen, die Adenosintriphosphat binden können, und 1 phosphorylierte Domäne enthält. Es konnte gezeigt werden, dass das CFTR-Protein als ein cAMP-regulierter chloridsezernierender Kanal auf der apikalen Oberfläche epithelialer Zellen funktioniert, wobei es auch andere Funktionen übernehmen kann. Ist das CFTR-Gen mutiert, verfügt die Zelle durch fehlerhafte CFTR-Protein-Herstellung und intrazelluläre Degradation nur über eine unzureichende CFTR-Funktion, was die Pathogenese der Erkrankung bedingt. Messungen von elektrischen Potentialen über trachealem Epithel ergeben bei Mukoviszidosehomozygoten höhere Spannungsunterschiede als bei normalen Menschen, übereinstimmend mit der bekannten Störung des Elektrolyttransports. Werden Mukoviszidosepatienten lungentransplantiert, sind diese abweichenden Potentialunterschiede nicht mehr nachweisbar. Ähnlich den In-vivo-Messungen zeigen auch kultivierte Epithelzellen von Mukoviszidosepatienten abnorme Potentialunterschiede, wobei sie nicht in der Lage sind, Chlorid in normaler Weise an die apikale Oberfläche zu transportieren. Die aus oben beschriebenen Beobachtungen zum Ausdruck kommenden Abnormalitäten des Mukoviszidosegens in Epithelzellen verursachen als der Mukoviszidose zugrunde liegende Störung eine Dysfunktion der Regulation der Chloridkanäle der Luftwegepithelien. Es wird vermutet, dass der Defekt der cAMP-vermittelten Chloridkanalfunktion durch Modifikation der Menge und der Zusammensetzung von aus Luftwegepithelien freigesetzter Flüssigkeit zur pulmonalen Manifestation der Mukoviszidose führt. Es wird angenommen, dass es so zu einer Veränderung der Schleimzusammensetzung und somit zu einer Beeinträchtigung der mukoziliären Reinigungsmechanismen kommt, was schließlich zu einer chronischen Infektion, Entzündung und Veränderung der Luftwege führt.

**Klinisches Erscheinungsbild.** Die Mukoviszidose ist eine monogene Erkrankung, die sich als Multisystemerkrankung präsentiert: Neben chronischen Luftweginfektionen, die schließlich zu Bronchiektasen und Brochiolektasen führen, kommt es zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, zu einer abnormalen Schweißdrüsenfunktion und zu einer urogenitalen Dysfunktion. Die ersten Zeichen und Symptome erscheinen typischerweise in der Kindheit, etwa 3% der Patienten werden erst im Er-

wachsenalter diagnostiziert. Aufgrund von Verbesserungen in der konventionellen Therapie erreichen mehr als 25% der Patienten das Erwachsenenalter und mehr als 9% werden älter als 30 Jahre. Somit ist die Mukoviszidose nicht mehr ausschließlich eine pädiatrische Erkrankung.

**Organspezifische Pathophysiologie.** Es gibt volumensabsorbierende (Luftwege und Darm), salzabsorbierende (Schweißdrüsen) und volumensezernierende (Pankreas) Epithelien, wobei die Mutation des CFTR-Gens unterschiedliche Konsequenzen hat.

**Lunge.** Der diagnostische biophysikalische Eckpfeiler der Mukoviszidose ist der erhöhte transepitheliale elektrische Potentialunterschied in Luftwegepithelien. Der transepitheliale Potentialunterschied ist eine Resultierende aus der aktiven Ionentransportrate und dem Widerstand von Oberflächenepithelien gegen den Ionenfluss. Mukoviszidoseepithelien sind durch eine erhöhte Transportrate für Natrium und eine erniedrigte Permeabilität für Chloridionen gekennzeichnet. Zugrunde liegt eine mutationsbedingte fehlerhafte Regulation des Chloridtransports, wobei Mukoviszidoseepithelien nicht durch  $\beta$ -Sympathomimetika oder durch Aktivatoren von Proteinkinase C stimuliert werden können. Beobachtet wurde die Expression eines alternativen Chloridkanals, der von CFTR verschieden ist und durch intrazelluläre Kalziumspiegel oder extrazelluläre Triphosphatnukleotide, wie z.B. UTP, reguliert wird. Dieser Kanal kann CFTR in Bezug auf den Nettochloridtransport ersetzen. Ein weiteres, eher seltenes Kennzeichen von Mukoviszidoseepithelien ist die erhöhte Natriumresorption, die offensichtlich auf volumenabsorbierende Epithelien beschränkt ist. Die Natriumhyperabsorption ist teilweise eine Folge einer gesteigerten Aktivität des apikalen membranösen Natriumkanals. Die zentrale Hypothese zur Erklärung der Pathophysiologie von Mukoviszidoseepithelien besagt, dass aufgrund der abnormalen Natrium- und Chloridtransportraten dehydriertes Sekret produziert wird, welches kaum entfernt werden kann. Die für die Krankheit typische und einzigartige Prädisposition für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* lässt vermuten, dass noch andere, bisher nicht definierte Abnormalitäten der Oberflächenflüssigkeiten der Luftwege ein Versagen der Abwehr der Lunge gegenüber bestimmten Infekten bewirken.

**Gastrointestinaltrakt.** Es gibt unterschiedliche gastrointestinale Auswirkungen. Im exokrinen Pankreas scheint die Abwesenheit des CFTR-Chloridkanals in der apikalen Membran des Epithels des Ductus pancreaticus die Funktion eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers zu beeinträchtigen und somit die Nettosekretion von Bikarbonat und Natrium (durch einen passiven Vorgang) in den Ductus. Ein Versagen der Sekretion von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und Wasser führt zu einer Retention von Enzymen im Pankreas und schließlich zu einer Zerstörung nahezu des gesamten Pankreasgewebes. In intestinalen Epithelien von Mukoviszidosepatienten ist aufgrund eines Mangels an Wasser- und Chloridsekretion die Fähigkeit, sezernierte Muzine und andere Makromoleküle aus intestinalen Krypten zu spülen, beeinträchtigt. Dieser Prozess kann letztendlich zu einer Obstruktion von Dünn- und Dickdarm führen. Im hepatobiliären System kommt es durch eine fehlerhafte Chlorid- und Wassersekretion in den *Ductus hepaticus* zu einer Retention der biliären Sekretion, fokalen biliären Zirrhose und Gallengangproliferation in etwa 25–30% der Mukoviszidosepatienten. Die Unfähigkeit des Mukoviszidosegallenblasenepithels, Salz und Wasser zu sezernieren, führt zu chronischer Cholezystitis und Cholelithiasis.

**Schweißdrüsen.** Mukoviszidosepatienten sezernieren nahezu normale Volumina von Schweiß in die *Acini* der Schweißdrüsen, sind jedoch unfähig, NaCl aus dem Schweiß auf dem Weg durch die Drüsengänge zu resorbieren. Der Defekt in der duktaalen Funktion besteht in der Unfähigkeit, Chlorid über die chloridundurchlässigen duktaalen Epithelien zu absorbieren.

**Diagnose.** Aufgrund der vielfältigen Genmutationen des CFTR-Gens dient die DNA-Analyse nicht zur primären Diagnosestellung, diese erfolgt durch eine Kombination von klinischen Kriterien und dem Schweißtest mit der Messung der Chloridausscheidung. Die Chlorid- und Natriumkonzentrationen im Schweiß sind altersabhängig, wobei eine Chloridkonzentration  $>70$  mEq/l bei Erwachsenen typisch für einen Mukoviszidosepatienten ist. Es ist jedoch anzunehmen, dass in Zukunft auch DNA-Analysen mehr Bedeutung erlangen werden. Derzeit liegen jedoch noch keine ausreichenden Genotyp-Phänotyp-Relationen vor. Lediglich für den homozygoten Phe508-Mangel konnte ein eindeutiger Zusammenhang mit Pankreasinsuffizienz festgestellt werden, wobei bezüglich der pulmonalen Manifestationen keine eindeutige Voraussage

gemacht werden kann. Bisher wird bei der Neugeborenenendiagnostik kein DNA-Screening auf Mukoviszidose verwendet. Zwischen 1 und 2% der Patienten mit klinischer Manifestation der Mukoviszidose zeigen im Schweißtest normale Chloridwerte. Bei den meisten dieser Patienten sind jedoch die nasal gemessenen transepithelialen Potentialunterschiede in den diagnostischen Bereich der Mukoviszidose erhöht, und die Sekretion der *Acini* der Schweißdrüsen wird durch injizierte  $\beta$ -Sympathomimetika nicht beeinflusst. Eine einzelne Mutation des CFTR-Gens, 3789+10 kb G:T, ist mit etwa 50% der Mukoviszidosepatienten mit negativem Schweißtest assoziiert.

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

Die Machbarkeit des adenoviralen Gentransfers wurde erstmals am 17.4.1993 an 4 Patienten im Rahmen einer US-amerikanischen klinischen Studie getestet (Crystal et al. 1994). Hierfür wurden 2 Mrd. Ad-CFTR-Vektor-*Plaque-forming-Units* (pfu) über die nasalen bzw. bronchialen Epithelien verabreicht. 7 Tage nach der Behandlung konnten RNA und Protein von CFTR in 14% der Epithelzellen eines Patienten und CFTR-RNA allein in 1 anderen Fall nachgewiesen werden. Nach 10 Tagen war die Expression des transferierten Gens nicht mehr nachweisbar.

In einer anderen Studie verabreichten Zabner et al. (1993) gelösten Ad-CFTR-Vektor durch Kontakt mit Nasenepithelien. Vorübergehend kam es zu einer partiellen Korrektur in allen 3 behandelten Patienten. Die vor der Behandlung gemessene erhöhte transepitheliale Spannung verringerte sich nach der Behandlung gegen Normal. Bei diesen Untersuchungen war es nicht möglich, die genaue Wirkdauer der Therapie zu bestimmen, da zu wenige Zellen mittels Biopsien gewonnen wurden, um CFTR-Protein oder -RNA nachweisen zu können.

In einer ähnlichen Untersuchung, in die 12 Patienten eingeschlossen wurden, konnte durch Bou-

cher et al. (1994) die Expression durch den Nachweis von CFTR-RNA bestätigt werden. Eine transepitheliale Spannungsnormalisierung wurde ebenfalls beobachtet.

Im Rahmen einer Phase-I-Studie, die in Frankreich von Bellon et al. (1997) durchgeführt wurde, wurde erneut der von Crystal et al. (1994) verwendete Ad-CFTR-Vektor eingesetzt, diesmal in steigenden Dosen über 2 Tage und in 3 verschiedenen Dosierungsschemen, wobei alle Patienten mit dem Kontrollpuffer vorbehandelt wurden. Im Rahmen der Behandlung wurde der Vektor zuerst auf die nasale Mukosa aufgebracht und anschließend über ein Aerosol in die Lunge verteilt. Während der Nachbeobachtung wurden Schleimhautveränderungen mittels Bronchoskopie ausgeschlossen. Interessanterweise erhöhten sich im Rahmen der Virusvektoradministration die adenoviralen Antikörperspiegel nicht, auch die bronchoalveoläre Lavage war frei von diesen Antikörpern. Vor der Therapie waren weder Ad-CFTR-DNA mittels PCR noch Ad-CFTR-mRNA mittels RT-PCR noch Ad-CFTR-Protein mittels Immunzytochemie nachweisbar. Nach der Behandlung dagegen fanden sich

- Ad-CFTR-DNA über mindestens 21 Tage lang in Nasenbürstenbiopsien bzw. über mindestens 15 Tage lang in bronchialen Proben,
- Ad-CFTR-mRNA mindestens 15 Tage lang in den Nasen aller Patienten und 14 Tage lang in den bronchialen Bürstenpräparaten 1 Patienten sowie
- CFTR-Protein über 15 Tage in allen nasalen Proben und 7 Tage lang in bronchialen Proben von 2 Patienten.

Interessanterweise fand sich keine Korrelation zwischen der verabreichten Vektordosis und der Anzahl CFTR-positiver Zellen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studien ließ sich adenoviral in einigen Fällen über kurze Zeit (7–10 Tage) eine komplette Korrektur des Proteinmangels, meist jedoch nur eine Verbesserung des Chloridtransports auf etwa 25% der Norm erreichen. Niedrige Dosen erwiesen sich oft als ineffizient, und hohe Dosen führten teilweise zu massiven lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen. Hierbei wurde über Fieber, Tachykardie, Hypotonie, Hypoxämie und Lungeninfiltrate aufgrund einer alveolären Entzündung auf der Seite der Vektoradministration mit Verminderung der vitalen und der totalen Lungenkapazität berichtet (Crystal et al. 1995, McElvaney et al. 1995), die allerdings trotz hoher Dosen nicht von allen Gruppen beobachtet wurde (Bellon et al.

1997, Welsh et al. 1995, Zabner et al. 1993). Virale Replikation oder virusassoziierte Toxizität wurden nicht gesehen.

Andere Arbeitsgruppen berichteten über den molekularen Nachweis des erfolgreichen Gentransfers ohne funktionelle Korrektur im Sinn einer Veränderung des Chloridtransports, gerade bei denjenigen Patienten, die die höchsten Virusdosen erhielten. Diese Patienten hatten starke lokale Entzündungsreaktionen mit dem Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen Adenoviren im Serum (Boucher et al. 1994, Knowles et al. 1995). Die Wirkdauer war mit maximal 9 Tagen relativ kurz (Crystal et al. 1994, Hay et al. 1995, McElvaney und Crystal 1995), sodass wiederholte Applikationen erforderlich sind, die zu einer Sensibilisierung gegen diese ohnehin humanpathogenen Viren führen können. Hohe primäre und sekundäre Antikörperspiegel gegen Adenoviren können wiederum die Effektivität des adenoviralen Gentransfers verringern. Primäre Antikörper gegen Adenoviren wurden bei 50% der 2-jährigen und 95% der 16- bis 34-jährigen Patienten nachgewiesen (Huebner et al. 1954). Sekundäre Antikörperspiegel sind weniger gegen die therapeutische Genexpression als vielmehr gegen adenovirale Kapsidproteine gerichtet (Ginsberg et al. 1984, Horowitz et al. 1990). Der wiederholte adenovirale Gentransfer des CFTR-Gens in 6 Patienten wurde gut vertragen (Zabner et al. 1996, Bellon et al. 1997). Alle Patienten waren initial seropositiv, entwickelten jedoch eine zusätzliche humorale Immunantwort. In einigen der Patienten konnte wiederum eine partielle Korrektur des Chloridtransports im Epithel der Luftwege erreicht werden, allerdings war der therapeutische Effekt mit wiederholter Gabe weniger wirkungsvoll, wohl am ehesten aufgrund einer verstärkten Immunantwort.

Um eine ausreichende Effizienz des Gentransfers unter Vermeidung immunologischer Reaktionen zu erreichen, wandten sich verschiedene Gruppen verstärkt auch dem liposomalen Transfer des CFTR-Gens zu. In einer doppelblinden Studie, die in England von Caplen et al. (1995) durchgeführt wurde, erhielten 15 Patienten intranasal DC-Chol/DOPE-kationische Liposomen entweder alleine als Kontrolle oder als Komplex mit dem Expressionsvektorplasmid von CFTR unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Bei 9 Patienten konnte eine partielle bis hin zu einer nahezu kompletten Korrektur von transepithelialer Spannung und Ionen transport mit einem Maximum nach 3 Tagen und einem Rückgang zum Ausgangsspiegel nach 7 Tagen beobachtet werden. Die Kontrollpa-



tienten besserten sich hingegen nicht. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (Caplen et al. 1995). Interessanterweise wurde bei den meisten Patienten zwar Plasmid-DNA und mRNA detektiert, ohne dass dieser Nachweis jedoch mit dem funktionellen Ergebnis korrelierte. Gill et al. (1997) untersuchten weitere 12 Patienten, ebenfalls im Rahmen einer doppelblinden, plazebokontrollierten Studie. 8 der Patienten erhielten CFTR-Vektor-DNA unter der Kontrolle eines RSV-Promotors und 4 Patienten Plazebovektor, bei dem das CFTR-Gen deletiert war. Der Vektor wurde jeweils als Komplex mit DC-Chol/DOPE-Liposomen intranasal eingebracht. Nasale Biopsien 7 Tage nach dem Transfer waren unauffällig. Ein spezieller fluoreszenzmikroskopischer Assay zeigte die CFTR-Funktion in 5 von 8 behandelten Patienten und in keinem der Plazebopatienten. Weiterhin hatten 2 Patienten nach der Therapie eine funktionelle Korrektur bei der Messung nasaler Potentiale, 1 von ihnen über 15 Tage. Elektrophysiologische Messungen, die ex vivo durchgeführt wurden, zeigten sogar eine Verbesserung in insgesamt 6 Patienten. Die Therapie wurde insgesamt gut vertragen, insbesondere ohne Erhöhung von Antikörper- oder Komplementspiegeln (Gill et al. 1997). Auch die 3. liposomale Studie von Porteous et al. (1997) erfolgte doppelblind und plazebokontrolliert sowie randomisiert. Von 16 Patienten erhielten 8 eine einzige nasale Aerosolverabreichung eines CMV-Promotor-CFTR/DOTAP-Komplexes, die übrigen 8 Patienten lediglich Pufferlösung. Wiederum wurde die Therapie entsprechend den klinischen und biologischen Sicherheitsparametern gut vertragen. CFTR-DNA fand sich in den PCR-Untersuchungen nasaler Biopsien 3 und 7 Tage nach der Behandlung in 7 von 8 behandelten Patienten und CFTR-mRNA in der RT-PCR in 2 von den 7 DNA-positiven Patienten. Eine partielle, jedoch anhaltende Korrektur des genetischen Defekts konnte in 2 der 7 DNA-positiven Patienten im Rahmen einer In-vivo-Messung der transepithelialen Potentiale und Fluoreszenzassays von Bürstenbiopsien beobachtet werden.

Um eine länger anhaltende Expression des CFTR-Gens zu erreichen, wurden inzwischen 2 Protokolle mit dem adenoassoziierten Virus (AAV) als Vektor zugelassen (Flotte et al. 1996). Erste Ergebnisse zeigten keine Inflamationsreaktionen (Flotte et al. 1996). Limitierend könnte allerdings der Umstand werden, dass nach Applikation über die Luftwege zumindest in Affen auch Vektoren außerhalb der Lungen, insbesondere in der Leber zu finden waren (Flotte et al. 1995).

#### 10.4.1.4 Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie ist die wahrscheinlich am besten charakterisierte angeborene Knochenmarkfehlfunktion. Sie wurde zum 1. Mal in 3 Brüdern mit einem Syndrom aus physischen Anomalien, Anämie und fettigem aplastischem Knochenmark beschrieben. Es handelt sich um einen autosomal-rezessiven Gendefekt, der zu dieser aplastischen Anämie führt. Zellen von Fanconi-Patienten sind besonders empfindlich gegenüber Substanzen wie z.B. Mitomycin C oder Diepoxybutan, die DNA vernetzen können. Hierauf basiert auch die moderne Diagnostik, bei der chromosomale Bruchstellen nach der Inkubation von Patientenzellen mit den oben beschriebenen chemischen Klastogenen identifiziert werden. Bei gleichem laborchemischem Defekt können die klinischen Ausprägungen bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich sein. Für Patienten, für die es keine histokompatiblen Stammzellspender gibt, bleiben nur supportive Maßnahmen, die einen Tod im frühen Erwachsenenalter nicht verhindern können. Werden Fanconi-Zellen mit dem normalen Gen transfiziert, kommt es zu einem Verlust der Hypersensitivität gegenüber Substanzen wie Mitomycin C und zu einem verlängerten Überleben in vitro.

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

#### 10.4.1.5 Aspartozyklasmangel

Beim Aspartozyklasmangel, der zur Canavan-Krankheit führt, handelt es sich um eine fortschreitende Krankheit, die schließlich zur Zerstörung der Myelinhülle der Nerven des Gehirns führt. Die seltene Erkrankung war u.a. Gegenstand des Kinofilms „Lorenzo's Öl“.

**Gentherapie.** Diese erstmalige gentherapeutische Behandlung einer neurologischen Erkrankung (neben Hirntumoren) erfolgte bisher innerhalb eines einzigen Protokolls als Injektionsbehandlung von 2 Mädchen, beide <2 Jahre alt, in Neuseeland (During 1996a,b, Marshall 1996). Als Vektor wurde

ein adenoassoziertes Virus in Verbindung mit Liposomen und Polymeren verwendet. Bis auf geringes Fieber sei die Therapie gut vertragen worden.

#### 10.4.1.6 Glukozerebrosidasemangel

Der Glukozerebrosidasemangel (auch als  $\beta$ -Glukosidase bekannt) führt zu einer Glukosylzeramidlipidose, die auch unter dem Namen Morbus Gaucher bekannt ist. Es handelt sich um eine monogene Erkrankung, bei der ein Defekt des Glukozerebrosidasegens besteht, was zu einer metabolischen Störung führt. Eine Anhäufung von Glukosylzeramid in den glukozerebrosidasedefizienten hämatopoetischen Zellen, insbesondere den Makrophagen, führt klinisch zu Läsionen im Skelett und schwerer Hepatosplenomegalie, neurologischerseits werden mentale Retardierung, Spastik und Ataxie bei Jugendlichen beobachtet. Gravierender ist die Auswirkung bei der kindlichen Form, die durch einen frühen Beginn, ausgeprägte Hepatosplenomegalie und schwere neurologische Progression bis hin zum frühen Tod gekennzeichnet ist. Daneben existiert eine juvenile Form mit einer milderen neurologischen Ausprägung. Der Typ I oder auch der non-neuropathische Morbus Gaucher der Erwachsenen ist die am weitesten verbreitete lysosomale Speicherkrankheit. Die Diagnose des Morbus Gaucher sollte durch eine Enzymanalyse und durch eine Mutationsanalyse erfolgen. Alle Formen des Morbus Gaucher haben einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus und sind allelbezogene Störungen. Typ I ist in Ashkenazi-Juden 30-mal häufiger, mit einer Inzidenz von mindestens 1:1000 Lebendgeburten in dieser Volksgruppe. Die Abwesenheit von neurologischen Beeinträchtigungen ist das Einschlusskriterium für die Typ-1- oder Erwachsenenform.

**Klinik.** Klinische Manifestationen umfassen die zufällige Entdeckung einer schmerzlosen Splenomegalie, Thrombozytopenie, Anämie oder Leukopenie als Folge der Splenomegalie und Knochenschmerzen. Der weitere Verlauf ist unterschiedlich. Die Krankheit kann sehr früh zur Rollstuhlpflichtigkeit führen, aber auch asymptomatisch verlaufen und z.B. erst im 9. Lebensjahrzehnts diagnostiziert werden. Die meisten Patienten haben einen milden Verlauf mit relativ normaler Lebenserwartung. Eine partielle oder totale Splenektomie können erforderlich sein. Das Ausmaß der Knochenbeteiligung ist unterschiedlich und umfasst Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Wirbelsäulenfrakturen und aseptische Nekrosen des Femur-

kopfs. Knochenschmerz mit Fieber wird Pseudoosteomyelitis genannt. Die Knochenabnormalien lassen sich besonders gut mittels Kernspinnangiographie untersuchen. Eine moderate Leberdysfunktion ist häufig, selten kommt es zu ausgeprägtem Leberversagen, portaler Hypertension, pulmonalen Infiltraten oder pulmonaler Hypertonie. Die saure Phosphatase ist im Serum typischerweise erhöht. Eine spezielle Speicherzelle ist bei allen Formen des Morbus Gaucher im Knochenmark zu finden, dennoch sollte ein Enzymassay erfolgen, da derartige Gaucher-Zellen auch bei Patienten mit granulözytärer Leukämie und Myelomen zu finden sind.

**Genetik.** 4 Mutationen verursachen 96% aller Glukozerebrosidasemutationen in der Ashkenazi-Population. Dies war die Ausgangslage für eine Reihe von Untersuchungen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und Genträgern in dieser Population. Eine Mutation, genannt N370S (Ersatz von Serin, S, durch Asparagin, N, in Position 370) führt zu einer milden Ausprägung. Eine einzelne Kopie dieser Mutation in einem Heterozygoten verursacht keinerlei neurologische Beeinträchtigung, und Homozygotie für diese Mutation ist ebenfalls mit einem ausgesprochen milden Phänotyp assoziiert. Tatsächlich wurde Homozygotie für den N370S-Phänotyp in 2 von 453 „normalen“ Ashkenazi-Individuen gefunden.

**Alternative Therapien.** Splenektomie beim Morbus Gaucher Typ I kann zu einer Besserung führen, grundsätzlich jedoch bestehen keine Therapie- oder Heilungsmöglichkeiten. Eine erhebliche Änderung für die Behandlung des Morbus Gaucher kam mit der Verfügbarkeit von Aglukerase für den Enzyersatz. Aglukerase ist eine modifizierte Form von  $\beta$ -Glukosidase, die aus humaner Plazenta gewonnen wird. Die Behandlung verbessert Anämie und Thrombozytämie und verringert Organomegalie und Knochenschmerzen. Diese Behandlung kann zwar die Notwendigkeit einer Splenektomie verringern, verursacht aber etwa 500 000 DM Kosten/Jahr. Rekombinante Enzyme werden derzeit klinisch getestet, unklar ist jedoch, wie hoch die Kosten für ihren regelmäßigen Einsatz sein werden. Dosisfindung und Indikationsstellung sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Eine Alternative zur Behandlung mit dem relativ kurzlebigen, teuren Protein könnte der Einsatz der Gentherapie darstellen.

**Gentherapie.** Bisher wurde in mindestens 9 Patienten im Rahmen von 3 Protokollen eine Genthera-

pie durchgeführt. 2 Phase-I-Studien erproben die Reinfusion von Knochenmarkszellen, die mit dem Glukozerebrosidasegen transfiziert wurden (Dunbar et al. 1996). Eine Kombination des dominant selektiven MDR-Gens (*multi-drug resistance gene*) mit dem nicht-selektiven therapeutischen Glukozerebrosidasegen könnte die Therapie durch die Anreicherung ex vivo erfolgreich transduzierter Zellen noch effektiver machen.

#### 10.4.1.7 Faktor-IX-Mangel

Der Faktor-IX-Mangel bzw. die Faktor-IX-Dysfunktion, auch als Hämophilie B oder *Christmas disease* bekannt, tritt bei der Geburt von 1 von 100 000 Jungen auf. Eine genaue Labordiagnose ist wichtig, da die Hämophilie B klinisch nicht von der Hämophilie A unterscheidbar ist, jedoch die Behandlung mit einer anderen Plasmafraktion erfordert. Normalerweise werden frisch gefrorenes Plasma oder eine Plasmafraktion, die mit Prothrombinkomplex angereichert wurde, verwendet. Gereinigte monoklonale Präparate oder rekombinanter Faktor IX wird derzeit in klinischen Studien eingesetzt. Erwartungsgemäß beinhaltet die Therapie die Risiken von Hepatitis, chronischer Lebererkrankung, Aids und, als Besonderheit der Faktor-IX-Substitution, die Aktivierung des Gerinnungssystems durch Spuren von aktivierten Gerinnungsfaktoren im Prothrombinkomplex, die zu Thrombosen und Embolien führen. Diese sind bei immobilisierten Patienten und Patienten mit Lebererkrankungen besonders häufig.

Faktor IX ist ein einkettiges Proenzym mit einem MG von 55 000, das durch den Faktor XIa oder den Gewebefaktorkomplex VII in die aktive Protease IXa konvertiert wird. Die cDNA von Faktor IX wurde kloniert. Das Gen wurde auf dem X-Chromosom kartiert, damit verbundene RFLP wurden identifiziert. Viele Patienten mit Deletionen und Mutationen wurden beschrieben.

**Gentherapie.** Die ersten klinischen Ergebnisse stammen aus Asien. Hautfibroblasten von 2 Patienten mit Hämophilie B wurden ex vivo mit einem retroviralen Vektor transduziert, der für die cDNA des Blutgerinnungsfaktors IX enkodiert (Lu et al. 1993). Vor der autologen subkutanen Injektion wurden die Fibroblasten in eine Kollagenmatrix verpackt. Die Faktor-IX-Spiegel stiegen auf das Doppelte bis 3Fache an und stabilisierten sich schließlich in beiden Patienten bei 220 ng/ml während einer 6-monatigen Nachbeobachtungsphase. Die ursprünglich unzureichende Gerinnbarkeit des

Bluts verdoppelte sich in nur 1 der beiden Patienten und erreichte dabei 6,3%. Auch die klinischen Symptome dieses Patienten besserten sich deutlich. Toxische Zeichen wurden bei dieser Therapieform nicht beobachtet.

Die beiden Patienten wurden über 3 Jahre nach der Behandlung beobachtet (Qiu et al. 1996). In beiden Patienten fanden sich über 420 Tage erhöhte Plasmaspiegel für humanen Faktor IX im ELISA. Die Blutgerinnungsaktivität erhöhte sich in beiden Patienten signifikant, und die Blutungsneigung war teilweise korrigiert. Nach 420 Tagen wurde 1 der 2 Patienten erneut behandelt, wobei ein weiterer Anstieg der Faktor-IX-Spiegel erreicht werden konnte.

Mittlerweile wurden 2 weitere Patienten von derselben Gruppe behandelt. Weitere Ergebnisse liegen noch nicht vor.

#### 10.4.1.8 Chronische granulomatöse Krankheit

Bei der chronischen granulomatösen Krankheit handelt es sich um eine seltene Störung von Phagozyten, die mit rezidivierenden lebensbedrohlichen Infektionen verbunden ist. Die Ursache ist ein Defekt der Phagozyten-NADPH-Oxidase (*phox*), die normalerweise ein Superoxid bildet. Die genetische Basis der chronischen granulomatösen Krankheit ist heterogen. Die häufigste Form (etwa 2/3 der Fälle) ist X-chromosomal mit einer Mutation des *gp91phox*-Gens bedingt. Die nächsthäufige Form (1/3 der Fälle) ist autosomal-rezessiv und durch eine Mutation des *p47phox*-Gens auf Chromosom 7 verursacht. Die verbleibenden 5% der Fälle weisen eine Mutation der Gene für *p22phox* (Chromosom 16) oder *p67phox* (Chromosom 1) auf. Die Knochenmarkstransplantation kann die chronische granulomatöse Krankheit heilen, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass Knochenmarkstammzellen für Granulozyten und Monozyten geeignete Ziele für eine Gentherapie sein könnten. Leider war die Knochenmarkstransplantation für diese Erkrankung jedoch mit unakzeptabel hohen Raten für Morbidität, Mortalität und Transplantatversagen assoziiert, ausgenommen Fälle mit HLA-übereinstimmenden Geschwistern als Spendern.

**Gentherapie.** Periphere Blutzellen von 5 Erwachsenen mit auf *p47phox*-Mangel basierender chronischer granulomatöser Krankheit wurden ex vivo CD34<sup>+</sup>-selektiert und mit Hilfe eines retroviralen Vektors für normale *phox47*-cDNA transduziert (Malech et al. 1997). Die transduzierten Stammzel-

len wurden dann den Donoren zurück infundiert. Es wurde kein myoablatives *Conditioning* durchgeführt. Funktionell korrigierte periphere Blutgranulozyten fanden sich in allen 5 Patienten über durchschnittlich 3 Monate, in 1 Fall über bis zu 6 Monate. Die maximale Korrektur konnte 3–6 Wochen nach der Infusion beobachtet werden, wobei sie zwischen 0,004% und 0,05% der gesamten peripheren Blutgranulozyten erreichte. Durchschnittlich fand sich in 1 von 5000 Zellen *phox*-Aktivität.

Inzwischen wurden von dieser Gruppe bereits 8 Patienten mittels Gentherapie behandelt. Obwohl die Autoren erwähnten, dass wahrscheinlich 150-mal mehr Zellen korrigiert werden müssten, um einen ausreichenden Schutz gegen die Infektionen zu erreichen, mit der die chronische granulomatöse Krankheit assoziiert ist, zeigte diese Studie doch die Dauerhaftigkeit einer solchen Behandlung mit autologen peripheren Blutstammzellen ohne Konditionierung mit entsprechenden Perspektiven für die Zukunft. Technisch sind die Verwendung von tierproteinfreien Seren und der blutbankkompatible Standard mit geschlossenen, gaspermeablen Plastikbehältern erwähnenswert, die möglicherweise für die Praxis der Gentherapie bedeutsam sein könnten.

#### 10.4.2 Tumorerkrankungen

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

Im Rahmen der Immuntherapie wurden bis 19.6.1996 im Rahmen von 60 weltweiten Protokollen insgesamt 376 Patienten eingeschlossen. Grö-

ßere Tumorregressionen, definiert als entweder komplette oder partieller Antwort, wurden in 15 von 237 auswertbaren Patienten beobachtet (Roth und Cristiano 1997).

Die Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber therapeutischen Substanzen, z.B. durch Suizidge-ne, erfolgte im Rahmen von 21 Protokollen, wobei 104 Patienten eingeschlossen wurden. Eine deutliche Tumorregression war in 8 von 62 Patienten festzustellen (Roth und Cristiano 1997).

Eine vermehrte Resistenz gegen Chemotherapeutika zum Schutz gesunder Zellen (v.a. Knochenmarkstammzellen) bei der Verwendung höherer therapeutischer Dosen war das Ziel von 8 Protokollen. Derzeit liegen noch zu unzureichende Daten vor, um eine Aussage über potenzielle Erfolge machen zu können (Roth und Cristiano 1997).

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

Problematisch ist, dass sich, besonders bei der Erprobung der Immuntherapie, die Ergebnisse aus Tierversuchen nicht immer auf den Menschen übertragen lassen. So sind z.B. die als Target verwendeten humanen Tumorantigene bekannt, die des verwendeten Tiermodells jedoch nicht immer. Ebenso wurde die Immunogenität von Proteinen, die von Onkogenen abstammen, für die Tiermodelle häufig nicht demonstriert.

Besonders oft erfolgte der Einsatz der Gentherapie bei multiplen, metastasierten und somit sehr weit fortgeschrittenen Karzinomen, beim Melanom, Glioblastom, Bronchialkarzinom, kolorektalen Karzinom, Leberzellkarzinom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Nierenkarzinom sowie bei Leukämien, Lymphomen und beim multiplen Myelom. Diese Krankheiten werden im Folgenden einzeln abgehandelt. Geringere Fallzahlen ohne publizierte Ergebnisse liegen derzeit noch für das Neuroblastom (22 Patienten in 5 Protokollen) und andere Tumoren des Zentralnervensystems (28 Patienten in 5 Protokollen), Kopf- und Halsplattene-pithelkarzinom (55 Patienten in 7 Protokollen) und Prostatakarzinom (50 Patienten in 16 Protokollen) vor. Für das Blasenkarzinom, Pankreaskarzinom und Keimzelltumoren existieren zwar Protokolle, bisher wurden jedoch keine Patienten eingeschlossen.

### 10.4.2.1 Melanom

**Inzidenz.** Das Melanom entsteht in Melanozyten, Pigmentzellen, die normalerweise in der Epidermis, gelegentlich auch in der Dermis vorkommen. Dieser Tumor befällt allein in den USA pro Jahr etwa 32 000 Patienten, was in 6 700 Fällen zum Tod führt. Die Inzidenz des Melanoms ist dramatisch angestiegen, allein um 300% in den letzten 40 Jahren. Es kann in Erwachsenen aller Altersklassen und sogar in jungen Individuen beginnend ab Mitte des Twen-Alters auftreten. Spezielle klinische Kennzeichen machen das Melanom zu einem Zeitpunkt erkennbar, wenn die Heilung durch eine chirurgische Exzision möglich ist. Außerdem ist es auf der Körperoberfläche lokalisiert, was es leichter sichtbar macht. Falls die Inzidenz weiter wie bisher ansteigt, wird das Risiko, im Lauf des Lebens ein Melanom zu bekommen, ungefähr 1% oder mehr betragen.

Der Grund für die steigende Inzidenz ist nicht klar, könnte jedoch auf eine vermehrte Sonnenexposition im Rahmen von Urlaubsreisen insbesondere im frühen Lebensalter zurückzuführen sein. Individuen ähnlichen ethnischen Ursprungs, die nach der Kindheit in Gegenden mit hoher Sonnenexposition (Israel, Australien) ausgewandert sind, haben niedrigere Melanomraten als Individuen ähnlichen Alters, die vor dem 10. Lebensjahr in diese Länder emigriert sind. Individuen mit besonders hohem Melanomrisiko sind jene mit heller Hautfarbe, rotem oder blondem Haar, blauen Augen, Sommersprossen und jene, die nur schwer bräunen und leicht Sonnenbrände erleiden. Andere Faktoren, die mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert sind, umfassen eine Familienanamnese für Melanom (nahezu 1 von 10 Melanompatienten hat ein Familienmitglied mit Melanom), die Präsenz eines atypischen Leberflecks (dysplastischer Nävus), eines riesigen kongenitalen melanozytären Nävus, eines kleinen bis mittelgroßen melanozytären Nävus, einer größeren Anzahl von gewöhnlichen melanozytären Nävi und Immunsuppression. Über ein 64fach erhöhtes Risiko für Individuen mit >50 Muttermalen >2 mm Größe wurde berichtet. Bei stark pigmentierten Menschen kommt das Melanom relativ selten vor. Dunkelhäutige Populationen wie Inder, Lateinamerikaner, Schwarze und Orientalen haben Melanomraten von 1/7–1/10 der hellhäutiger Kaukasier.

**Klinische Kennzeichen.** Es gibt 4 Typen des kutanen Melanoms. 3 von ihnen – das sich oberflächlich ausbreitende Melanom, das linsenförmige maligne

Melanom und das akrale linsenähnliche Melanom – durchlaufen eine Phase oberflächlichen, so genannten radialen Wachstums, wodurch zwar die Größe zunimmt, ohne dass es zu einem tiefen Eindringen kommt. Während dieses radialen Wachstums gibt es noch Chancen, das Melanom durch eine chirurgische Exzision zu heilen. Der 4. Typ, das noduläre Melanom, hat keine Phase einer erkennbaren radialen Größenzunahme, sondern präsentiert sich als tiefe invasive Läsion, die zu früher Metastasierung fähig ist. Wenn die Tumoren beginnen, tief in die Haut einzudringen, befinden sie sich in der so genannten vertikalen Wachstumsphase.

**Prognostische Faktoren.** Der wichtigste prognostische Faktor ist das Stadium, in dem sich die Krankheit zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befindet. Das 5-Jahres-Überleben der klinischen Stadien I und II (Primärtumor, keine weiteren Zeichen der Erkrankung) beträgt etwa 85%. Für das klinische Stadium III (klinisch palpable regionale Lymphknoten, die Tumorzellen enthalten) wurde ein 5-Jahres-Überleben von 50% beobachtet, wenn nur ein Knoten betroffen war, und von etwa 15–20% wenn  $\geq 4$  Knoten betroffen waren. Das 5-Jahres-Überleben für das klinische Stadium IV (disseminierte Erkrankung) beträgt <5%. Glücklicherweise wird die Mehrheit der Melanome im Stadium I–II diagnostiziert. Innerhalb der Stadien I und II kann aus der Dicke des Primärtumors eine graduelle Abhängigkeit der Prognose abgeleitet werden. Dieses System basiert auf der Rationale, dass das potenzielle Tumorstadium mit dem Tumorstadium korrelieren sollte. Melanome <0,76 mm Dicke können gewöhnlich durch eine chirurgische Entfernung geheilt werden (5-Jahres-Überleben 96–99%). Etwa 40% der primären Melanome fallen in diese Kategorie mit niedrigem Risiko (Dicke <1 mm). Wenn Patienten dieser Gruppe Metastasen entwickeln, zeigen die primären Tumoren entweder extensive mikroskopische Zeichen der Regression oder eine vertikale Wachstumsphase. Etwa 60% der Patienten mit Melanomen >3,65 mm Dicke werden in ein metastasierendes Stadium übergehen und schließlich am Melanom sterben. Diese dicken Tumoren sind fast immer über die Oberfläche der Haut erhaben. Daneben existieren in Bezug auf die Tumordicke noch 2 intermediäre Kategorien. Bestimmte anatomische Lokalisationen beeinflussen die Prognose. So stellen Unterarm und Bein (ohne Fuß) eher günstige Stellen dar, während Kopfhaut, Hände, Füße und Schleimhäute ungünstig sind. Das Überleben von Frauen in Stadium I und II ist in der Regel günstiger.

ger als das von Männern, vielleicht aufgrund einer früheren Diagnosestellung; Frauen haben häufig Melanome des Unterschenkels, wo die Selbstdiagnose wahrscheinlicher und die Prognose besser sind. Ältere Patienten haben meist eine schlechtere Prognose. Dies wurde mit einer verzögerten Diagnosestellung und einem höheren Anteil akraler Melanome (palmar/plantar) erklärt, die eine schlechtere Prognose haben. So wie bei Brustkrebs sind Rezidive auch noch nach vielen Jahren möglich. Etwa 10–15% der Erstrezidive entwickeln sich nach 5 Jahren, somit sollte eine Nachsorge für mindestens 10 Jahre erfolgen. Weitere prognostische Faktoren für Melanome im Stadium I und II umfassen Ulzera im Bereich des Primärtumors, die Mitoserate und das Vorkommen mikroskopischer Satellitentumoren (Foci des Tumors >0,05 mm Durchmesser in der retikulären Dermis und dem subkutanen Fettgewebe). Mikroskopische Satellitentumoren verursachen auch mikroskopische Metastasen in regionalen Lymphknoten. Eine alternative Möglichkeit, die Prognose von Melanomen im Stadium I oder II vorauszusagen, basiert auf der anatomischen Eindringtiefe innerhalb der Haut. Stufe I bedeutet intradermales (in situ) Wachstum, Stufe II Eindringen in die papillare Dermis, Stufe III Ausfüllen der papillaren Dermis, Stufe IV Eindringen in die retikuläre Dermis und Stufe V Eindringen in das subkutane Fettgewebe. Das 5-Jahres-Überleben beträgt je nach Stufe durchschnittlich 100, 95, 82, 71 bzw. 49%.

**Natürlicher Verlauf.** Melanome verbreiten sich über die Lymphwege (lymphogen) und die Blutbahn (hämatogen). Die ersten Metastasen treten in regionalen Lymphknoten auf. Das regionale Wachstum wird gewöhnlich mit einer chirurgischen Lymphadenektomie behandelt. Leber, Lunge, Knochen und Gehirn sind die üblichen Lokalisationen hämatogener Streuung, aber auch seltene Lokalisationen wie z.B. die Vorderkammer des Auges sind möglich. Ist die Krankheit erst einmal weit gestreut, ist bisher eine Heilung kaum mehr möglich.

**Gentherapie.** Das maligne Melanom war eine der ersten Erkrankungen, die mittels Gentherapie behandelt wurden. Am 22.5.1989 erfolgte erstmalig die Infusion von retroviral mit einem Markergen transduzierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Rosenberg 1992, Rosenberg et al. 1990). In diesem ersten klinischen Protokoll, das 10 Patienten umfasste, konnten die Durchführbarkeit und Sicherheit einer solchen gentherapeutischen Strategie gezeigt werden, die die Basis für das Design

weiterer tumorinfiltrierender Lymphozyten mit verbesserter Antitumorwirkung zur Behandlung des Melanoms und anderer Tumorerkrankungen werden sollte. Seither erfolgte die gentherapeutische Behandlung in mindestens 523 Melanompatienten innerhalb von 50 Protokollen (Wiley 1998).

Am 29.1.1991 wurden die ersten beiden von insgesamt 4 Melanompatienten mit tumorinfiltrierenden, retroviral mit dem Gen für Tumornekrosefaktor (TNF) modifizierten Lymphozyten, behandelt. Günstiger war das Ergebnis offensichtlich, wenn die Patienten gleichzeitig IL-2 erhielten (Rosenberg 1992), wobei der Effekt möglicherweise allein auf den bereits nachgewiesenen Antitumoreffekt von IL-2 zurückzuführen sein könnte (Rosenberg et al. 1994). Mit Hilfe eines Markergens konnte nach retroviraler Modifikation tumorinfiltrierender Lymphozyten eine Transfektionseffizienz von 1–26% gezeigt werden, wobei die genmodifizierten Lymphozyten noch mindestens 260 Tage nach der Reinjektion in den 5 behandelten Patienten nachweisbar waren. Die erhoffte selektive und langanhaltende Retention in den Tumoren blieb jedoch aus (Matrangeli et al. 1994, Merrouche et al. 1995).

In anderen Protokollen wird auf spezifische und unspezifische Immunantworten auf ex vivo interleukintransduzierte Tumorzellen abgezielt. Diese Studien basieren auf früheren Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass durch die Injektion von IL-2 in etwa 20% der Patienten eine komplette Remission erzielt werden konnte (als Übersicht Gänsbacher et al. 1993). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit mussten jedoch hohe Dosen verabreicht werden, die zu ernststen Nebenwirkungen führten. Ziel war es, durch die stabile Expression nach Gentransfer die Nebenwirkungen zu verringern.

Nach dem Transfer des IL-4-Gens in Fibroblasten wurde über die Tumordinfiltration durch CD3<sup>+</sup>- und tumorspezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen berichtet (Lotze et al. 1994, 1995). Nach Behandlung mit dem IL-2-Gen kam es zu einer konsekutiven Vermehrung von CD16<sup>+</sup>-natürlichen Killerzellen und tumorspezifischen CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen (Belli et al. 1997). Angewendet in 12 weiteren Patienten wurde eine variable und inhomogene Vermehrung der immunophänotypisch unterschiedlichen Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>) beobachtet (Belli et al. 1997). In 4 Patienten kam es zu einer Stabilisierung der Krankheit über 2–6 Monate, in 2 Patienten teils zur Regression und teils zu einem Nichtansprechen der Tumoren im gleichen Patienten. In den übrigen 6 Patienten waren keine Zeichen eines Therapieerfolgs zu erkennen. Insgesamt war der

therapeutische Effekt somit nur schwach, ebenso wie die lokalen und systemischen Nebenwirkungen. In einem ähnlichen Protokoll, bei dem eine Immunotherapie mit IL-2-transfizierten immortalisierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen erfolgte, konnte im Rahmen einer Phase-I-Studie in 2 von 6 Melanompatienten eine erhebliche lytische Wirkung der vom Patienten gewonnenen T-Zellen gegen autologe Tumorzellen *in vitro* gezeigt werden. Klinisch kam es während der Behandlungsdauer bei 2 Patienten zu einer vorübergehenden Stagnation der Krankheit (Veelken et al. 1997). Von 12 weiteren Patienten, die mit IL-2-transduzierten allogenen Melanomzellen behandelt worden waren, zeigten nur 2 einen partiellen therapeutischen Effekt mit Regression von einzelnen Hautknoten, wobei andere Manifestationen von der Therapie unberührt blieben. In 2 Patienten fand sich als Immunantwort ein Anstieg an zytotoxischen T-Lymphozyten. Toxische Nebenwirkungen waren nur gering (Parmiani et al. 1996).

Sun et al. (1998) verwendeten eine Immunisierungsstrategie mit IL-12-Gen-modifizierten autologen Melanomzellen. In dieser Phase-I-Studie wurden 6 Patienten mit terminalem metastasierendem Melanom mit 2 Plasmiden behandelt, die für die p35- und p40-Ketten von IL-12 kodieren. Hierfür wurden autologe Tumorzellen aus Metastasen explantiert, *in vitro* mittels Genkanonenbehandlung mit beiden Plasmiden transduziert und anschließend bestrahlt. *In vitro* wurde bereits biologisch aktives IL-12 sezerniert. Durch magnetische Anreicherung vor der Bestrahlung ließen sich in den transduzierten Zellen hohe Spiegel erreichen. Die Bestrahlung selbst erhöhte die Sekretionsspiegel um das 2Fache, wodurch im Durchschnitt 987 pg/Tag und Mio. Zellen erreicht werden konnten. Die transduzierten, bestrahlten autologen Zellen wurden 5- bis 6-mal innerhalb einer 6-wöchigen Behandlung subkutan reinjiziert. Machbarkeit und Sicherheit dieser Strategie konnten ohne wesentliche Toxizität gezeigt werden, es kam lediglich zu geringem Fieber. In 2 Patienten konnte nach der Immunisierung ein Anstieg von tumoraktiven zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) nachgewiesen werden. Eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ gegen die transduzierten Zellen zeigten 2 Patienten. Weder eine komplette noch eine partielle Reaktion konnten erreicht werden, obwohl es bei 3 Patienten zu einer Stabilisierung des Krankheitszustands kam und 1 Patient nach mehreren Monaten eine gemischte klinische Antwort zeigte. Die Metastasenbiopsien wiesen eine erhebliche Zellinfiltration mit CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen auf.

Die therapeutische Wirkung von IL-7, und *Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor* (GM-CSF) wird derzeit noch untersucht (Schadendorf et al. 1995).

Neben der Verabreichung von Zytokinen besteht die Möglichkeit einer Immuntherapie mit Histokompatibilitätsantigenen. Durch die Expression des Klasse-I-Histokompatibilitätsantigens HLA-B7 konnten eine erhöhte Immunogenität der Tumorzellen, und damit die Möglichkeit ihrer physiologischen Elimination bewirkt werden (Fenton et al. 1995, Nabel et al. 1992 a,b, 1994 a,b). Bis jetzt wurde bei mindestens 93 Patienten mit fortgeschrittenem Melanom im Rahmen von 12 Protokollen über eine direkte intratumorale Injektion eines Plasmid-Liposomen-Gemisches des Gens für das HLA-B7-Glykoproteins des Klasse-I-Histokompatibilitätsantigenkomplexes berichtet. Alle Patienten waren HLA-B7-negativ. In 80–89% der Patienten konnte eine erfolgreiche Genexpression nachgewiesen werden (Stopeck et al. 1997, Waddill et al. 1997). Die Injektionen erfolgten teilweise computertomographiegesteuert (Waddill et al. 1997) und in 1 Fall als lokale Behandlung mittels eines speziellen Katheters in eine entfernt gelegene Metastase (Nabel et al. 1994 a). Nabel et al. (1993) berichteten über einen deutlichen Rückgang des Tumorwachstums, in 1 von 5 Patienten sogar über die komplette Elimination zweier injizierter Tumorknoten und weiterer distaler nichtinjizierter Metastasen. Dabei konnte nach 3–7 Tagen in Tumorbiopsien durch Immunhistochemie das HLA-B7-Protein und die dazugehörige transferierte Plasmid-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. In allen 5 Patienten fand sich eine autologe Antitumor- und allogene zytotoxische Lymphozytenimmunantwort. Stopeck et al. (1997) verabreichten 17 ebenfalls HLA-B7-negativen Patienten mit metastasierendem Melanom aufsteigende Dosen von kationischem Lipidvektor als intratumorale Injektionen, wobei die Dosen 10, 50 und 250 mg DNA zur 1-maligen Injektion und 10 mg zur 2- bis 3fachen Injektion in 14-tägigen Intervallen betragen. Tumorbiopsien wurden vor der 1. sowie 2 und 4 Wochen nach der Injektion in Hinblick auf Plasmidpräsenz (PCR), Transkription (RT-PCR) und Oberflächenexpression von HLA-B7-Protein mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie untersucht. Die Proben nach der Injektion waren in 93% der Fälle positiv. Als Komplikationen konnten Toxizität, Blutung, Pneumothorax und Hypotension beobachtet werden, wobei diese Komplikationen hauptsächlich auf die technische Durchführung von Injektionen und Biopsien zurückgeführt

wurden. Die Autoren berichteten über eine messbare Tumorverkleinerung in 50% der Fälle, mit einer Größenabnahme von mehr als 25% in 7 von 17 Patienten und mehr als 50% in 5 der 7 Patienten. In 1 Patienten mit einem einzelnen Tumorknoten kam es zur kompletten Remission. Waddill et al. (1997) sahen eine signifikante Verkleinerung (>25%) in 6 von 10 Patienten, wobei 1 Patient mit einem solitären Tumor noch 19 Monate nach der Behandlung rezidivfrei war. Über Nebenwirkungen wurde nicht berichtet. In einer nachfolgenden Phase-I-Studie werden derzeit neue Liposomen, ein Vektor mit verstärkter HLA-B7-Expression und der regelmäßige Einsatz von Kathetern zur lokalen Applikation getestet (Nabel et al. 1995).

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

**Definition und Inzidenz.** Maligne Astrozytome oder Glioblastome (auch als maligne Gliome oder Stadium-III- oder -IV-Astrozytome bekannt) und die weniger malignen anaplastischen Astrozytome machen etwa 1/4 der 5000 in den USA pro Jahr diagnostizierten intrakraniellen Gliome aus; bei Erwachsenen sogar 75% der Gliome. Aufgrund der tiefgreifenden und uniformen Morbidität trägt dieser Tumor auf einer Pro-Kopf-Basis mehr als alle anderen Tumoren zu den Behandlungskosten bei. Die Patienten, die in der Regel in der 5. Lebensdekade von dieser Krankheit befallen werden, treten in einen Zyklus wiederkehrender Hospitalisationen und Operationen mit zunehmenden Komplikationen und relativ ineffektiver Bestrahlungs- oder Chemotherapie ein.

**Pathogenese und Pathologie.** Epidemiologische Untersuchungen haben wenig zur Aufklärung der Ätiologie von malignen Astrozytomen beigetragen. Manche Tumoren entstehen in Patienten mit einer langen Anamnese von epileptischen Anfällen oder Persönlichkeitsstörungen aufgrund einer Dysfunktion des Temporallappens und Narben nach Schädelverletzungen, was vermuten lässt, dass in bestimmten Fällen maligne Zellen aus einer eher benignen Proliferation der Glia entstehen.

Seltene Fälle einer familiären Häufung lassen auch auf eine genetische Komponente schließen. Wenigstens 4 humane Onkogene (*sis*, *myc*, *src*, *n-myc*) wurden aus Zelllinien aus primären Hirntumoren identifiziert. Die Rezeptoren für *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *epidermal growth factor* (EGF) werden überexprimiert.

Geringe Häufungen von Tumoren fanden sich auch in bestimmten Berufsgruppen, insbesondere der ölverarbeitenden Industrie.

Die Erscheinung des Tumors ähnelt derjenigen, die durch die Inokulation einer Vielzahl von Viren durch Tiere verursacht wird. Typischerweise ist das umliegende normale Gehirngewebe verformt und mit gelblichem Tumorgewebe durchsetzt, das nekrotische, zystische und hämorrhagische Anteile enthält. Die Histologie zeigt ein zellreiches Gewebe zusammengesetzt aus heterogenen Gliazellen und in die Länge gezogenen oder abgerundeten Astrozyten, die fibrilläres saures Gliaprotein produzieren.

**Klinische Manifestation.** Die Patienten stellen sich meist mit einem subakuten, zunehmenden neurologischen Defizit vor, entweder in Form von fokalen Symptomen oder als Persönlichkeitsveränderung. Mentale Veränderungen oder epileptische Anfälle können der Tumordiagnose um Monate oder Jahre vorausgehen. Klinische Symptome, epileptische Anfälle oder neu aufgetretene Defizite können auch plötzlich infolge von tumorbedingten Hämorrhagien in Erscheinung treten. Die Computer- oder Kernspintomographie zeigen ein heterogenes Anreicherungsmuster des Tumorgewebes, durchsetzt mit hypodensen Foci, die am ehesten mit Nekrose- und Ödemarealen korrelieren. Sie können sich als multiple Tumoren manifestieren, was jedoch selten ist. In der Kernspintomographie stellt sich der Tumor oft größer dar als in der Computertomographie.

Maligne Astrozytome können im Hirnstamm, im Kleinhirn oder im Rückenmark entstehen, zusätzlich zu den deutlich häufigeren Lokalisationen innerhalb der weißen Substanz der Großhirnhemisphären. Die Prognose für alle Manifestationen hat sich leider in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich geändert. Nach der Behandlung können nur noch weniger als 6 Monate ausreichender Hirnfunktion erwartet werden, bevor in den meisten Patienten zunehmende Symptome den wiederkehrenden Tumor ankündigen, 80% der Patienten sterben innerhalb von 6–12 Monaten aufgrund eines Tumorrezidivs. Die fortschreitende neurologische Beeinträchtigung führt schließlich zu Stupor und Koma. In meist jüngeren Patienten, die das erste Jahr überleben, kommt es zu einer Dissemination des Tumors in die Meningen oder ins ventrikuläre Ependym. Metastasen außerhalb des ZNS sind extrem selten.



**Gentherapie.** Insgesamt wurde die Gentherapie inzwischen bei mindestens 377 Patienten mit Glioblastomen im Rahmen von 24 Protokollen eingesetzt. Ergebnisse liegen bei Patienten vor, denen Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen (HSV-*tk*-Gen) tragende retrovirusproduzierende Zellen in die Tumoren injiziert wurde (Culver et al. 1994). In der Regel erfolgte nach 14 Tagen die systemische Behandlung mit Ganciclovir. In 12 Läsionen von 8 Patienten wurde eine über 25%ige Reduktion des Tumorumfanges in der posttherapeutischen Frühphase beobachtet. Bei 6 Läsionen von 4 Patienten konnte ein therapeutischer Effekt über 4–18 Monate nachgewiesen werden, obwohl das HSV-*tk*-Gen nur in sehr wenigen Zellen detektiert werden konnte (<0,17%) (Ram et al. 1995). Izquierdo et al. (1997) zeigten an 2 Patienten, dass für Tumoren >100 cm<sup>3</sup> eine Suizidgentherapie allein mit Thymidinkinase (TK) und Ganciclovir nicht ausreichend ist. Die Überlebenszeit nahm deutlich zu, wenn zusätzlich zur Suizidgentherapie eine neurochirurgische Tumorverkleinerung vorgenommen wurde. Die 2 Patienten wurden deshalb teilreseziert und erhielten eine wiederholte TK-Ganciclovir-Gentherapie über ein Ommaya-Reservoir, das über einen Katheter mit der Tumorkammer verbunden war. 11 bzw. 17 Monate nach der Behandlung waren die Patienten noch am Leben. Die Magnetresonanztomographie zeigte ein verbleibendes Tumorstadium entlang des Tumorbetts. Somit konnten Chirurgie und Gentherapie zwar die Tumorphasierung nicht komplett kontrollieren, waren jedoch in Kombination effektiver als jede Therapie für sich allein. In einem deutschen Zentrum (Weber et al. 1997) wurden deshalb im Rahmen einer Phase-II-Studie retrovirale Verpackungszellen mittels stereotaktischer Injektion oder während der offenen Tumorchirurgie in die Tumoren von Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen nach Tumorverkleinerungsoperation injiziert. Die Mauszelllinie produzierte retrovirale Vektoren, die für das Thymidinkinasegen kodieren. 14 Tage nach der Verabreichung von 10<sup>9</sup> Zellen in 50 Einzelinjektionen wurde mit der 2-wöchigen Ganciclovirtherapie begonnen. Es wurden keine Nebenwirkungen in Bezug auf die intrazerebrale Verabreichung der Mauszellen beobachtet, und die Therapie wurde gut vertragen. Über einen Nachbeobachtungszeitraum von 1 Jahr konnte in 1 von 10 Patienten eine komplette Remission beobachtet werden und in 5 weiteren überlebenden Patienten immerhin eine noch signifikante Lebensqualität trotz Tumorprogression. Die Kernspinnangiographie zeigte, dass das Tumorstadium sich dort fortsetzte, wo

eine inkomplette Resektion erfolgt oder die therapeutische Injektion unzureichend war.

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

Ein anderer Ansatz, der derzeit in einer Phase-I-Studie im Hinblick auf das Glioblastom sowie fortgeschrittene Ovarial- und Mammakarzinome untersucht wird, ist der Einsatz des MDR-Gens (*multi-drug resistance gene*) in Knochenmarkstammzellen (Hesdorffer et al. 1994, 1998). Hiermit werden wirkungsvollere Dosierungen von Chemotherapeutika möglich, da das Knochenmark gegen die medikamenteninduzierte Myelodepression geschützt werden kann. Bei insgesamt 5 Patienten, bei denen eine autologe Knochenmarktransplantation durchgeführt wurde, wurden bis zu 1/3 hämatopoetische Stammzellen und Knochenmarkprogenitorzellen mit einem MDR-cDNA enthaltenden retroviralen Vektor ex vivo transduziert und anschließend zusammen mit den nichtmanipulierten Zellen nach der Chemotherapie reinfundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Reinfusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behandlung. Wahrscheinlich wurden die zytokinstimulierten transduzierten Zellen von den anderen gleichzeitig infundierten und nichtmanipulierten Zellen überwuchert. Die Virusüberstände der MDR-Retroviren und alle Patientenproben nach der Transplantation waren frei von replikationskompetenten Retroviren. Es traten weiterhin keine Nebenwirkungen in Bezug auf die Knochenmarktransplantation auf.

In 1 Patienten, bei dem ebenfalls vorangegangene Therapieversuche fehlgeschlagen hatten, wurde

bisher eine Gentherapie mit IL-2 durchgeführt (Sobol et al. 1995). Der Patient erhielt 10 subkutane Immunisierungen mit autologen Tumorzellen und Fibroblasten, die durch retroviralen Gentransfer genetisch modifiziert worden waren, um IL-2 zu sezernieren. Nach der Immunisierung mit Anstieg an CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen fand sich ein Antitumoreffekt mit Tumornekrosezeichen in einer Magnetresonanztomographie 4 Wochen nach der Behandlung mit der höchsten Therapiedosis.

#### 10.4.2.3 Lungenkarzinom

**Inzidenz.** In jedem Jahr werden allein in den USA mehr als 100 000 Männer und 50 000 Frauen durch das primäre Lungenkarzinom befallen. 1997 waren es insgesamt 178 000 neue Fälle und mehr als 160 000 Todesfälle durch Lungenkarzinom. Die meisten der Betroffenen versterben innerhalb von 1 Jahr nach der Diagnosestellung, wodurch das Lungenkarzinom mit etwa 30% an 1. Stelle der Todesursachen aufgrund von Krebserkrankungen zu stehen kommt. Die Inzidenzen des Lungenkarzinoms sind zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr am höchsten. Insgesamt steigt die Häufigkeit mit der Zeit an, wodurch sich die altersangepasste Sterberate durch Bronchialkarzinom alle 15 Jahre verdoppelt. Erst durch die Antiraucherkampagne, die vor 10–20 Jahren begann, kam es zu einer Abflachung der Inzidenz des Lungenkarzinoms bei weißen Männern, während die Inzidenz bei Frauen weiter zunahm. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben nur 20% der Patienten ein örtlich begrenztes Karzinom, bei 25% besteht bereits eine Metastasierung in regionale Lymphknoten, und 55% haben Fernmetastasen. Selbst bei Patienten mit vermutlich örtlich begrenztem Tumor beträgt das 5-Jahres-Überleben nur 30% für Männer und 50% für Frauen. Diese Überlebensrate hat sich in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich geändert. Somit ist das Lungenkarzinom eines der größten Gesundheitsprobleme mit generell besonders schlechter Prognose trotz des Einsatzes aller bisher verfügbaren chirurgischen, chemotherapeutischen und alternativen Therapiemöglichkeiten.

**Pathologie.** In der Regel findet die histologische Klassifikation primärer Lungenkarzinome Verwendung, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1977 empfohlen wurde. Danach machen 4 Zelltypen 95% aller primären Lungentumoren aus: 1. Platten- oder epidermoides Karzinom, 2. kleinzelliges Karzinom,

3. Adenokarzinom (einschließlich bronchioalveoläres Karzinom) und
4. großzelliges, anaplastisches Karzinom.

Die übrigen Karzinome umfassen kombinierte epidermoide Adenokarzinome, Karzinoide, Tumoren bronchialer Drüsen (einschließlich Zylindrome und mukoepidermoide Tumoren), Mesotheliome und andere seltene Formen. Die unterschiedlichen Zelltypen bedingen verschiedene Krankheitsverläufe und therapeutisches Ansprechen, weshalb die histologische Differenzierung durch einen erfahrenen Pathologen sehr wichtig für die zu wählende konventionelle Behandlungsform ist. In den letzten 10 Jahren stieg aus unbekanntem Grund die Inzidenz des Adenokarzinoms, während die des epidermoiden Tumors abnahm.

Bei den bisherigen konventionellen Therapieverfahren war die histologische Klassifikation ausschlaggebend, je nachdem, ob es sich um ein kleinzelliges oder nichtkleinzelliges (einschließlich epidermoides, Adenokarzinom, großzelliges, bronchioalveoläres sowie gemischtes) Bronchialkarzinom handelte. Im Allgemeinen ist der kleinzellige Tumor zum Zeitpunkt der Entdeckung bereits für eine chirurgische Behandlung zu weit gestreut und wird deshalb bevorzugt mit Chemotherapie, mit oder ohne kombinierter Bestrahlung, behandelt. Im Gegensatz dazu sollte bei einer lokalisierten Manifestation eines nichtkleinzelligen Karzinoms ein kurativer Behandlungsversuch, operativ oder mittels Radiatio, in Erwägung gezogen werden. Das Ansprechen der nichtkleinzelligen Tumoren auf eine Chemotherapie ist gewöhnlich schwach, was diese Therapieform für ein metastasierendes, nichtkleinzelliges Lungenkarzinom weniger bedeutend macht, als für Patienten mit der kleinzelligen Form.

**Ätiologie.** 90% aller Patienten mit Lungenkarzinom aller histologischen Typen sind Raucher, während sich bei den seltenen Nichtraucher gewöhnlich ein Adenokarzinom findet. Das relative Risiko ist bei aktiven Rauchern 13fach und bei über lange Zeit passiven Rauchern 1,5fach erhöht. Vermutet wird ein kokarzinogener Effekt von Rauchen sowie anderen industriellen oder Umweltgiften wie Radon, das aus natürlichen Ressourcen stammt. Bei Nichtrauchern mit Adenokarzinom der Lunge müssen immer Primärtumoren in einer anderen Körperregion ausgeschlossen werden. Epidermoide und kleinzellige Karzinome präsentieren sich meist als zentral gelegene Masse mit endobronchialer Ausbreitung, während sich Adenokarzi-

nome und großzellige Lungenkarzinome meist als periphere Raumforderungen mit Pleurabeteiligung darstellen. Epidermoide und großzellige Karzinome neigen in 20% der Fälle zur Kavernenbildung. Das bronchioloalveoläre Karzinom kann als einzelne Masse, diffuse multinoduläre Läsionen oder Infiltrate in Erscheinung treten.

Neben der Primärprävention durch Aufgabe von Rauchen und der Verbesserung bisheriger Therapien wird neuerdings auch ein medikamentös präventiver Versuch mit Retinsäure begonnen. Auch das Verständnis genetischer Läsionen für die Prädisposition von malignen Tumoren ausgehend von Luftwegepithelien ist ein wichtiger Schritt bei der molekularen Frühdiagnostik und der Entwicklung neuer Therapien, einschließlich der Genterapie.

Obwohl bisher geglaubt wurde, dass es sich beim Lungenkarzinom des Menschen nicht um eine genetische Erkrankung handelt, haben molekulargenetische Untersuchungen gezeigt, dass Lungenkarzinomzellen 10–20 genetische Läsionen akkumulieren, die eine Aktivierung von dominanten Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder rezessive Protoonkogene verursachen. Tatsächlich scheint es, als müssten die Lungenkarzinomzellen eine große Anzahl solcher Mutationen akkumulieren, um klinisch in Erscheinung zu treten. Was die dominanten Onkogene betrifft, sind Punktmutationen in der kodierenden Region der *ras*-Familie unter den Onkogenen (insbesondere das *K-ras*-Gen beim Adenokarzinom der Lunge) und die Amplifikation, das Rearrangement und/oder Verlust der transkriptionellen Kontrolle der *myc*-Familie unter den Onkogenen (*c*-, *N*- und *L-myc*) gefunden wurden, wobei Veränderungen von *c-myc* beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom und Veränderungen aller *myc*-Familienmitglieder beim kleinzelligen Karzinom gesehen wurden. Tumormutationen von *ras*-Genen sind mit einer schlechten Prognose von nichtkleinzelligen Tumoren assoziiert und Tumoramplifikationen von *c-myc* mit einer schlechten Prognose kleinzelliger Tumoren.

Zytogenetische und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalysen (RFLP-Analysen) rezessiver Onkogene (Tumorsuppressorgene) zeigten Deletionen (Allelverlust) der chromosomalen Regionen 1p, 1q, 3p14, 3p21, 3p24–25, 3q, 5q (Gen-Cluster der familiären Polyposis), 9p (Gen-Cluster von Interferon), 11p, 13q14 (Retinoblastomen: *rb*-Gen), 16q, 17p13 (*p53*-Gen) und anderer Lokalisationen. Es gibt offensichtlich mehrere Kandidaten rezessiver Onkogene im Bereich von Chromosom 3p, die nahezu in allen Lungenkarzinomen betei-

ligt sind. Das *p53*- und *rb*-Gen sind in 90% aller kleinzelliger Lungenkarzinome mutiert, während *p53* in 50% und *rb* in 20% aller nichtkleinzelligen Tumoren mutiert sind. Mutationen des Gen-Clusters für die familiäre Polyposis sind ebenfalls häufig. Die große Anzahl genetischer Läsionen in klinisch erkennbaren Lungenkarzinomen führte zur Suche nach diesen Mutationen im Lungengewebe, noch bevor der Tumor zytopathologisch nachweisbar ist, um somit eine molekulare Frühdiagnose möglich zu machen, aber auch, um einen intermediären Endpunkt in Präventionsanstrengungen und für eine chemotherapeutische Behandlung zu schaffen.

Die große Anzahl der Läsionen zeigt, dass die Entwicklung des Lungenkarzinoms, ähnlich anderer häufiger epithelialer Malignome, ein Prozess ist, der viele Schritte durchläuft. Hierbei sind sowohl Karzinogene, die die Initiation mittels Mutagenese bewirken, und Tumorpromotoren, die das Wachstum der Tumorzellen mit genetischen Läsionen erlauben, involviert. Zellbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Lungenkarzinomzellen eine große Menge an Peptidhormonen und deren Rezeptoren produzieren, die das Tumorzellwachstum autokrin stimulieren können. Nikotin spielt potenziell eine sehr zentrale Rolle in der Pathogenese des Lungenkarzinoms. Im Zigarettenrauch bilden sich stark karzinogene Derivate von Nikotin. Alle Typen von Lungenkarzinomzellen exprimieren Nikotinrezeptoren, die nikotinergen Azetylcholinrezeptoren gleichen. Somit ist es möglich, dass Nikotin direkt an der Pathogenese des Lungenkarzinoms beteiligt ist.

Das Lungenkarzinom weist zwar keinen klaren Mendel-Vererbungsmodus auf, es gibt jedoch einige Hinweise für eine potenzielle familiäre Assoziation. Diese schließen vererbte *rb*- (Patienten mit Retinoblastomen, die bis ins Erwachsenenalter überleben) und *p53*-Mutationen (Li-Fraumeni-Syndrom) ein. Untersuchungen zeigten weiter, dass Verwandte 1. Grads von Lungenkarzinompatienten ein signifikant (2- bis 3fach) höheres Risiko für Lungen- oder andere Karzinome haben, die häufig nicht mit Rauchen assoziiert sind. Außerdem ist die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung mit einem erhöhten Karzinomrisiko behaftet. Schließlich weisen einige Studien darauf hin, dass es eine Assoziation zwischen dem *p450*-Enzym-Phänotyp oder -Genotyp und der Entwicklung von Lungenkarzinom gibt (Tabelle 10.3).

**Genterapie.** In 9 Protokollen wurden bisher mindestens 73 Patienten mittels Gentransfer behandelt.

Tabelle 10.3. Vergleich zwischen dem kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, modifiziert nach Harrison (1994)

Charakteristika	Kleinzellig	Nichtkleinzellig
Histologie	Wenig Zytoplasma Kleine hyperchromatische Nuklei mit feinen Chromatinmustern Nukleoli nicht unterscheidbar Diffuse Zellschichten	Reichlich Zytoplasma Pleomorphe Nuklei mit groben Chromatinmustern Nukleoli oft auffallend Drüsenhafte oder schwammige Architektur
Allgemeine neuroendokrine Eigenschaften		
Dichte Kerngranula	Vorhanden	Fehlt <sup>a</sup>
L-Dopa-Dekarboxylaseaktivität	Hoch	Fehlt
Chromogranin	Vorhanden	Fehlt
Synaptophysin	Vorhanden	Fehlt
Neuronspezifische Enolase	Hoch	Gering
Kreatinkinase-BB-Isozyme	Hoch	Gering
Leu-7, HNK-1-Antigene	Vorhanden	Fehlt
Peptidhormonproduktion		
Gastrinfreisetzende Peptidgenprodukte	Vorhanden	Fehlt
Andere Neuropeptide	ACTH, AVP, Kalzitonin, ANF	PTH
Andere Marker		
HLA, $\beta_2$ -Mikroglobulin	Fehlt/gering	Vorhanden
Intermediäre Filamentmuster	„SCLC“	„Nicht-SCLC“
Neurofilamente	Vorhanden	Fehlt
Opioidrezeptoren	Vorhanden	Vorhanden
Nikotinrezeptoren	Vorhanden	Vorhanden
EGF-Rezeptoren	Gering oder fehlend	Vorhanden
Muzin	Fehlt	Vorhanden in Adenokarzinomen
Oberflächenassoziierte Proteine	Fehlt	Vorhanden
Karzinomembryonisches Antigen	Vorhanden	Vorhanden
Zytogenetik und Mutationen		
3p-Deletionen	Ungefähr 100%	>90%
<i>rb</i> -Genmutationen	Ungefähr 100%	>20%
<i>p53</i> -Mutationen	>90%	>50%
Andere Deletionen	Vorhanden	Vorhanden
<i>ras</i> -Mutationen	<1%	Ungefähr 30%
Überexpression der <i>myc</i> -Familie	>50%	>50%
Therapieantwort		
Strahlentherapie	Objektive Schrumpfung in 80–90% der Fälle Oft vollständige Antwort	Objektive Schrumpfung in 30–50% der Fälle Ungewöhnlich vollständig
Kombinationschemotherapie		
Allgemeine Regressionsrate	90%	30–40%
Vollständige Regressionsrate	50%	5%
Allgemeine 5-Jahre-Überlebensrate	5%	8%

<sup>a</sup> 10% der nichtkleinzelligen Lungenkarzinome haben Zellpopulationen, die neuroendokrine Marker exprimieren, und diese können am besten mit immunohistochemischen Färbungen nachgewiesen werden.

Target-Gene sind meist *p53* und *IL-2* sowie *GM-CSF*, *CD80*, *K-ras* und *TK*. Es liegen Ergebnisse aus 4 Studien vor. In 6 Patienten konnte gezeigt werden, dass ein Reporter-gen mittels adenoviralem Gentransfer sicher in Lungentumoren eingebracht und das Gen in den Tumorzellen der Wirte über mindestens 90 Tage exprimiert werden können. Alle biologischen Flüssigkeiten, die mittels PCR untersucht wurden, waren frei von rekombinantem

Virus (Tursz et al. 1996). Gahery-Segard et al. (1997) untersuchten in einer Phase-I-Studie in 4 Patienten die Immunantwort auf Transgen und Virusprodukte nach adenoviralem Gentransfer bei Lungenkarzinom. Es fand sich eine deutliche anti-adenovirale zytotoxische T-Zell-Antwort, wobei weiterhin ausreichend Transgen produziert wurde. Die Antikörperproduktion gegen das Transgen blieb durch die antiadenovirale Reaktion unbeein-

flusst, sodass eine Immunisierungstherapie auf diese Weise möglich wäre.

10 Patienten mit Bronchialkarzinom, die bereits maligne Pleuraergüsse aufwiesen, wurden nach Versagen aller konventionellen Therapien mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten behandelt, in die IL-2 ex vivo retroviral transferiert worden war. Die Toxizität war mit transientem geringem Fieber nur sehr niedrig. In 6 der 10 Patienten kam es innerhalb von mindestens 4 Wochen nicht nur zur Ausbildung von Pleuraergüssen und in 1 Patienten nicht mehr zur Rückbildung des Pleuraergusses, sondern zusätzlich zu einer Tumorverkleinerung im Computertomogramm (Tan et al. 1996). In einer anderen Studie konnte nach einer „Vakzinations“-Behandlung unter Verwendung von IL-2-transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen bei 1 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom keine Veränderung des Krankheitsverlaufs erreicht werden (Veelken et al. 1997). Am günstigsten waren bisher die Ergebnisse nach direkter Injektion eines retroviralen Vektors mit dem Wildtyp-p53-Gen in nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (Roth 1996, Roth et al. 1996). Die Phase-I-Studie begann 1995 mit der Behandlung eines 60-jährigen Manns mit einem nicht metastasierten, jedoch nicht resezierbaren Lungenkarzinom. Bestrahlung und Chemotherapie waren ineffektiv gewesen. Er erhielt eine bronchoskopische intratumorale Injektion eines retroviralen Vektors mit dem Neomycinresistenzgen (NeoR-Gen) und dem p53-Tumorsuppressorgen. Die Vektorpräsenz wurde durch die NeoR-Expression in Biopsien 24 h nach der Behandlung bestimmt und betrug etwa 40%. Am Tag 5 begannen sich die beiden vorbestehenden Läsionen in eine entzündliche nichtkarzinöse Fibrose zurückzubilden, wobei bereits 80% am Ende des ersten Monats verschwunden waren. Eine therapiebedingte Toxizität fand sich nicht. Insgesamt wurden 9 Patienten behandelt, bei denen die konventionelle Therapie versagte hatte. Die direkte intratumorale Applikation erfolgte über Bronchoskopie oder kontrolliert durch die Computertomographie. Mindestens 30 Tage nach dem Transfer ließ sich das therapeutische Gen nachweisen, wobei über 5 Monate keine signifikante vektorbezogene Toxizität festzustellen war. Nach der Behandlung ließ sich häufiger als in den unbehandelten Geweben programmierter Zelltod (Apoptose) nachweisen. In 3 Patienten kam es zur Tumorregression und in weiteren 3 Patienten zum Sistieren des Tumorwachstums (Roth et al. 1996). Inzwischen führte Roth (1997) auch eine Studie mit adenoviralem Transfer von p53 durch. Bis zum

Abschluss im Juli 1997 wurden bereits 53 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom eingeschlossen (Wiley 1998).

#### 10.4.2.4 Mesotheliom

**Ätiologie und Inzidenz.** Das maligne Mesotheliom ist ein primäres Neoplasma der mesothelialen Auskleidungen der Pleura- (80%) oder Peritonealhöhlen (19,5%), selten auch der *Tunica vaginalis* des Skrotums. Es wurde ein Zusammenhang mit vorhergehender Exposition mit Asbest gezeigt. Weiterhin kann es mit bestimmten genetischen Prädispositionen und vorangegangenen Virusexpositionen (z.B. *Simian virus 40*) assoziiert sein. Obwohl die Inzidenz relativ selten ist, ist das Mesotheliom für etwa 3000 Tote/Jahr in den USA verantwortlich, vergleichbar mit den durch das Hodgkin-Lymphom verursachten Todesfällen. Die Inzidenz steigt in US-amerikanischen Männern mit einer Rate von 13% und noch schneller in anderen Regionen der Welt an, in denen die Exposition gegenüber Asbest nicht gut geregelt und überwacht ist.

Das mittlere Überleben für Patienten mit Mesotheliom beträgt ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 1 und 2 Jahren, wobei das Überleben für Patienten mit diesem Tumor sehr variabel sein kann. Als Behandlung stehen 3 Standardtumortherapien zur Verfügung, die entweder allein oder in Kombination eingesetzt werden:

1. die chirurgische Resektion,
2. die Bestrahlung und
3. die Chemotherapie.

Leider hat bis heute keine dieser Therapien eine effiziente Lebensverlängerung bewirkt. Bei der Resektion verbleiben oft Geweberänder, die nicht tumorfrei sind; die Bestrahlung ist durch das Tumolvolumen und die mangelnde Toleranz umliegender Gewebe und Organe gegenüber der Bestrahlung limitiert, und die Chemotherapie war in der Regel ineffektiv (maximal 20–30% Therapieantwort bei Kombinationschemotherapie). Auch bei extensiven Kombinationstherapien war die Prognose durch die erhebliche perioperative Morbidität und Mortalität sehr schlecht und resultierte meist in einem Überleben von nur wenigen Monaten. Aus diesem Grund sind andere Therapien notwendig, wobei bestimmte Charakteristika der Erkrankung für eine Gentherapie sprechen. Ein Vorteil ist die einzigartige Zugänglichkeit des Tumors über den Pleuraraum für die Vektorapplikation und die nachfolgenden Untersuchungen ein-

schließlich Biopsien. Eine Kombination mit einer vorangehenden Tumorverkleinerung erscheint dabei viel versprechend. Ein weiterer Vorteil ist die flächenhafte lokale Ausbreitung, die für die Morbidität und Mortalität der Erkrankung verantwortlich ist, anstelle einer frühen Metastasierung in entlegene Organe. Somit könnten kleine lokale Effekte bereits einen erheblichen Einfluss auf die Prognose haben.

**Gentherapie.** Bisher wurden 33 Patienten in 3 Protokollen eingeschlossen. Eine Phase-I-klinische Studie wurde inzwischen abgeschlossen, bei der ein adenoviraler Vektor mit dem HSV-*tk*-Gen eingesetzt worden war (Albelda et al. 1997). Vorläufige Berichte erwähnen eine nur geringe Toxizität und den molekularen Nachweis eines erfolgreichen In-situ-Gentransfers. Auch Serman et al. (1998a) verwendeten in einer Phase-I-Studie die Kombination eines adenoviralen Vektors mit dem HSV-*tk*-Suizidgen. Aufsteigende Dosen wurden als intrapleurale Applikationen verwendet, um maximal verträgliche Dosen für diese lokale Therapie herauszufinden. Insgesamt wurden 21 bis dahin unbehandelte Patienten eingeschlossen, wobei Virusdosen von  $1 \times 10^9$  pfu bis zu  $1 \times 10^{12}$  pfu eingesetzt wurden. Es handelte sich um replikationsinkompetente adenovirale Vektoren mit dem HSV-*tk*-Gen unter der Kontrolle eines RSV-Promotors (Rous-Sarkoma-Virus-Promotors). 2 Wochen nach der intrapleuralen Applikation erfolgte die systemische Therapie mit Ganciclovir. Die ersten 15 Patienten wurden thorakoskopischen Pleurabiopsien vor und 3 Tage nach der Vektorapplikation unterzogen. Bei den letzten 6 Patienten wurde nur eine Biopsie nach der Vektorinstillation durchgeführt. Es wurde keine Toxizität erreicht, die die Dosis limitiert hätte. Die Nebenwirkungen waren minimal, mit Fieber, Anämie, transienten Erhöhungen der Leberenzyme, bullösen Hauteruptionen und vorübergehenden systemischen Entzündungsreaktionen bei den Patienten, die die höchsten Dosen erhielten. Erhebliche intrapleurale und intratumorale Immunreaktionen wurden ausgelöst. Insgesamt wurde diese intrapleurale Therapie gut toleriert. Mittels RNA-PCR, In-situ-Hybridisierung, Immunhistochemie und Immunblots konnte der erfolgreiche Gentransfer zumindest bei den hohen Therapiedosen nachgewiesen werden. Die Therapie war dabei allerdings durch die oft fleckförmige und oberflächliche Verteilung des Gentransfers im Bereich des Tumors limitiert. Eine klinische Beurteilung der Patienten in dieser Phase-I-Studie war aufgrund der Heterogenität der Patienten bezüg-

lich Alter, Stadium, Histologie und Vektordosis schwierig. Mehrere Patienten mit Karzinomen im frühen Stadium und ein Patient in fortgeschrittenem Stadium zeigten eine Verlangsamung des klinischen und/oder radiologischen Progresses. Allerdings ist die Beurteilung der Tumorprogression beim Mesotheliom schwierig.

Als immunmodulatorische Maßnahme führte eine australische Gruppe eine Phase-I-Studie unter Verwendung des rekombinanten Vacciniavirus mit dem humanen IL-2-Gen durch (Davidson et al. 1992, Mukherjee et al. 1997). Hierfür wurde ein partiell immunkompetentes Vacciniavirus (VV) verwendet und wiederholt als VV-IL-2-Konstrukt intratumoral in tastbare Tumormassen von Patienten mit fortgeschrittenem malignem Mesotheliom injiziert. Biopsien der Tumormassen der Brustwand wurden vor der Therapie und an den Tagen 1–3 sowie 6–8 nach der Vektorinjektion jedes Behandlungszyklus gewonnen. Kulturen von Tumorbiopsien und Blutproben wurden in Hinblick auf Viruspräsenz und VV-IL-2-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Das Serum wurde zusätzlich auf Antikörper gegen Vacciniavirus untersucht. Familienmitglieder, Krankenhauspersonal in Kontakt mit den behandelten Patienten und der erste behandelte Patient erhielten Impfungen gegen Vacciniavirus, bevor die Gentherapien durchgeführt wurden. Es wurden 4 Patienten mit Brustwandtumormassen durch Mesotheliom in die Studie eingeschlossen. Sie erhielten insgesamt 13 Injektionen von  $1 \times 10^7$  pfu VV-IL-2-Vektor. VV-IL-2-mRNA wurde in den seriellen Tumorbiopsien 3–6 Tage nach der Injektion nachgewiesen, wobei die Spiegel reproduzierbar bis zum Tag 8 bis an die Nachweisgrenze abnahmen. In allen Patienten wurden durch die intratumoralen Vacciniavirusinjektionen signifikante Serumantikörperspiegel induziert. Diese Antikörperspiegel hatten allerdings interessanterweise keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild oder die Dauer der VV-IL-2-mRNA-Expression, sie verhinderten lediglich eine Kultur des Virus aus den Tumorbiopsien. Lediglich aus dem Tumor des einzigen Patienten, der keine Impfung erhalten und keine vorbestehenden Antikörpertiter hatte, ließ sich Virus kultivieren. Die Toxizität war bis auf geringes Fieber minimal, und es gab keine klinischen oder serologischen Zeichen einer Ausbreitung dieses partiell replikationskompetenten Virus als Folge des Patientenkontakts. Bis jetzt wurde in keinem der Patienten eine signifikante Tumorregression beobachtet, lediglich geringe intratumorale zelluläre Immunantworten traten auf. Als nächster Schritt ist eine Änderung der Dosis

und der zeitlichen Planung bei den Behandlungen vorgesehen.

Eine andere Phase-I-Studie kombiniert als Elemente toxische Medikamentenvorstufen mit Immunverstärkungsgenterapie (Sterman et al. 1998b). Hier werden allogene bestrahlte Zellen einer Ovarialkarzinomzelllinie nach retroviraler Transfektion mit HSV-*tk* (PA1-STK-Zellen) intrapleural injiziert und anschließend eine systemische Behandlung mit Ganciclovir durchgeführt. Die Rationale hinter dieser Studie ist, dass die PA1-STK-Zellen nach der Instillation in den Bereich des intrapleuralen Tumors migrieren werden und dann das Abtöten der Mesotheliumzellen durch einen *Bystander*-Effekt nach den Ganciclovirinfusionen erleichtern sollen. Das gleiche Behandlungsprinzip wird derzeit von Freeman et al. (1992) bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom eingesetzt. Ziel der intrapleuralen Therapie ist es, mit aufsteigenden Dosen die maximal tolerierbare Dosis an PA1-STK-Zellen herauszufinden. Für die Applikation wird ein kleiner intrapleuraler Katheter eingelegt. Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor.

#### 10.4.2.5 Nierenzellkarzinom

**Inzidenz.** Das Nierenzellkarzinom, auch renales Adenokarzinom oder Hypernephrom genannt, macht 85% aller primären Nierenmalignome aus. Ungefähr 25 000 neue Fälle mit etwa 10 000 Todesfällen werden jährlich allein in den USA diagnostiziert. Der Altersgipfel liegt zwischen 55 und 60 Jahren, wobei die Geschlechterverteilung Männer:Frauen=2:1 beträgt. Risikofaktoren sind Zigarettenrauchen und die Exposition gegenüber Cadmium. Eine vererbare Form des Nierenzellkarzinoms findet sich mit einem hohen Anteil bei Patienten mit Morbus Hippel-Lindau (Hämangiome der Netzhaut und des Zentralnervensystems mit autosomal-dominanter Übertragung). Der genetische Defekt, der mit dieser Erkrankung assoziiert ist, wurde identifiziert. Marker mit chromosomalen Lokalisationen zwischen Chromosom 3 und 8 sowie Chromosom 3 und 11 wurden in einigen Familien mit gehäuften Nierenkarzinom gefunden. Andere zytogenetische Abnormalitäten umfassen veränderte Chromosomen 1, 11 und 17. Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz können Nierenzysten und damit assoziierte Nierenkarzinome entwickeln. Das Nierenzellkarzinom entsteht in den Epithelien der proximalen Tubuli.

**Stadieneinteilung, Primärbehandlung und Prognose.** Falls es keine Hinweise für eine Metastasierung

gibt, ist die radikale Nephrektomie Therapie der Wahl. Viele Urologen empfehlen zusätzlich eine regionale Lymphknotenentfernung. Die perioperative Embolisation der wichtigsten Nierenarterie mit einer Anzahl verschiedener Agenzien erleichtert die Operation bei besonders großen Läsionen. Die peri- oder postoperative Bestrahlung spielt keine Rolle.

Entsprechend der chirurgischen und pathologischen Evaluation ergeben sich folgende Stadien:

1. im Stadium I ist der Tumor durch die Nierenkapsel begrenzt;
2. im Stadium II besteht eine Invasion durch die Nierenkapsel in die Gerota-Faszie;
3. im Stadium III besteht eine Beteiligung regionaler Lymphknoten, der ipsilateralen Nierenvene oder V. cava;
4. im Stadium IV sind Fernmetastasen nachweisbar.

Das 5-Jahres-Überleben für das Stadium I beträgt 60–75%, für das Stadium II 47–65%, für das Stadium III ohne Beteiligung regionaler Lymphknoten 25–50%, mit Beteiligung regionaler Lymphknoten 5–15% und für das Stadium IV <5%. Das Ansprechen auf Chemotherapie beträgt nur etwa 15%.

**Genterapie.** Bisher wurden mindestens 79 Patienten innerhalb von 6 Protokollen genterapeutisch behandelt. In 5 Patienten mit Nierenzellkarzinom bzw. metastasierendem Melanom wurden tumorinfiltrierende Lymphozyten mit Hilfe eines Markergens retroviral transduziert. Die Transfektionseffizienz betrug 1–26%, wobei die genmodifizierten Lymphozyten noch mindestens 260 Tage nach der Reinjektion nachweisbar waren. Die erhoffte selektive und lang anhaltende Retention in den Tumoren fand sich ähnlich wie in den Melanompatienten nicht (Merrouche et al. 1995). In einer Phase-I-Studie konnte unter Verwendung von IL-2-transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen gezeigt werden, dass in 1 von 3 behandelten Patienten eine präferenzielle Lyse autologer und partiell allogener Nierenzellkarzinomzellen bestand. Klinisch konnte bei 1 Patienten über 5 Monate während und nach der Immunisierung eine Stabilisierung des Krankheitszustands erreicht werden (Veelken et al. 1997). Eine weitere Studie zur Immuntherapie mit IL-2-sezernierenden, retroviral transduzierten Nierenkarzinomzellen wird derzeit von Gänsbacher et al. (1992) durchgeführt. Weitere Target-Gene sind IL-4, HLA-B7 und GM-CSF, wobei Retroviren und Liposomen als Vektoren Verwendung finden.

#### 10.4.2.6 Kolonkarzinom

Das Dickdarmkarzinom ist nach dem Lungenkarzinom das zweithäufigste Malignom in den USA. Ungefähr 152 000 Neuerkrankungen mit 57 000 Todesfällen wurden in den USA für 1993 vorausgesagt. Die Inzidenz und Mortalität dieses extrem weit verbreiteten Malignoms haben sich in den letzten 40 Jahren nicht wesentlich geändert. Das kolorektale Karzinom kommt gewöhnlich in Patienten  $\geq 50$  Jahre vor.

**Ätiologie und Risikofaktoren: Diät.** Die Ätiologie des Dickdarmkarzinoms scheint meist mit Umweltbedingungen assoziiert zu sein. Die Erkrankung tritt häufiger in der Bevölkerung der oberen sozioökonomischen Klassen auf, die in Stadtgebieten leben. Epidemiologische Studien in verschiedenen Ländern haben eine direkte Korrelation zwischen der Sterblichkeit aufgrund des kolorektalen Karzinoms und des Pro-Kopf-Verbrauchs von Kalorien, fleischlichem Protein, Fett und Öl sowie der Erhöhung von Serumcholesterinspiegeln und der Sterblichkeit durch die koronare Herkrankheit gezeigt. Geographische Variationen bezüglich der Inzidenz scheinen keine genetische Grundlage zu haben, da eingewanderte Bevölkerungsgruppen tendenziell ähnliche Inzidenzraten für das kolorektale Karzinom aufweisen wie die Bevölkerung ihrer Gastländer. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass bestimmte Ernährungsweisen die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms beeinflussen. Bisher konnte jedoch kein einzelner Ernährungsbestandteil als ursächliches oder protektives Agens ausreichend identifiziert werden, um spezifische Empfehlungen für weitgehende Änderungen der Essgewohnheiten zu rechtfertigen. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass die Gabe von Kalzium und Aspirin das Risiko eines Kolonkarzinoms reduzieren kann. Kalzium inaktiviert Karzinogene im Darm möglicherweise durch die Bildung von unlöslichen Seifen. Diese Erkenntnis basiert auf der Beobachtung, dass Kalziumgaben bei familiärem Kolonkarzinom zu einer Verringerung der Proliferation von Epithelzellen des Kolons führten und auf der Untersuchung der Essgewohnheiten einer Bevölkerungskohorte von 2000 Männern  $>19$  Jahre. Aspirin, ein Hemmer des Arachidonsäuremetabolismus, hemmt das chemisch induzierte Wachstum von Kolontumoren in Nagern. Es gibt auch Hinweise dafür, dass es die Mortalität aufgrund von kolorektalen Tumoren im Menschen reduzieren kann. Größere Studien hierzu fehlen jedoch noch.

**Hereditäre Faktoren und Syndrome.** Mindestens 25% der Patienten mit kolorektalem Karzinom haben als Hinweis für eine mögliche hereditäre Prädisposition eine familiäre Anamnese in Hinblick auf diese Erkrankung. Solche vererblichen Dickdarmkarzinome können in 2 Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. die gut untersuchten, jedoch relativ seltenen Polyposissyndrome und
2. die weniger charakterisierten, wesentlich häufigeren Non-Polyposissyndrome.

Die *Polyposis coli* ist eine seltene Erscheinung, die durch tausende adenomatöse Polypen des gesamten Dickdarms charakterisiert ist. Die Veranlagung ist in der Regel autosomal-dominant, Spontanmutationen werden gelegentlich beobachtet. Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte die Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (APC-Gen) mit der Polyposis coli assoziiert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust des Genmaterials zu einem Fehlen von Tumorsuppressorgenen führt, deren Genprodukt die Inhibition von Tumorwachstum bewirken würde. Kombiniert mit der Polyposis coli können deshalb auch andere Tumoren auftreten, die je nach ihrer Lokalisation zu einem Gardner- bzw. Turcot-Syndrom führen, wobei die Polyposis coli oft erst um das 25. Lebensjahr festgestellt wird. Ohne chirurgische Therapie (totale Kolektomie) entwickelt sich in den meisten Patienten vor dem 40. Lebensjahr ein kolorektales Karzinom. Die Polyposis coli wurde bereits gut untersucht und scheint pathophysiologisch auf abnormalen Proliferationsmustern der Kolonmukosa mit fehlender zellulärer Reparatur zu basieren. Nachkommen von Patienten mit Polyposis coli, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ihrer Eltern meist bereits Teenager sind, haben ein Risiko von 50%, ebenfalls unter dieser Krankheit zu leiden und müssen bis zum 35. Lebensjahr regelmäßig endoskopisch untersucht werden. Molekularbiologische Bestimmungen für das APC-Gen könnten in Zukunft die Diagnosestellung erleichtern.

Die hereditäre Prädisposition für das kolorektales Karzinom in Familien ohne Anamnese für Polyposis coli, das so genannte hereditäre Non-Polyposis-Dickdarmkarzinomsyndrom, scheint gesichert, seitdem mehrere 100 Familien identifiziert wurden, die ein bis zu 50%iges Risiko für Kolonkarzinome haben. Betroffen waren hier insbesondere die proximalen Dickdarmanteile. In diesen Familien waren auch gehäufte multiple Primärtumoren anzutreffen, bei Frauen insbesondere die



Kombination von kolorektalen und endometrialen Adenokarzinomen. Auch hier scheint der Vererbungsmodus autosomal-dominant zu sein, wobei wahrscheinlich eine Abnormalität des Chromosoms 2 zugrunde liegt. Das Manifestationsalter des Adenokarzinoms liegt bei 45 Jahren und somit 15–20 Jahre früher als in der allgemeinen Bevölkerung. Auch hier müssen sich Nachkommen regelmäßigen endoskopischen Untersuchungen ab dem 25. Lebensjahr unterziehen.

**Entzündliche Darmerkrankungen.** Das Dickdarmkarzinom stellt eine nicht seltene Komplikation über viele Jahre bestehender entzündlicher Darmerkrankungen dar. Die ulzerative Kolitis führt dabei häufiger zu einem Neoplasma als die granulomatöse Kolitis, wobei diese beiden Kolitisformen allerdings nicht immer sicher voneinander abzugrenzen sind. In den ersten 10 Jahren nach Beginn einer entzündlichen Darmerkrankung ist das Risiko noch sehr gering, steigt dann jedoch um 0,5–1,0%/Jahr, was nach 25 Jahren zu einem kumulativem Risiko von 8–30% führt. Die Vorsorgeuntersuchungen zur rechtzeitigen Erkennung der Tumorentstehung sind bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen besonders schwierig, da sich die Symptome wie blutige Diarrhö, Bauchkrämpfe und Darmobstruktion sehr gleichen. Der Wert einer histologischen Untersuchung von Mukosabiopsien mit dem Ziel der Identifizierung von prä-malignen Mukosadysplasien als Entscheidungshilfe für eventuelle chirurgische Resektionen ist noch ungewiss.

**Andere Hochrisikokonstellationen.** Aus bisher unbekanntem Gründen weisen Patienten mit einer Endokarditis oder Septikämie mit *Streptococcus bovis* eine höhere Inzidenz von okkulten kolorektalen Karzinomen und Karzinomen des oberen Gastrointestinaltrakts auf. Nach Anlage einer Ureter-sigmoidostomie besteht nach 15–30 Jahren ein um 5–10% höheres Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln.

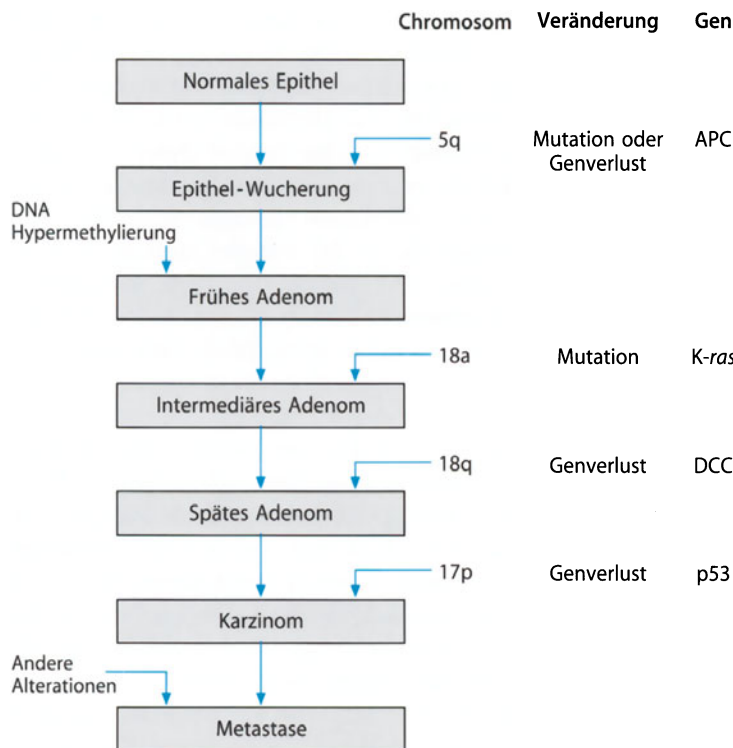
**Polypen.** Es wird angenommen, dass unabhängig von der Ätiologie die Mehrheit der kolorektalen Karzinome aus adenomatösen Polypen entstehen. Ein Polyp ist eine makroskopisch erkennbare Protrusion der Schleimhautoberfläche und kann pathologischerseits in nichtneoplastische Hamartome (juveniler Polyp), eine hyperplastische Mukosaproliferation (hyperplastischer Polyp) oder einen adenomatösen Polyp eingeteilt werden. Ausschließlich Adenome sind eindeutig prä-maligne, und lediglich

eine Minderheit solcher Läsionen entwickeln sich zu einem Karzinom. Das Screening ganzer Bevölkerungsgruppen und Autopsiestudien ergab, dass sich in etwa 30% der Menschen mittleren und höheren Lebensalters adenomatöse Polypen finden. Aufgrund dieser Prävalenz und der bekannten Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ergibt sich, dass weniger als 1% der Polypen tatsächlich maligne werden. Die meisten Polypen verursachen keine Symptome und bleiben unentdeckt. Okkultes Blut im Stuhl wird in <5% dieser Patienten nachgewiesen.

**Pathogenese.** Eine Reihe von molekularen Veränderungen wurden für die DNA adenomatöser Polypen, dysplastischer Läsionen und für Polypen, die mikroskopische Foci von Tumorzellen enthielten (z.B. *Carcinoma in situ*), beschrieben. Vereinbar mit einem viele Schritte umfassenden Prozess, der schließlich zum Karzinom führt, wurden eine Reihe von Veränderungen beobachtet, die meist mit einer spezifischen Mutation des *ras*-Protoonkogens beginnen, gefolgt von Deletionen der Chromosomen 5, 18 und 17 (Abb. 10.11). Der Verlust von genetischem Material des kurzen Arms von Chromosom 17 ist offensichtlich mit der Aktivierung eines Gens assoziiert, das zu einer Produktion von transformationsassoziiertem *p53* führt. Auf diese Weise kann die Alteration des Proliferationsmusters der Kolonmukosa, die zur Entwicklung eines Polypen und schließlich zu einem Karzinom führt, die mutationsbedingte Aktivierung eines Onkogens verursachen, gefolgt von und verbunden mit dem Verlust von Genen, die normalerweise die Tumorentstehung unterdrücken. Basierend auf diesem Modell wird angenommen, dass sich das Neoplasma ausschließlich in solchen Polypen entwickeln kann, in denen alle diese Mutationen stattfinden.

**Tumormarker.** Vor jeder Resektion sollte *Carcinoembryonic antigen* (CEA) bestimmt werden. Kommt es im Verlauf zu einem Anstieg des Markers, besteht der Verdacht auf ein Rezidiv. Die Anwesenheit eines abnormalen DNA-Gehalts (z.B. Aneuploidität) und spezifische chromosomale Deletionen (z.B. so genannter Allelverlust) von Tumorzellen, wie sie mit Flusszytometrie und Restriktionslängenpolymorphismusanalyse bestimmt werden können, scheinen mit einem höheren Metastasierungsrisiko verbunden zu sein.

**Genterapie.** Mindestens 32 Patienten wurden bisher im Rahmen von 11 genterapeutischen Proto-



**Abb. 10.11.** Genetische Veränderungen in den verschiedenen Stadien der Entstehung von kolorektalen Tumoren. Erbliche Genmutationen von Chromosom 2, die durch einen Replikationsfehler des gesamten Genoms zu einem Kolonkarzinom führen, sind nicht angezeigt, modifiziert nach Harrison (1994)

kollen behandelt. In einer Phase-I-Studie konnte unter Verwendung von IL-2-transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen bei 2 Patienten keine Veränderung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden (Veelken et al. 1997). Rubin et al. (1994) verwendeten in ihrer Phase-I-Studie eine Immunisierungsstrategie mit direktem Gentransfer von HLA-B7 in Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Beim Abschluss der Studie im Jahr 1995 konnten die In-vivo-Expression von HLA-B7 und eine Immunantwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bestätigt werden. Eine Tumorregression fand sich in 6 von 15 behandelten Patienten, 4 Patienten starben jedoch im Rahmen der Tumorprogression. Die Erbrobung einer anderen Immunisationsstrategie erfolgt derzeit in 2 weiteren klinischen Protokollen. CEA-exprimierendes rekombinantes Vacciniavirus (Tsang et al. 1995) oder ein entsprechendes CEA-exprimierendes Polynukleotid (Conry et al. 1996) wird in Tumorpatienten injiziert, wodurch die Produktion von Antikörpern gegen Kolonkarzinom, das CEA als Antigen trägt, angeregt wird.

#### 10.4.2.7 Leberzellkarzinom (hepatozelluläres Karzinom)

**Epidemiologie und Ätiologie.** Das primäre hepatozelluläre Karzinom ist einer der häufigsten Tumoren der Welt. Es kommt v. a. in Asien und Teilen Afri-

kas vor, wo die Inzidenz pro Jahr bis zu 500 Fälle/100000 Einwohner beträgt. In Westeuropa und in den Vereinigten Staaten ist es weit weniger vertreten und macht nur 1–2% aller malignen Tumoren bei Autopsie aus. Das hepatozelluläre Karzinom ist in Männern bis zu 4-mal häufiger als in Frauen und entsteht meist in der zirrhotischen Leber. Die höchste Inzidenz besteht in der westlichen Welt in der 5. bis 6. Lebensdekade, in den Regionen Afrikas und Asiens, die eine hohe Prävalenz für das Leberkarzinom aufweisen, jedoch 1–2 Dekaden früher.

Der Hauptgrund für die hohe Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms in Teilen Afrikas und Asiens liegt in der Häufigkeit chronischer Infektionen mit dem Hepatitis-B- (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV). Diese chronischen Infektionen führen oft zur Leberzirrhose, was wiederum einen hohen Risikofaktor für das hepatozelluläre Karzinom darstellt; 60–90% dieser Tumoren treten in Patienten mit makronodulärer Zirrhose auf. Die Rolle von HBV als Faktor erscheint sehr überzeugend. Untersuchungen in Regionen Asiens, in denen HBV-Infektionen und das hepatozelluläre Karzinom besonders prävalent sind, zeigten, dass die Inzidenz des Karzinoms über die Zeit etwa 100fach höher in Individuen mit HBV-Infektion ist als in nichtinfizierten Kontrollpersonen. In Patienten mit HBV-Infektionen und hepatozellulärem

Karzinom kann die HBV-DNA sowohl in Tumorzellen als auch in umliegenden normalen Hepatozyten in die genomische DNA der Gastzellen integriert sein. Zusätzlich kann es durch insertionelle Mutagenese, chromosomales Rearrangement oder transkriptionale Transaktivierungsaktivitäten des X-Chromosoms und der Prä-52/S-Regionen des HBV-Genoms zu Veränderungen der zellulären Genexpression kommen. Diese Veränderungen treten wahrscheinlich begünstigt durch den Prozess der Leberverletzung und -reparatur auf.

Seit 1989 entdeckt wurde, dass HCV für die meisten Fälle der Non-A-Non-B-Hepatitis zu ständig ist, konnten auch zahlreiche Beweise gefunden werden, dass HCV auch beim hepatozellulären Koma eine Rolle spielt. Tatsächlich zeigten sogar Untersuchungen aus Europa und Japan, dass HCV in Patienten mit hepatozellulärem Koma eine größere Prävalenz hat als HBV. In einigen Patienten finden sich sogar beide Infektionen, wobei aber offensichtlich kein Unterschied im Verlauf des Lebertumors besteht, unabhängig von einer singulären oder kombinierten Infektion. Lediglich der Zeitpunkt des Auftretens des hepatozellulären Karzinoms wird durch die Art des Virus beeinflusst: In Asien wird die Hepatitis B bereits bei der Geburt durch eine perinatale Übertragung erworben, während Hepatitis C meist durch Bluttransfusionen im Erwachsenenalter erworben werden. Dementsprechend tritt das Leberkarzinom bei den lebenslangen HBV-Infektionen durchschnittlich 1–2 Lebensdekaden früher auf als bei HCV-Infektionen.

Jedes Agens oder jeder Faktor, der zu einer chronischen, geringgradigen Leberzellschädigung und -mitose beiträgt, macht genetische Alterationen in Hepatozyten wahrscheinlicher. Somit ist also jede chronische Lebererkrankung ein Risikofaktor und stellt eine Prädisposition für die Entwicklung eines Leberzellkarzinoms dar. Hierzu gehören die Alkoholleber, der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, die Hämochromatose und die Tyrosinämie. In Afrika und Südchina ist das Aflatoxin B<sub>1</sub> ein weitverbreiteter Schadstoff. Dieses Mykotoxin scheint eine ganz spezifische Mutation des Kodons 249 im Tumorsuppressorgen p53 zu induzieren. Verlust, Inaktivierung und Mutation des p53-Gens wurden mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht und sind die häufigste genetische Störung menschlicher Tumoren. Aus diesem Grund wird angenommen, dass HBV und Aflatoxin B<sub>1</sub> bei der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms in denjenigen Regionen Afrikas und Südchinas eine Rolle spielen, wo beide Agenzien häufig vertreten sind.

Angesichts der männlichen Prädominanz beim Leberkarzinom dürften auch hormonelle Faktoren eine Rolle spielen. Hepatozelluläre Karzinome können bei lang andauernder Androgenbehandlung, bei Exposition gegenüber Thoriumdioxid oder Vinylchlorid und wahrscheinlich auch bei Exposition gegenüber Östrogenen in Form von oralen Kontrazeptiva auftreten.

**Klinische und Labormerkmale.** Zu Beginn können Leberkarzinome klinisch unerkannt bleiben, da sie häufig in Patienten mit Leberzirrhose vorkommen, und so ihre Symptome und Zeichen als Progress der Grunderkrankung gedeutet werden können. Am häufigsten klagen die Patienten über Schmerzen mit der Entdeckung einer abdominalen Raumforderung im rechten oberen Quadranten. In 20% der Fälle besteht auch ein blutig tingierter Aszites. Selten kommt es zu einem Ikterus, es sei denn, der Gallengang wird beeinträchtigt. Laborchemisch sind Anstiege der alkalischen Phosphatase, des  $\alpha$ -Fetoproteins (AFP) und eines abnormalen Prothrombins, des Des- $\gamma$ -Korboxyprothrombins im Serum häufig. AFP-Spiegel  $>500 \mu\text{g/l}$  werden in etwa 70–80% der Patienten mit hepatozellulärem Karzinom gefunden, die Spiegel bei Lebermetastasen sind meist niedriger. Ein persistierend hoher Spiegel von AFP in Patienten mit Lebererkrankungen und ohne Hinweis für gastrointestinale Tumoren spricht sehr für das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms. 20–30% der Patienten weisen jedoch keine erhöhten AFP-Spiegel auf. Weitere diagnostische Hilfen und Mittel sind das Vorliegen paraneoplastischer Syndrome, Bildgebungsverfahren, Leberbiopsie und Laparoskopien.

Die Krankheit verläuft sehr schnell, ohne Behandlung versterben die Patienten innerhalb von 3–6 Monaten. In einzelnen Fällen kann eine Therapie das Überleben verlängern, und gelegentlich bietet die chirurgische Resektion die Chance einer Heilung. Nur wenige Patienten haben jedoch resektable Tumoren oder es sind bereits entfernte Metastasen vorhanden, meist in Lunge, Gehirn, Knochen oder Nebennieren. Die Lebertransplantation ist eine alternative Therapieoption, jedoch limitiert durch Rezidive oder Metastasen, die nach der Transplantation unter Immunsuppression begünstigt auftreten. Experimentelle Vorgehensweisen sind die Leberarterienembolisation mit Chemotherapie (Chemoembolisation), die Alkoholablation mit ultraschallgesteuerter perkutaner Injektion, die ultraschallgeführte Kryoablation und eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern fusioniert mit zytotoxischen Agenzien.

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

#### 10.4.2.8 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom liegt in seiner Inzidenz an 5. Stelle aller Tumoren von Frauen und an 3. Stelle der gynäkologischen Tumoren.

Unter den malignen gynäkologischen Tumoren verursacht das Ovarialkarzinom die meisten Todesfälle. Verantwortlich sind der Mangel an wirksamen Screening-Methoden bei den Vorsorgeuntersuchungen und die geringen Symptome im Anfangsstadium, was dazu führt, dass sich 70% der betroffenen Frauen erst in einem fortgeschrittenen Stadium vorstellen. Die Prognose hängt v.a. von der Histologie ab (Tabelle 10.4). Mehr als 85% der Ovarialkarzinome stammen aus dem Epithel, das die Oberfläche der Ovarien bedeckt oder einge-

schlossene Zysten umgrenzt, während sich <15% aus dem Stroma und den Keimzellen der Ovarien entwickeln. Letztere Tumoren sind zwar relativ selten, können jedoch meist kurativ behandelt werden, oft sogar unter Erhaltung der reproduktiven Funktion der Ovarien. Die häufigeren epithelialen Tumoren sprechen zwar auf eine zellverringende Chirurgie und zytotoxische Chemotherapie an, ein Überleben über lange Zeitdauer wird jedoch nur in 1/3 der Fälle mit diesem histologischen Typ beobachtet. Trotz chirurgischer Maßnahmen und konventioneller Chemotherapie überleben langfristig selten mehr als 15–30% der Patientinnen.

**Inzidenz und Epidemiologie.** In den Vereinigten Staaten beträgt das Risiko einer Frau, im Lauf ihres Lebens ein Ovarialkarzinom zu entwickeln 1:70. Allein 1992 wurden 21 000 Fälle festgestellt, wobei 13 000 Frauen an dieser Erkrankung verstarben. Keimzelltumoren treten meist innerhalb der ersten 3 Lebensdekaden auf, während sich Stromazelltumoren vom Alter unabhängig entwickeln. Juvenile Granulosazelltumoren und Sertoli-Leydig-Zelltumoren werden meist in jungen Frauen beobachtet, während die häufigste Inzidenz des adulten Granulosazelltumors in der perimenopausalen Periode liegt. Das häufigere epitheliale Ovarialkarzinom findet sich kaum in Frauen <35 Jahren, danach steigt die Inzidenz jedoch erheblich an und erreicht einen Höhepunkt um das 75. bis 80. Lebensjahr. Das mittlere Alter von Patienten mit epitheliale Ovarialkarzinom beträgt 60 Jahre. Der einzige und damit wichtigste Risikofaktor für das epitheliale Ovarialkarzinom ist somit das Alter >40 Jahre.

Die meisten Fälle des epithelialen Ovarialkarzinoms sind sporadisch. Weniger als 5% von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gehören zu Familien mit autosomal-dominantem Auftreten von Ovarial-, Mamma-, Endometrium- und Kolonkarzinom. In dieser Konstellation kann das Risiko bis zu 50% betragen. Patienten mit 2 oder mehr Verwandten 1. Grads mit Ovarialkarzinom gehören mit großer Wahrscheinlichkeit zu solchen Familien und eine einzige Verwandte 1. Grads mit einem Ovarialkarzinom erhöht das Risiko mindestens um das 3Fache. Hat eine Patientin selbst bereits ein Mamma- oder kolorektales Karzinom durchgemacht, ist das Risiko für ein zusätzliches Ovarialkarzinom auf das 2Fache erhöht.

Unter den Umweltfaktoren erhöhen eine fettreiche Diät und Laktose bei Patientinnen mit relativ niedrigen Spiegeln an Galaktose-1-Phosphatidyltransferase das Risiko für ein epitheliales Ovarial-

**Tabelle 10.4.** Histologische Klassifikation des primären Ovarialkarzinoms, modifiziert nach Harrison (1994)

Lokalisation	Klassifikation
Epithelial	Serös
	Mukös
	Endometrioid
	Klare Zellen „mesonephroid“
	Brenner
	Gemischt epithelial
	Undifferenziert
Nicht klassifiziert	
Stromal	Granulosazellen
	Thekom, Fibrom
	Sertoli-, Leydig-Zelltumoren
	Gynandroblastom
	Lipoider Zelltumor
	Sarkom
Keimzellen	Dysgerminom
	Teratom
	Endodermaler Sinustumor
	Embryonales Karzinom
	Polyembryom
	Choriokarzinom
	Gemischte Keimzelltumoren
Gonadoblastom	

karzinom. Endokrinologische Faktoren sind ebenfalls wichtig. Frühe Menarche, späte Menopause und Nullipara sind alle mit einem erhöhten Risiko verbunden, dagegen Schwangerschaft, Laktation und orale Kontrazeptiva mit einer Verringerung des Risikos für ein Ovarialkarzinom. Die Verwendung von oralen Kontrazeptiva über 5 Jahre kann das Risiko um 50% senken. Somit erhöhen Faktoren, die die verlängerte oder persistierende Ovulation begünstigen, das Risiko für ein Ovarialkarzinom, während Faktoren, die die Ovulation supprimieren, das Risiko senken. Die postmenopausale Substitution von Östrogenen scheint das Risiko eines Ovarialkarzinoms nicht zu erhöhen.

**Biologie epithelialer Ovarialkarzinome.** Das ovariale Oberflächenepithel hat normalerweise eine sehr geringe Proliferationsrate mit einem sehr geringen Mitoseindex. Nach der Ovulation beginnen jedoch die oberflächlichen Epithelzellen zu proliferieren, um jene Defekte zu reparieren, die durch die Follikelruptur verursacht werden. Proliferation, die durch eine wiederholte Ovulation ausgelöst wird, kann zu einer Induktion oder Expression eines genetischen Schadens führen, die schließlich in einer malignen Transformation endet. Die Invagination von Oberflächenepithel kann zu Einschlusszysten führen, wobei die Proliferation der begrenzenden Epithelzellen dieser Zysten dysreguliert sein kann.

Auch beim epithelialen Ovarialkarzinom handelt es sich, wie bei vielen Neoplasmen, um einen klonalen Prozess, der von einer einzelnen Zelle ausgeht. 4 oder 5 Alterationen von Wachstumsfaktoren, Onkogenen oder Tumorsuppressoren können notwendig sein, um das Wachstum zu dysregulieren. Normale oberflächliche Epithelzellen der Ovarien exprimieren  $TGF\beta_1$  (*transforming growth factor  $\beta_1$* ), der regelhaft ihr Wachstum inhibiert. Ein Teil der ovariellen Tumorzellen scheint diesen autokrinen inhibitorischen Regulationskreis verloren zu haben. Dagegen exprimieren die meisten ovariellen Karzinome  $TGF\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) und EGF-R (*epidermal growth factor receptor*), die sich an die Zellen binden und somit eine autokrine Wachstumsstimulation erlauben.

Mit dem Ovarialkarzinom assoziierte Onkogene können ebenfalls für Wachstumsfaktoren oder ihre Rezeptoren kodieren. Das HER-2/*neu*(*c-erbB-2*)-Gen-Produkt, ein transmembranöser Tyrosinkinasewachstumsfaktorrezeptor, wird in 1/3 der Ovarialkarzinome überexprimiert. Sowohl normale als auch maligne Ovarialepithele sezernieren makrophagenkoloniestimulierenden Faktor 1 (CSF-1), jedoch nur maligne Zellen scheinen den Rezeptor

für diesen Wachstumsfaktor zu exprimieren, enkodiert durch das *fms*-Onkogen. CSF-1 ist auch ein starker Chemoattraktor für Makrophagen. Zytokine, die aus Makrophagen stammen, einschließlich TNF, IL-1 und IL-6, können das Wachstum von Ovarialkarzinomen stimulieren. Dementsprechend können tumorassoziierte Makrophagen eher eine parakrine Stimulation als eine Inhibition von Tumorwachstum bewirken.

Bisher wurden keine Abnormalitäten des Retinoplastoma- (Rb) oder des Wilms-Tumor-assoziierten Suppressorgens beobachtet, jedoch ungefähr die Hälfte der Ovarialkarzinome hat die normale Funktion von p53 verloren, bei dem es sich um ein DNA-bindendes Phosphoprotein handelt, das für die normale Wachstumsregulation notwendig ist. Weitere Suppressorloci innerhalb der Tumorzellen werden im Rahmen von Studien verloren gegangener Heterozygotie verschiedener Loci von Tumorzellen gesucht. Wie in vielen anderen Neoplasmen wird die genetische Instabilität durch aneuploide Karyotypen vieler fortgeschrittener Ovarialkarzinome reflektiert. Unter Verwendung von molekularen Techniken wurde eine Heterozygotie der Chromosomen 1, 3, 6, 11 und 17 beobachtet, wobei jedoch keine einzelne karyotypische Abnormalität als für das Ovarialkarzinom charakteristisch festgestellt wurde.

**Tumormarker.** In 80% der Fälle epithelialer Karzinome ist der Serummarker CA-125 erhöht. Wird er vor der Therapie bestimmt, korreliert seine Erhöhung in 90% der Fälle mit dem Krankheitsverlauf. Weiterhin geht die Erhöhung des Tumormarkers im Durchschnitt dem klinischen Auftreten von Rezidiven 3 Monate voraus, und kontinuierlich steigende Werte sind mit einer fortschreitenden Krankheit assoziiert. Ist die Halbwertszeit von CA-125 geringer als 20 Tage, ist die Prognose deutlich besser als bei einer Halbwertszeit >20 Tagen. Bei Keimzelltumoren sind  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP; endodermale Sinustumoren), humanes Choriongonadotropin (hCG; Choriokarzinome), beide Marker (embryonale Karzinome) oder keiner der Marker (Dysgerminome, unreife Teratome) erhöht. Trotz chirurgischer Maßnahmen und konventioneller Chemotherapie überleben langfristig selten mehr als 15–30% der Patientinnen.

**Genterapie.** Bisher wurde die Genterapie bei mindestens 38 Patientinnen im Rahmen von 14 Protokollen eingesetzt. Genehmigte Genterapieprotokolle umfassen unterschiedliche Strategien (als Übersicht Barnes et al. 1997): die molekulare

Chemotherapie mittels Suizidgenen, die Verstärkung der Immunantwort, die Resistenz gegen Chemotherapeutika und die Neutralisierung spezifischer tumoreigener Mutationen. Das Suizidgen HSV-*tk* wird entweder ex vivo in Ovarialkarzinomzelllinien retroviral transferiert, die dann intraperitoneal injiziert werden (Link et al. 1995, Freeman et al. 1992), oder mittels adenoviralem Gentransfer direkt appliziert. Bei der Applikation transduzierter Ovarialkarzinomzellen (PA1-STK) werden eine bessere Zellverteilung mit Migration in die Tumoreareale und damit ein besseres Erreichen der Tumorzellen erhofft. Die anschließende systemische Ganciclovirtherapie soll als Bystander-Effekt neben den transduzierten Zellen auch die Tumorzellen abtöten. Bisher wurden 16 Patientinnen mit bis zu  $10^{10}$  PA1-STK-Zellen behandelt. Innerhalb von 48 h wurden Fieber, Nausea und Adomenschmerzen beobachtet (Freeman nicht-publizierte Daten, zitiert in Sterman et al. 1998b).

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

Tait et al. (1997) führten in 12 Patientinnen mit rezidivierendem oder metastasierendem Ovarialkarzinom, das bisher nicht auf andere Therapien ansprach, eine Phase-I-Studie mit dem Mammakarzinomgen BRCA1 durch. Jede Patientin erhielt über einen Katheter an 4 hintereinander folgenden Tagen intraabdominale Infusionen eines BRCA1-retroviralen Vektors. Danach wurde die Behandlung für 1 Monat unterbrochen, und die Patientinnen wurden im Hinblick auf Tumorprogression nachuntersucht. Bei Tumorprogression wurden weitere Therapiezyklen in 4-wöchigen Abständen

und maximal 3fach durchgeführt. Hierbei wurden aufsteigende Dosen eingesetzt. Da in die Bauchhöhle große Flüssigkeitsmengen verabreicht werden können, konnte der BRCA1-retrovirale Vektor in Dosen zwischen  $10^8$  und  $10^{10}$  Virionen in bis zu 30 ml verabreicht werden, was in klinischen Studien eine ungewöhnliche Menge ist. Anschließend wurde mit mehr als 1 l Pufferlösung die Verteilung in der Bauchhöhle sichergestellt, um somit die Chance zu erhöhen, auch kleine Tumorfoci zu erreichen. Geringe Nebenwirkungen wurden beobachtet; 3 von 12 Frauen erlebten eine Immunreaktion mit erheblichen abdominalen Schmerzen, die innerhalb von 2 Tagen wieder verschwanden. Der Vektor wurde durch das Immunsystem des Körpers nicht sofort zerstört und eine therapeutische Antikörperproduktion war nur in der höchsten getesteten Dosis zu beobachten. Das BRCA1-Gen und seine Expression wurden in Karzinomzellen detektiert. In 3 von 12 Patientinnen konnte eine Tumorverkleinerung beobachtet werden.

Die Erkenntnis, dass die Transduktion verschiedener Zelllinien mit dem MDR-Gen zu einer Resistenz gegen die bei soliden Tumoren einschließlich Ovarialkarzinom häufig verwendeten myelodepressiven Chemotherapeutika Actinomycin-D, VP-16, Velban, Vincristin, Adriamycin und Taxol führt, legte einen Einsatz bei der Tumorbehandlung nahe. Somit wurden Protokolle zur retroviralen Modifikation von Knochenmarkzellen bei Patientinnen mit therapierefraktärem Ovarialkarzinom entwickelt (Deisseroth et al. 1994). Durch die verringerte Myelotoxizität kann die Dosierung von Chemotherapeutika gesteigert werden, sodass bessere therapeutische Chancen bestehen. In einer Phase-I-Studie wurde beim Mammakarzinom sowie fortgeschrittenen Ovarialkarzinom und Glioblastom der Einsatz des MDR-Gens in Knochenmarkstammzellen untersucht (Hesdorffer et al. 1994, Hesdorffer et al. 1998). Bei insgesamt 5 Patienten, bei denen eine autologe Knochenmarktransplantation durchgeführt wurde, wurden bis zu 1/3 der hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarkprogenitorzellen mit einem MDR-cDNA enthaltenden retroviralen Vektor ex vivo transduziert und anschließend zusammen mit den nichtmanipulierten Zellen nach der Chemotherapie reinfundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Reinfusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behandlung [s. auch Kapitel 10.4.2.2 „Glioblastom (malignes Astrozytom)“].

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

#### 10.4.2.9 Mammakarzinom

Entsprechend epidemiologischen Daten sind genetische und endokrine Faktoren sowie Umweltbedingungen für die Entstehung des Mammakarzinoms verantwortlich, in 70–80% der Fälle können jedoch keine Risikofaktoren identifiziert werden. In den Vereinigten Staaten beträgt das kumulative Risiko, im Lauf des Lebens ein Mammakarzinom zu entwickeln, 12% und das Risiko, daran zu versterben, 3,5%. Besonders hoch ist das Risiko nach dem 50. Lebensjahr, es erreicht seinen Gipfel nach dem 75. Lebensjahr (Tabelle 10.5).

**Genetische Faktoren.** Alle Verwandten von Mammakarzinompatienten haben ein erhöhtes Risiko, selbst ein Mammakarzinom zu bekommen, wobei das Risiko bei Verwandten 1. Grads 2- bis 3fach gegenüber der restlichen Bevölkerung erhöht ist. Bis zu 5% der Mammakarzinompatienten haben wahrscheinlich eine spezifische genetische Abnormalität geerbt, die zur Entwicklung des Mammakarzinoms beiträgt. Punktmutationen des p53-Suppressorgens im Chromosom 17 zeigen, welche Mitglieder in Li-Fraumeni-Familien 1 oder mehr von 6 verschiedenen Karzinomen, einschließlich Mammakarzinom, entwickeln werden. Weiterhin gibt es eine Assoziation zwischen Heterozygotie von Chromosom 17q und dem Mammaovarialkarzinomsyndrom. Dieses BRCA1-Gen ist zwar weniger gut charakterisiert, seine Penetranz beträgt jedoch bis zu 85%. Wahrscheinlich sind 1 von 200–400 Frauen der USA Träger dieses Gens. Zusammengekommen kommen diese 2 Genanomalien nur in sehr wenigen Mammakarzinomfällen vor, sodass ein routinemäßiges Screening in Frauen ohne deutliche familiäre Belastung in jungem Lebensalter nicht gerechtfertigt erscheint. Die erst vor kurzem gelungene Identifizierung dieser Gene gibt jedoch Hoffnung darauf, dass in den derzeit durchgeführten Untersuchungen andere Gene von höherer Prävalenz aufgefunden werden.

**Endokrine Faktoren.** Frühe Menarche, späte Menopause, Nullipara und spätes Alter bei der ersten Schwangerschaft sind unabhängig voneinander mit

**Tabelle 10.5.** Wahrscheinlichkeit einer weißen Frau, innerhalb bestimmter Zeiträume am Mammakarzinom zu erkranken oder zu versterben (1985), modifiziert nach Harrison (1994)

Zeitintervall [Jahre]	Risiko, am Mammakarzinom zu erkranken [%]	Risiko, am Mammakarzinom zu versterben [%]
Geburt bis 110	10,20	3,60
20–30	0,04	0,00
20–40	0,49	0,09
35–45	0,88	0,14
35–55	2,53	0,56
50–60	1,95	0,33
50–70	4,67	1,04
65–75	3,17	0,43
65–85	5,48	1,01

einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom assoziiert. Entsprechend neuerer Metaanalysen ist die Hormonsubstitution postmenopausal oder als Kontrazeptiva über 5–10 Jahre allenfalls mit einem minimal erhöhten Risiko verbunden. Wird die postmenopausale Substitution jedoch über viele Jahre fortgesetzt, ist das Risiko um den Faktor 1,3–2,2 erhöht, insbesondere wenn sie bereits prämenopausal begonnen wurde.

**Umweltfaktoren.** Das höchste Risiko besteht in dicht besiedelten und westlichen Ländern und ist bei Asiatinnen am geringsten. Sowohl Nahrungsfett als auch Alkohol wurden mit einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom in Verbindung gebracht. Weiterhin beeinflussen Nahrung und körperliche Betätigung den Zeitpunkt der Menarche und die Regelmäßigkeit der Menstruation.

**Histologische Subtypen.** Mehr als 80% des Mammakarzinoms sind vom invasiv-duktalem Typ, etwa 10% infiltrierend lobulär und etwa 5% medullär.

**Östrogenrezeptoren.** Tumoren mit Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (ER und PR) sprechen eher auf eine endokrine Therapie und haben bessere Überlebensraten.

**Neuere prognostische Faktoren.** Es konnte in einer Reihe von experimentellen Systemen gezeigt werden, dass sich der Anteil der mitotischen Zellen proportional zur Wachstumsfraktion und damit zur Wachstumsrate des Tumors verhält. Die Wachstumsfraktion kann durch Thymidinmarkierung und Autoradiographie (*thymidine labeling index*, TLI) oder durch die Durchflusszytometrie unter Bestimmung der Zellen in der S-Phase (SPF)

abgeschätzt werden. Klinische Korrelationen haben gezeigt, dass ein hoher TLI oder SPF mit Frührezidiven und frühem Tumortod assoziiert sind, auch nach Korrektur anderer prognostischer Faktoren, wie des Lymphknoten- und Östrogenrezeptorstatus. Im Allgemeinen haben Patientinnen mit aneuploiden Tumoren einen höheren DNA-Index als Patientinnen mit vorwiegend diploiden Tumoren, aber die Unterschiede zwischen Frührezidiven sind nicht groß, insbesondere nicht in den lymphknotennegativen Patientinnen.

Erhöhte Spiegel an Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren für Wachstumsfaktoren spiegeln ebenfalls eine erhöhte mitotische Aktivität wider, und bei einigen konnte auch ein prognostischer Wert gezeigt werden. Der EGF-R wurde extensiv untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass erhöhte Spiegel mit kürzeren Rezidivintervallen nach initialer Therapie und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit auf ein Ansprechen auf eine Hormontherapie verbunden sind, sogar in jenen Patienten, die für Östrogenrezeptoren positiv waren. IGF-R (*Insulin-like growth factor receptor*), SS-R (*somatotatin receptor*) und TGF $\alpha$  sind ebenfalls Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren von prognostischem Wert, wobei dieser im Vergleich zu anderen, besser untersuchten Faktoren noch nicht bekannt ist.

Cathepsin D, Urokinaseplasminogenaktivator, das Genprodukt von nm23 und Adhäsionsmoleküle werden alle mit der Tumorinvasion bzw. -metastasierung in Verbindung gebracht. Auch die Angiogenese ist für das weitere Tumorstadium und die Filialisierung entscheidend. Es gibt starke Hinweise dafür, dass vom Tumor sezernierte Angiogenesefaktoren, wie bFGF (*basic fibroblast factor*) für diesen Prozess wichtig sind. Die Expression all dieser Faktoren ist in den Tumoren erhöht, insbesondere in Patienten mit Frührezidiven oder mit anderen Befunden, die für eine schlechte Prognose sprechen. In manchen Zentren werden in neu diagnostizierten Mammakarzinomen routinemäßig Gefäße gezählt, die mit Faktor VII oder CD31 gefärbt wurden.

Im Mammakarzinom wurden multiple genetische Alterationen beschrieben, einschließlich Alleldeletionen auf Chromosom 11 oder 13 und Amplifikationen der *c-myc*- und *int-2*-Gene. In manchen Familien mit hohem Risiko für das Mammakarzinom ist das Tumorsuppressorgen *p53* mutiert, außerdem ist die Prognose von Mammakarzinomen schlechter, wenn *p53* überexprimiert ist. Am besten untersucht ist das HER-2/*neu*-Gen (oder C-*erbB-2*-Gen). Die Amplifikation und Überexpressi-

on dieses Gens auf Chromosom 17 ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dies ist insofern nicht überraschend, als der HER-2/*neu*-Ligand und -Rezeptor mit EGF und EGF-R eng verwandt sind. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die schlechte Prognose von Patientinnen mit einer Überexpression von HER-2/*neu* ist die Beobachtung, dass die Tumoren dieser Patienten gegenüber bestimmten Formen der Chemotherapie resistent sind. Interessanterweise können diese Tumoren oft besser auf andere Chemotherapieschemen ansprechen, insbesondere solche, die Doxorubicin beinhalten. Bei HER-2/*neu* handelte sich um den ersten Faktor, für den eine Assoziation mit einer Ansprechbarkeit für Chemotherapie gezeigt werden konnte. Bevor ein Marker in der klinischen Praxis routinemäßig verwendet werden kann, müssen die Nachweismethoden in mehr als einem Zentrum nach verschiedenen statistischen Kriterien validiert werden. Dies trifft allerdings auf keinen der neueren prognostischen Faktoren zu, sodass es derzeit noch nicht gerechtfertigt ist, therapeutische Entscheidungen von diesen abhängig zu machen.

**Tumormarker.** Tumormarker sind CEA und CA 15–3. Diese Marker können nach Beginn der endokrinen Therapie vorübergehend zunehmend erhöht sein.

**Gentherapie.** Bisher wurde die Gentherapie bei mindestens 58 Frauen mit Mammakarzinom im Rahmen von 12 Protokollen eingesetzt. Ähnlich wie für das Ovarialkarzinom werden auch hier Phase-I-Studien unter Verwendung des MDR-Gens durchgeführt, um die Sicherheit des Verfahrens und den potenziellen Transfer- und Expressionserfolg zu untersuchen. Indikation ist das metastasierende Mammakarzinom (O'Shaughnessy et al. 1994). In einer Phase-I-Studie, in die 5 Patienten mit Ovarialkarzinom, Mammakarzinom und Glioblastom eingeschlossen wurden, untersuchten Hedorffer et al. (1998) den Einsatz des MDR-Gens in Knochenmarkstammzellen. Es wurde eine autologe Knochenmarkstransplantation durchgeführt und bis zu 1/3 der hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmarkprogenitorzellen mit einem MDR-cDNA enthaltenden retroviralen Vektor ex vivo transduziert und anschließend zusammen mit den nichtmanipulierten Zellen nach der Chemotherapie reinfundiert. Eine hohe Rate an MDR-Transduktion wurde in verschiedenen Zelllinien kurz nach der Transduktion und Reinfusion gezeigt. Lediglich 2 dieser 5 Patienten hatten noch geringe MDR-Spiegel 10 bzw. 3 Wochen nach der Behand-



lung [s. auch Kapitel 10.4.2.2 „Glioblastom (malignes Astrozytom)“].

Weitere Target-Gene sind die Gene für Thymidinkinase, IL-2, CD80 und p53 (Wiley 1998). Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor.

#### 10.4.2.10 Hämatologische Tumoren: myeloische Leukämien und Lymphome

### Leukämien

**Definition.** Leukämien sind Neoplasmen, die von hämatopoetischen Zellen abstammen und zuerst im Knochenmark proliferieren, bevor sie in ins periphere Blut, die Milz, Lymphknoten und schließlich andere Gewebe disseminieren. Die Klassifikation der Leukämien erfolgt entsprechend der Zellen ihrer Abstammung (lymphatisch vs. myeloisch) und entsprechend der Geschwindigkeit des klinischen Verlaufs (akut vs. chronisch).

**Ätiologie.** Die Ursache für das Auftreten der Leukämie ist in den meisten Patienten nicht bekannt, genetische und Umweltfaktoren sind allerdings wichtig. Es gibt eine hohe Konkordanzrate zwischen identischen Zwillingen, wenn akute Leukämien im 1. Lebensjahr auftreten, weiterhin wurden Familien mit einer exzessiven Leukämieinzidenz identifiziert. Die akute Leukämie tritt in einer Reihe von kongenitalen Störungen mit einer erhöhten Frequenz auf, wie z. B. beim Down-, Bloom-, Klinefelter-, Fanconi- und Wiskott-Aldrich-Syndrom.

In experimentellen Tiermodellen konnte Leukämie mit Bestrahlung als auslösendem Umweltfaktor verursacht werden. Auch für Menschen konnte eine klare Beziehung zwischen einer entsprechenden Exposition und der Entwicklung einer Leukämie gezeigt werden. Personen mit berufsbedingter Bestrahlungsexposition, Patienten mit Bestrahlungstherapien und japanische Überlebende der Atombombenexplosionen haben eine vorhersagbare, dosisabhängig erhöhte Leukämieinzidenz. Die Bestrahlung erhöht das Risiko für eine chronische myeloische (CML), akute myeloische (AML) und wahrscheinlich auch akute lymphatische Leukämie (ALL), es gibt jedoch keine bekannte Beziehung zur chronisch lymphatischen (CLL) oder zur Haarzellleukämie. Die Exposition gegenüber Chemikalien wie Benzolen oder anderen aromatischen Hydrokohlenstoffen oder die Behandlung mit alkylierenden Agenzien oder anderen Chemotherapeutika führen ebenfalls zu einer erhöhten Inzidenz einer AML. Die Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie, wie sie bei Patienten mit Morbus

Hodgkin eingesetzt wird, ist mit einem additiven Leukämierisiko assoziiert.

Obwohl RNA-Retroviren eine Reihe von Leukämien in Tieren auslösen können, konnte eine virale Ursache für eine humane Leukämie nur für die adulte T-Zell-Leukämie (ATL) gesichert werden, die durch das humane T-Zell-Leukämie-Virus-Typ I (HTLV-I) verursacht wird. Das andere bekannte humane Leukämievirus, HTLV-II, konnte noch nicht mit einer spezifischen Leukämie in Verbindung gebracht werden. Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist mit einer Form der ALL (L3-Subtyp) sowie bestimmten aggressiven Lymphomen assoziiert.

**Genetische Alterationen.** Wie in anderen Tumoren gibt es auch bei den Leukämien eine Reihe von genetischen Alterationen, die in Tabelle 10.6 zusammengefasst sind. Weiterhin gibt es noch eine Reihe von Oberflächenantigenen, mit denen die verschiedenen Formen der Leukämie differenziert werden können (Tabelle 10.7).

### Maligne Lymphome

**Definition.** Im Gegensatz zu Leukämien sind maligne Lymphome neoplastische Transformationen von Zellen, die vorwiegend in Lymphgewebe residieren. Die 2 wichtigsten Varianten des malignen Lymphoms sind der Morbus Hodgkin und das Non-Hodgkin-Lymphom.

**Ätiologie.** In den USA werden jährlich etwa 7500 neue Fälle von Morbus Hodgkin entdeckt, wobei hier v. a. junge Patienten zwischen 15 und 35 Jahren und Patienten nach dem 50. Lebensjahr betroffen sind. Etwa 40000 neue Fälle von Non-Hodgkin-Lymphomen werden jedes Jahr allein in den USA diagnostiziert, wobei die Anzahl altersabhängig ist und zuletzt mit den steigenden Zahlen von Aids-Fällen stark zugenommen hat. Daneben gibt es noch eine Reihe anderer Krankheiten oder Expositionen, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von malignen Lymphomen assoziiert sind (Tabelle 10.8).

**Genetische Alterationen.** Abb. 10.12 beschreibt die Unterschiede der beiden Lymphomtypen bezüglich zellulärer Abstammung, Lokalisation, systemischer Symptome, chromosomaler Translokationen und Heilbarkeit. Da die genetischen Veränderungen beim Hodgkin-Lymphom erst noch beschrieben werden müssen, zeigt Abb. 10.13 nur die genetischen Alterationen verschiedener histologischer Subtypen des Non-Hodgkin-Lymphoms auf.

Tabelle 10.6. Leukämieassoziierte chromosomale Abnormalitäten, modifiziert nach Harrison (1994)

Abnormalität	Assoziierte Krankheit	Bemerkung
<b>Myelogene Leukämie</b>		
t(8;21)	AML-M2	bessere Prognose
t(15;17)	AML-M3	Rearrangierung des Retinolsäurerezeptorgens Bessere Prognose
inv (16); del (16q)	AML-M4 mit Eosinophilen	Bessere Prognose
+8	AML, alle Subtypen	Schlechte Prognose
+21	AML, M1, M7	
+13	AML, biphänotypisch	
5q-, -5, -7	AML, besonders sekundäre AML	Schlechte Prognose
t(9;11)	AML-M5A	Schlechte Prognose
t(9;22)	CML	Schlechte Prognose Bildung des Tyrosinkinase- <i>bcrabl</i> -Onkogenprodukts
t(4;11)	Biphänotypische Leukämie	Schlechte Prognose
<b>Akute lymphozytische Leukämie</b>		
t(4;11)	ALL-L2	Schlechte Prognose
t(1;19)	ALL-L1; mit clg-Expression	Bildung eines DNA-bindenden Fusionsproteins
t(8;14)	ALL-L3	Schlechte Prognose Hochregulation des <i>myc</i> -Onkogens
<b>Hyperdiploidie</b>		
t(9;22)	ALL	Bessere Prognose
t(10;14)	ALL-T-Zellen	Schlechtere Prognose
9p, 6q, oder 12p	ALL	Rearrangierung des T-Zell-Rezeptorgens Häufigste beobachtete Veränderungen Bis zu 10% in ALL
<b>Chronische lymphozytische Leukämie</b>		
+12	CLL	
14q+-Abnormalität	Alle B-Zell-Leukämien	

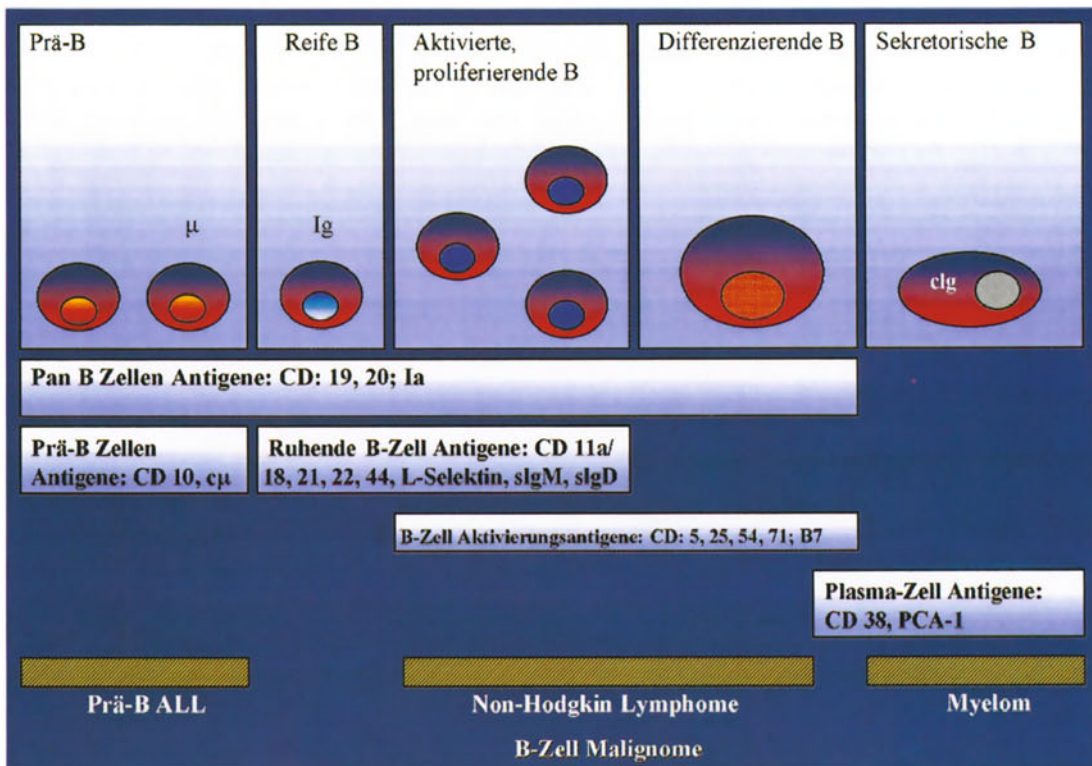


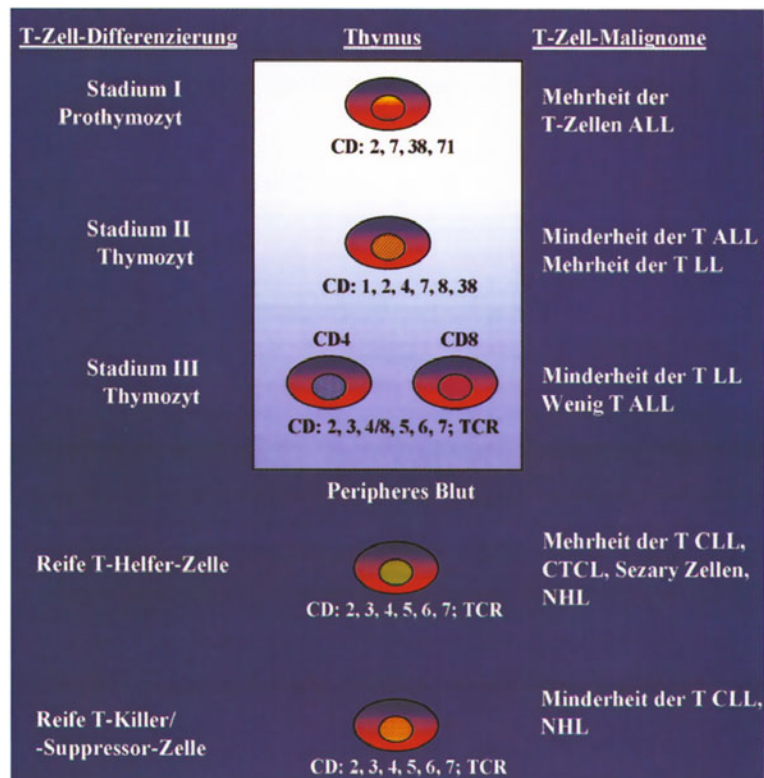
Abb. 10.12. Korrelation der B-Zell-Differenzierung und der B-Zell-Malignome, modifiziert nach Harrison (1994)

**Tabelle 10.7.** Zelloberflächenmarker für die Diagnose von Leukämie, modifiziert nach Harrison (1994)

Markername	Normalverteilung	Verteilung bei Leukämie
HLA-Dr	Früh myeloid, monozytoid B-Zell-Linie	ALL, AML, CLL, HCL, nicht APL
CD34	Stammzellen	ALL, AML (frühe Subtypen)
CD19	B-Zell-Linie	ALL (B-Linie), CLL, HCL
CD20	B-Zell-Linie	ALL (B-Linie), CLL, HCL
CD21	Intermediäre B-Zellen	CLL
Oberflächen-Ig	Intermediäre und reife B-Zellen	L3-ALL, CLL, HCL
CD13	Myeloid und monozytoid	AML (alle Subtypen)
CD14	Myeloid und monozytoid	AML (oft M4, M5)
CD15	Myeloid und monozytoid	AML (spätere Subtypen)
CD33	Frühmyeloid, monozytoid	AML (alle Subtypen)
CD1	Frühe (Thymus) T-Zellen	T-ALL
CD2	T-Zell-Linie	T-ALL
CD3	Reife T-Zellen	T-CLL, ATL
CD5	T-Zell-Linie	T-ALL, B-CLL
CD7	T-Zell-Linie	T-ALL, 20% AML
CD16	NK, Granulozyten	NK, Leukämie, T $\gamma$ -Leukämie
CD25	Aktivierte T- und B-Zellen	HCL, ATL

**Tabelle 10.8.** Erkrankungen oder Umstände, die mit einem erhöhtem Risiko der Neubildung eines Lymphoms verbunden sind, modifiziert nach Harrison (1994)

Erkrankungsgruppe	Erkrankung
Vererbte Immunschwächerkrankungen	Klinefelter-Syndrom
	Chediak-Higashi-Syndrom
	Ataxie-Telangiektasie-Syndrom
	Wiscott-Aldrich-Syndrom
Erworbene Immunschwächerkrankungen	Gewöhnliche veränderbare Immunschwächerkrankungen
	Ärztlich bedingte Immunsuppression
	HIV-1-Infektion
	Erworbene Hypogammaglobulinämie
Autoimmunerkrankungen	Sjögren-Syndrom
	Abdominale Sprue
	Rheumatische Arthritis und systemischer Lupus erythematoses
	Phenytoin
Gefährdung durch Chemikalien oder Medikamente	Strahlung
	Frühere Kombination von Chemotherapie und Bestrahlungstherapie
	Epstein-Barr-Virus
	Humanes T-Zell-Leukämievirus



**Abb. 10.13.** Korrelation der T-Zell-Differenzierung und der T-Zell-Malignome, modifiziert nach Harrison (1994)

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

Bisher wurden mindestens 28 Patienten im Rahmen von 12 Protokollen gentherapeutisch behandelt. In einer Phase-I-Studie zur Behandlung der AML konnte unter Verwendung von IL-2-transfizierten Fibroblasten und autologen Tumorzellen in 1 von 2 behandelten Patienten eine Remissionsdauer von 10 Monaten erreicht werden, wobei die erste Remission 14 Monate angehalten hatte (Veelken et al. 1997). Durch den Transfer von Oligonukleotiden gegen das Protoonkogen *c-myb* sollen CML-Zellen aus Knochenmarkproben eliminiert werden, die für die autologe Knochenmarktransplantation verwendet werden sollten (Hijiya et al. 1994). Weitere Target-Gene, die hier meist retroviral oder als nackte DNA verabreicht wurden, sind das MDR-Gen, CD154 und v. a. das Thymidin-kinasegen.

Die allogene Knochenmarktransplantation ist ein sehr brauchbares Verfahren generell bei der Immuntherapie von hämatologischen Malignomen und bei einigen nichtmalignen Bluterkrankungen. In den Fällen jedoch, in denen hohe T-Zell-Dosen appliziert werden müssen, kommt es in etwa der Hälfte der Patienten zu einem erheblichen Problem. Allogene Lymphozyten können eine *Graft-versus-host-disease* (GvHD) auslösen, also einen Angriff der Donorzellen auf Empfängergewebe mit lebensbedrohlichen Folgen. Um sich eine Option zur Eliminierung von Donorzellen zu schaffen, sollte es zu einem GvHD kommen, versuchten Bordignon et al. (1995a; 1997) fast alle Donorzellen (100%) vor der Transplantation mit einem Suizidgen (TK) zu transduzieren. Eine vom Zeitpunkt her gut gewählte Ganciclovirtherapie sollte dann die allogenen Zellen zerstören, um somit das Risiko für eine GvHD zu verringern, idealerweise sobald die Patienten von der initialen allogenen Antitumorantwort profitiert hätten. Weiterhin könnte TK, als Markergen verwendet, wichtige Fragen zum In-vivo-Schicksal von Donorzellen beantworten. Hierfür wurden Donorlymphozyten in vitro mit einem retroviralen Vektor mit 2 verschiedenen

Genen transduziert. In diesem Vektor kontrollieren die *Long terminal Repeats* (LTR) die Expression eines Oberflächenproteins, das normalerweise nicht in Blutzellen vorkommt. Es handelt sich hierbei um deltaNGFR, der eine rekombinante Version des *Low affinity nerve growth factor receptor* ist. Ein interner Herpes-simplex-Virus-TK-Pomotor kontrolliert die Expression des TK-NeoR-Fusionsproteins. Das deltaLNGFR-Gen erlaubt eine schnelle Zellsortierung und die Selektion transduzierter Zellen unter Verwendung von anti-LNGFR-magnetischen Immunkugeln. Durch diese Methode gelang es, eine Transduktionsrate von 95–99,6% innerhalb der ersten Selektionsrunde zu erreichen.

Über die Ergebnisse der ersten 8 von 12 Patienten wurde berichtet. Alle Patienten litten zuvor an Alloknochenmarktransplantationskomplikationen nach Immunmangelbehandlung oder Immuntherapie bei Leukämie. Transduzierte und selektionierte Donorlymphozyten wurden Empfängern in ansteigenden Dosen infundiert, bis zu  $4 \times 10^7$  Zellen/kg Körpergewicht. Weder Komplikationen noch Toxizität wurden im Zusammenhang mit dem Gentransfer beobachtet. In 1 Patienten wurde eine anti-TK-NeoR-Immunantwort beschrieben. Wiederholt wurden in den 12 Monaten nach der letzten Infusion transduzierte Zellen in Blut, Knochenmarkaspiraten und Biopsien von allen bis auf 1 Patienten beobachtet. 1 Patient mit EBV-induziertem Lymphom entwickelte erstmals nach der Behandlung eine Anti-EBV-Aktivität. Graft-versus-Leukämie-Antworten wurden in 5 Patienten detektiert. 2 Patienten hatten partielle Antworten und 3 erreichten eine komplette Remission, einschließlich 2 Patienten, die keinerlei Chemotherapie erhalten hatten. 1 der beiden partiell reagierenden Patienten blieb für 5 Jahre im chronischen Stadium der CML, wobei zu diesem Zeitpunkt keine transduzierten Zellen mehr nachweisbar waren. Dies traf zeitlich mit dem Übergang in einen Blastenschub zusammen. Der Patient wurde nochmals mit transduzierten allogenen Lymphozyten behandelt und ging wieder in das chronische Stadium über. GvHD wurde in den 3 verbliebenen auswertbaren Patienten beobachtet. Sie wurden mit Ganciclovirinjektionen behandelt. In 1 Patienten konnten trotz ausgedehnter Ganciclovirtherapie nie alle Donorzellen vollständig entfernt werden. Die GvHD wurde abgemildert, jedoch nicht beseitigt. In den anderen 2 Patienten zerstörten Ganciclovirverabreichungen sämtliche Donorzellen. Eine deutliche Verringerung der allogenen peripheren Blutlymphozyten von 13% auf PCR-nichtnachweisbare Spiegel wurde beobachtet, ohne jegliche im-

munsuppressive Therapie bzw. Toxizität. Hierdurch konnte die Immunreaktion komplett unterdrückt werden und alle klinischen und biologischen Zeichen eines GvHD verschwanden in beiden Fällen. Derartige Remissionen aus einem solchen Stadium von GvHD seien in einer internationalen Studie von klassischen Knochenmarktransplantationen mit 258 Patienten nie aufgetreten.

#### 10.4.2.11 *Multiples Myelom*

Das multiple Myelom stellt eine maligne Proliferation von Plasmazellen dar, die von einem einzigen Zellklon abstammen. Synonyme für das multiple Myelom sind Myelom oder Plasmazytom. Der Tumor, seine Produkte und die Immunantwort bewirken eine Reihe von Organdysfunktionen und Symptomen mit Knochenschmerzen oder Frakturen, Nierenversagen, Infektneigung, Anämie, Hyperkalzämie, gelegentliche Gerinnungsstörungen, neurologische Symptome und Hyperviskositätsyndrom.

Die Inzidenz des Myeloms steigt mit dem Alter, wobei das mittlere Alter bei der Diagnosestellung 68 Jahre beträgt und ein Vorkommen vor dem 40. Lebensjahr selten ist. Die jährliche Inzidenz beträgt 4:100 000 Einwohner, wobei diese Inzidenz in den verschiedensten Ländern der Erde sehr ähnlich ist. Über dem 25. Lebensjahr beträgt die Inzidenz 30:100 000 Einwohner.

Die Ursache für das Myelom konnte bisher nicht geklärt werden. Ein vermehrtes Auftreten war mit einer Latenz von 20 Jahren bei den Bestrahlungsoffern der Atombombenangriffe des 2. Weltkriegs beobachtet worden. Es gibt keinen direkten Hinweis dafür, dass Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu den meisten anderen B-Zell-Tumoren konnten in Patienten mit Myelomen keine regelmäßigen chromosomalen Alterationen entdeckt werden. Eine Überexpression der *myc*- oder *ras*-Gene wurde in einigen Fällen beobachtet. Murine Plasmazytommodelle lassen vermuten, dass zur Induktion des Plasmazytoms ein fremdes Antigen (z.B. Mineralöl) und ein zelluläres Ereignis erforderlich sind. Somit könnte die chronische Stimulation mit einem Antigen bei der Transformation von bestimmten B-Zell-Klonen eine Rolle spielen. Weiterhin gibt es Hinweise für eine genetische Prädispositionen für das Myelom des Menschen. In fast allen Fällen ist es schwierig, maligne von benignen Plasmazellen aufgrund von morphologischen Kriterien zu unterscheiden.

**Genterapie.** In einer Phase-I-Studie konnte unter Verwendung von IL-2-transfizierten Fibroblasten

und autologen Tumorzellen bei 1 behandelten Patienten keine Veränderung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden (Veelken et al. 1997).

#### 10.4.2.12 *Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals*

**Epidemiologie.** Eine der wichtigsten bekannten Konsequenzen chronischer Sonnenexposition sind Melanome und Nichtmelanomhautkarzinome. Ein Zusammenhang mit den Nichtmelanomhautkarzinomen ist allerdings wesentlich wahrscheinlicher, da sich etwa 80% aller Nichtmelanomhautkarzinome in exponierten Hautarealen, wie Gesicht, Hals und Händen, entwickeln. Hellhäutige Männer, die im Freien arbeiten, haben ein doppelt so hohes Risiko als Frauen, einen solchen Tumor zu entwickeln. Weiße mit dunklerer Haut haben nur 1/10 des Risikos verglichen mit hellhäutigen Individuen. Jährlich entwickeln etwa 400 000–500 000 Personen allein in den USA Nichtmelanomhautkarzinome, und das Risiko eines Weißen, im Leben an einem solchen Karzinom zu erkranken, beträgt mit ansteigender Tendenz derzeit geschätzt etwa 15%. Das Plattenepithelkarzinom ist eine der beiden Formen des Nichtmelanomhautkarzinoms und tritt deshalb besonders häufig im Gesicht und dort wiederum im Bereich von Unterlippe und Ohren auf. Es stellt sich meist als verhärtete und potenziell hyperkeratotische Läsionen dar, die oft mit Ulzerationen und/oder Verkrustungen verbunden sind.

**Ätiologie.** Die 3 wichtigsten Schritte der Tumorentstehung sind die Initiation, Promotion und Progression.

**Initiation.** Die chronische Exposition von Tierhaut gegenüber Lichtquellen, die Sonnen-UV-Lichtstrahlen imitieren, endet in der Initiation, einem Schritt, bei dem strukturelle Änderungen der DNA durch Mutation zu irreversiblen Veränderungen von Keratinozyten führen, wodurch die Tumorentstehung in Gang gesetzt wird. Es wird angenommen, dass die Exposition gegenüber einem Tumoriator notwendig, aber für einen malignen Prozess nicht ausreichend ist, da initiierte Hautzellen ohne Exposition gegenüber Tumorpromotoren in der Regel keinen Tumor entwickeln.

**Promotion.** Der 2. Schritt in der Tumorentwicklung ist die Promotion, ein Prozess aus vielen Schritten, bei dem initiierte Zellen chemischen und physikalischen Agenzien ausgesetzt werden. Hierdurch kommt es zu epigenetischen Veränderungen, die

zur klonalen Ausbreitung initiiertes Zellen führen. Im Verlauf von Wochen und Monaten folgt ein gutartiges Wachstum von Papillomen. UV-B-Licht ist ein komplettes Karzinogen, was bedeutet, dass es als Initiator und als Promotor funktionieren und so Tumoren induzieren kann. Inkomplette Karzinogene können die Tumorentstehung initiieren, benötigen jedoch eine zusätzliche Hautexposition gegenüber Tumorpromotoren, um einen Tumor zu verursachen. Der Prototyp eines Tumorpromotors ist der Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat (TPA). Bei der Tumorpromotion sind in der Regel multiple Expositionen über die Zeit notwendig, um einen Tumor zu verursachen.

**Progression.** Der letzte Schritt ist die Konversion des benignen Vorläufers in eine maligne Läsion, ein Prozess, von dem angenommen wird, dass zusätzliche genetische Alterationen in den bereits transformierten Zellen notwendig sind.

**Gentherapie.** Bisher wurden 55 Patienten im Rahmen von 7 klinischen Protokollen eingeschlossen. Target-Gene umfassen v. a. die Gene für p53, HLA-B7/b2m, IL-2 und Thymidinkinase. Als Vektoren wurden Adenoviren und Liposomen eingesetzt.

Burt et al. (1997) injizierten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals, bei denen andere Therapien versagt hatten, intratumoral einen adenoviralen Vektor vom Serotyp 5, der für das Tumorsuppressorgen p53 (Ad5p53) kodiert. Das Schicksal des Vektors wurde durch die Untersuchung von Plasma- und Urinproben analysiert, wobei mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Primern Vektor-DNA in den Plasma- und Urinproben von 3 Patienten nachgewiesen werden konnte. Weiterhin fand sich in diesen Proben nichtreplizierender Ad5p53-Vektor, wie ein Bioassay zeigte, bei dem Patientenflüssigkeiten *in vitro* einen zytopathischen Effekt auf Empfängerzellen hatten. In den positiven Bioassays fand sich auch Adenoviruskapsid, wie sich in einem Immunoassay zeigte, bei dem das Adenoviruskapsid durch spezifische Antihexonantikörper erkannt wird.

Roth (1997) und Roth und Cristiano (1997) führten eine ähnliche Phase-I-Studie durch, in die 30 Patienten eingeschlossen wurden, bei denen ebenfalls konventionelle Therapien versagt hatten. Es handelte sich um eine Studie mit ansteigenden Dosen, bei der jedem der Patienten der Adp53-Vektor injiziert wurde. 17 Patienten mit nichtresezierbaren Tumoren wurde jeden 2. Tag intratumoral Adp53 injiziert, anschließend wurden sie 2 Wo-

chen nachbeobachtet und dann einem erneuten Therapiezyklus unterworfen. Die übrigen 13 Patienten mit resezierbaren Tumoren erhielten Adp53 jeden 2. Tag für 2 Wochen, 3 Tage später eine intraoperative Injektion während der Resektion und eine letzte Injektion 3 Tage nach der Resektion. In keinem der 30 Patienten wurden unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet. Die 17 nichtresezierbaren Patienten erhielten weitere Therapiezyklen bis zur Besserung. 5 dieser 17 Patienten hatten einen stabilen Verlauf, und bei 2 Patienten kam es zu einer partiellen Regression mit einer über 50%igen Reduktion des Tumolvolumens. Zum Zeitpunkt des Berichts waren 3 der 13 resezierbaren Patienten am Karzinom verstorben, 5 Patienten zeigten ein vollkommenes Verschwinden aller messbaren Zeichen des Tumors über mehr als 6 Monate nach der Therapie. 1 Patient hatte bereits zum Zeitpunkt der Chirurgie eine komplette Antwort auf Adp53 gezeigt.

#### 10.4.2.13 Knochentumoren

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

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

#### 10.4.2.14 Fortgeschrittene komplexe Tumoren

Unter diesem Begriff werden verschiedene, weit fortgeschrittene Karzinome zusammengefasst, die sich in einem zunehmend metastasierten und entdifferenzierten Stadium befinden, und nicht mehr reseziert werden können. Es handelt sich v. a. um Mammaadenokarzinome, Ovarialkarzinome, Prostatakarzinome, Hirntumoren, Nierenzellkarzinome, Melanome, kolorektale Adenokarzinome, Lymphome, Lungentumoren, Sarkome und Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals (Wiley 1998).

**Gentherapie.** Insgesamt handelt es sich hier um 43 Protokolle, in die bisher 574 Patienten eingeschlossen wurden. Eine Vielzahl von Target-Genen wurde getestet, darunter HLA-B7/b2m, CEA, IL-2, MDR-1, BRCA-1, GM-CSF, IL-12, TNF, IL-7, TK, HLA-A2, HLA-B13, H-2K(k) und CD80. Fast alle bisher in Patienten eingesetzten Transfer-Systeme wurden verwendet.

Hui et al. (1997) berichteten über die Ergebnisse der ersten 2 Gentherapiestudien Singapurs. In eine initiale Phase-I-Studie wurden 9 Patienten eingeschlossen, gefolgt von einer Phase-I/II-Studie mit 10 Patienten. Alle 19 Patienten hatten rezidivierende Karzinome in einem späten Stadium mit kutanen Metastasen. Sie erhielten 4-wöchentlich intranodale Injektionen von DNA-DC-Chol/DOPE-kationischen Liposomen zum Transfer der Gene für HLA-A2, HLA-B13 bzw. des xenogenen (muri- nen) H-2K(k). Die Expression des Transgens wur-

de in den ersten 3 Patienten mittels RT-PCR von Nadelbiopsien jeweils 1 Woche nach der Transduktion verfolgt. Es fanden sich Transkripte für HLA-A2 und HLA-B13 während der gesamten Behandlung, jedoch nicht von H-2K(k). Unter Verwendung von mRNA des *Human growth hormone* (hGH) als interner Standard wurde eine quantitative PCR durchgeführt, wobei sich nach der 1. und 2. Injektion für HLA-A2-mRNA mindestens 3fache Mengen verglichen mit HLA-B13 fanden. In den 9 Patienten der initialen Toxizitätsstudie fanden sich keine unerwünschten Nebenwirkungen. In 1 Patienten, der mit HLA-A2 behandelt worden war, bildete sich der injizierte Knoten komplett zurück, in 1 weiteren Patienten, ebenfalls mit HLA-A2 therapiert, fand sich eine teilweise Regression. In den anderen Patienten, die mit HLA-A2, HLA-B13 oder H-2K(k) behandelt worden waren, fand sich keine Therapieantwort.

In der nachfolgenden Phase-I/II-Studie wurden Frauen mit terminalen Ovarial- oder Zervixkarzinomen eingeschlossen, bei denen alle klassischen Therapieformen versagt hatten. Die Gentherapie wurde wie in der initialen Phase-I-Studie durchgeführt. Es wurden keine kompletten Regressionen beobachtet, die Hälfte der Patienten jedoch zeigten eine partielle lokale Antwort mit einer Schrumpfung auf mindestens die Hälfte der Größe. Eine partielle Antwort wurde meist nach allogener HLA-A2-Transduktion beobachtet, aber auch nach allogener HLA-B13- und xenogener H-2K(k)-Transduktion. Entfernt gelegene unbehandelte Knoten bildeten sich in keinem der Patienten zurück und alle 19 Patienten erlebten eine weitere systemische Progression. Kontrollinjektionen mit DNA-freien Liposomen in Knoten zeigten keine lokale Antwort.

Offensichtlich war auch hier die Therapie mit HLA-A2 den anderen Therapien überlegen. In beide Studien zusammengenommen zeigten sich unter HLA-A2-Therapie 2 komplette Remissionen von behandelten Knoten sowie in 5 von 6 Ovarial- und Zervixkarzinompatientinnen eine lokal begrenzte, jedoch signifikante Tumorgößenreduktion. Bei dem größten der behandelten Tumoren fand sich keine therapeutische Antwort, möglicherweise als Hinweis dafür, dass die Tumorgöße für die Kurabilität ein wichtiger Parameter für dieses Protokoll ist. Möglicherweise war die bessere Transkriptionseffizienz in situ ausschlaggebend, da die initial nachgewiesenen HLA-A2-mRNA-Mengen die höchsten waren. Eine andere, nicht alleine entscheidende Möglichkeit war, dass HLA-Gene des A-Locus immunogener sind als die des B-Locus.

cus. Zytotoxische T-Lymphozyten der Patientin mit Cervixkarzinom, bei der eine komplette Regression ihres HLA-A2-behandelten Knotens erreicht worden war, wurden *in vitro* untersucht. Sie wurden entweder mit nichtmodifizierten oder mit HLA-A2-exprimierenden autologen Tumorzellen stimuliert und dann im Hinblick auf die Zerstörung von autologen Tumorzellen beobachtet. Nach Stimulation mit HLA-A2-modifizierten Zellen bewirkten sie eine 3- bis 4fach höhere Zerstörung als nach Stimulation mit nichtmodifizierten Zellen.

Jantschkeff et al. (1997) schlossen in eine französisch-schweizerische Phase-I-Studie 9 Patienten ein, die metastasierende solide Tumoren aufwiesen. Verozellen wurden *in vitro* mit einem humanen IL-2-exprimierenden Plasmid transfiziert. Diese transduzierten xenogenen Zellen wurden den Patienten mittels ultraschall- bzw. computertomographiegesteuerter Injektion verabreicht. In 3 verschiedenen Kohorten wurden steigende Dosen von  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  Zellen verwendet. Die Injektionen wurden an den Tagen 1, 3 und 5 der Behandlung verabreicht, und eine Reihe von Faktoren wurden vor, während und nach der Behandlung bestimmt. Dazu gehörten die T-Zell-Zusammensetzung in Tumorbiopsien und Blutproben der Tage 1, 5 und 15 der Behandlung, CTL-Aktivität, Zytokinexpression, Antiviroantikörper und IL-2-Expression. Die Behandlung wurde gut vertragen. Eine transiente Toxizität in Form von Fieber wurde in 1 Patienten und in Form von Juckreiz und Erythem in 2 weiteren Patienten beobachtet. Bis auf Antiviroantikörper in 2 Patienten wurden keine hämatologischen Veränderungen beobachtet. Zusammenfassend, konnten  $5 \times 10^5$  Vero-IL-2-Zellen sicher verabreicht werden, wobei sich nachweisbar biologische und klinische Veränderungen fanden. In den Tumorbiopsien wurden eine verstärkte Zytokinexpression und/oder Infiltration der Tumoren mit Lymphozytensubpopulationen in 6 von 9 Patienten und eine Abnahme dieser Parameter in 3 von 9 Patienten ohne klares zuordenbares Verteilungsmuster beobachtet. In 1 Patienten mit Weichteilgewebesarkom verkleinerte sich eine entfernt gelegene nichtinjizierte Metastase um 90% innerhalb von mehr als 12 Monaten. In 4 Patienten konnte die Erkrankung für 3, 7, mehr als 7 und 9 Monate zum Zeitpunkt des Berichts stabilisiert werden.

Mackensen et al. (1997) berichteten über eine Phase-I-Immunistudie, im Rahmen derer 2 Melanompatienten letal bestrahlte autologe Tumorzellen gemischt mit IL-2-sezernierenden allo-genen Fibroblasten injiziert wurden. Die Fibrobla-

sten waren zuvor *in vitro* mit dem IL-2-Gen transfiziert worden. Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) und Lymphozyten, die die Injektionsstelle infiltrierten, wurden analysiert. In beiden Patienten waren in einem Funktionstest die Zahlen auf MHC-I-beschränkte CTL an der Injektionsstelle erhöht. Sequenzierungsstudien zeigten, dass die gleiche Art von CTL sowohl im Tumor als auch an der Injektionsstelle erhöht waren. Insbesondere TCRBV21S3<sup>+</sup>-Zellen spielten bei der zytotoxischen Aktivität gegen autologe Tumorzellen eine Rolle. Es wird vermutet, dass die CTL aus dem Tumor an die Injektionsstelle zirkulieren, wo sie weiter vermehrt werden. Eine Amplifikation wurde vermutet, da TCRBV21S3<sup>+</sup>-Zellen an der Injektionsstelle nachweisbar waren, und eine Hypersensitivität vom verzögerten Typ vorhanden war. Beide waren vor der Behandlung nicht nachweisbar gewesen.

### 10.4.3 Infektionskrankheiten

Bisher wurden insgesamt mindestens 405 Aids-Patienten im Rahmen von 29 Protokollen gentherapeutisch behandelt (Wiley 1998). In einem weiteren Protokoll zur Behandlung von Influenza wurden bisher keine Patienten eingeschlossen.

#### 10.4.3.1 Human immunodeficiency virus(HIV)-Infektion/ Acquired immunodeficiency syndrome (Aids)

Die 90er Jahre stellen bereits die 2. Dekade der HIV/Aids-Pandemie dar. Die Krankheit wurde zum 1. Mal 1981 in den USA erkannt, als das unerklärliche Auftreten von 5 Fällen von *Pneumocystis-carinii*-Pneumonien und 26 Fälle von Kaposi-Sarkom in vorher gesunden homosexuellen Männern beobachtet wurden. Innerhalb von wenigen Monaten wurde die Krankheit auch in Drogenabhängigen, Bluttransfusionsempfängern und Hämophiliepatienten, die Gerinnungsfaktoren erhielten, beschrieben.

**Pathogenese.** 1983 wurde das HIV aus einem Patienten mit einer Lymphadenopathie isoliert und 1984 konnte klar der ursächliche Zusammenhang zwischen Aids und HIV gezeigt werden. Dieses Retrovirus der Lentivirusfamilie wurde früher als „*lymphadenopathy associated virus*“ (LAV), „*human T lymphotropic virus III*“ (HTLV-III) oder „*AIDS-associated retrovirus*“ (ARV) bezeichnet. 1985 wurde ein empfindlicher ELISA-Test entwickelt, der ein Screening von Risikogruppen erlaubte. Beobachtungsstu-



Tabelle 10.9. CDC-Fallüberwachung für Aids (1993), modifiziert nach Harrison (1994)

Nr.	Erkrankung
A Indikatorerkrankungen, die in Abwesenheit von anderen Gründen für eine Immunschwäche und ohne Laborbeweis für eine Aids-Infektion klar diagnostiziert wurden	
1	Kandidiasis der Speiseröhre, Luftröhre, Bronchien oder der Lunge
2	<i>Cryptococcus neoformans</i> , extrapulmonal
3	Kryptosporidien mit Durchfall (Dauer >1 Monat)
4	Generalisierte Organerkrankungen (Patientenalter >1 Monat) mit Ausnahme der Leber, der Bauchspeicheldrüse und der Lymphknoten durch Zytomegalievirus
5	Infektion durch das Herpes-simplex-Virus, das ein Schleimhautgeschwür verursacht, das länger als 1 Monat andauert; oder Bronchitis, Pneumonie, Ösophagitis (Patientenalter >1 Monat)
6	Kaposi-Sarkom (Patientenalter <60 Jahre)
7	Gehirnlymphom (primär) (Patientenalter <60 Jahre)
8	Interstitielle, lymphoide Pneumonie und/oder
9	Pulmonale, lymphoide Hyperplasie (Patientenalter <13 Jahre)
10	Komplex- oder Morbus-kansasii-Erkrankung (ausgesät)
11	<i>Pneumocystis-carinii</i> -Pneumonie
12	Toxoplasmose des Gehirns (Patientenalter >1 Monat)
B Indikatorerkrankungen, die ohne Rücksicht auf andere Gründe für eine Immunschwäche und mit Laborbeweis für eine Aids-Infektion klar diagnostiziert wurden	
1	Jede Erkrankung der Liste in Abschnitt A
2	Bakterielle Infektionen (multipel oder wieder auftretend) bei Kindern (<13 Jahren), die von <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> , oder durch andere pyogenische Bakterien verursacht werden
3	Kokzidioidmyosis, disseminiert
4	HIV-Enzephalopathie
5	Histoplasmose, disseminiert
6	Isosporiasis mit persistierender Diarrhö (Dauer >1 Monat)
7	Kaposi-Sarkom (bei jedem Lebensalter)
8	Non-Hodkin-Lymphom der B-Zellen oder unbekannter Phänotyp und Vorhandensein der histologischen Typen von kleinen, nichtgespaltenen Lymphomen oder immunoplastischen Sarkomen
9	Jede mikrobakterielle Erkrankung, disseminiert, außer <i>M. tuberculosis</i>
10	<i>M. tuberculosis</i> , extrapulmonar
11	Nichttyphoide, septische, rezidivierende Salmonellose
12	HIV-Kachexie
C Indikatorerkrankungen, die mutmaßlich im Vorhandensein eines Laborbeweises für eine HIV-Infektion diagnostiziert wurden	
1	Kandidose des Ösophagus
2	Bindehautentzündung mit Blindheit durch Zytomegalievirus
3	Kaposi-Sarkom
4	Interstitielle, lymphoide Pneumonie und/oder pulmonale, lymphoide Hyperplasie bei einem Kind (<13 Jahre)
5	Mikrobakterielle Erkrankung, disseminiert
6	<i>Pneumocystis-carinii</i> -Pneumonie
7	Toxoplasmose des Gehirns (Patientenalter >1 Monat)
D Indikatorerkrankungen, die beim Fehlen von anderen Gründen für eine Immunschwäche und im Vorhandensein von negativen Ergebnissen für eine HIV-Erkrankung klar diagnostiziert wurden	
1	<i>Pneumocystis-carinii</i> -Pneumonie
2	Andere Indikatorerkrankungen, die in Abschnitt A aufgelistet sind und CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten-Zählung <400/μl
E Die 1993 erweiterte Definition beinhaltet:	
1	Alle HIV-infizierten Personen mit <200 CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten/μl oder einen CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten-Prozentanteil von allen Lymphozyten <14
2	Lungentuberkulose
3	Rezidivierende Pneumonie
4	Aggressives Zervixkarzinom

dien unter Verwendung dieses Tests und das Monitoring der Anzahl von CD4<sup>+</sup>-Zellen als Parameter für die Immunsuppression führten zur Entdeckung eines breiten Spektrums von HIV-Erkrankungen, von asymptomatischen Gruppen bis hin zur fortge-

schrittenen Erkrankung, die als Aids bezeichnet werden. Während die Krankheit noch zu Beginn der 80er Jahre auf Risikogruppen beschränkt war, finden sich in den 90er Jahren bereits Fälle in allen Bevölkerungsgruppen.

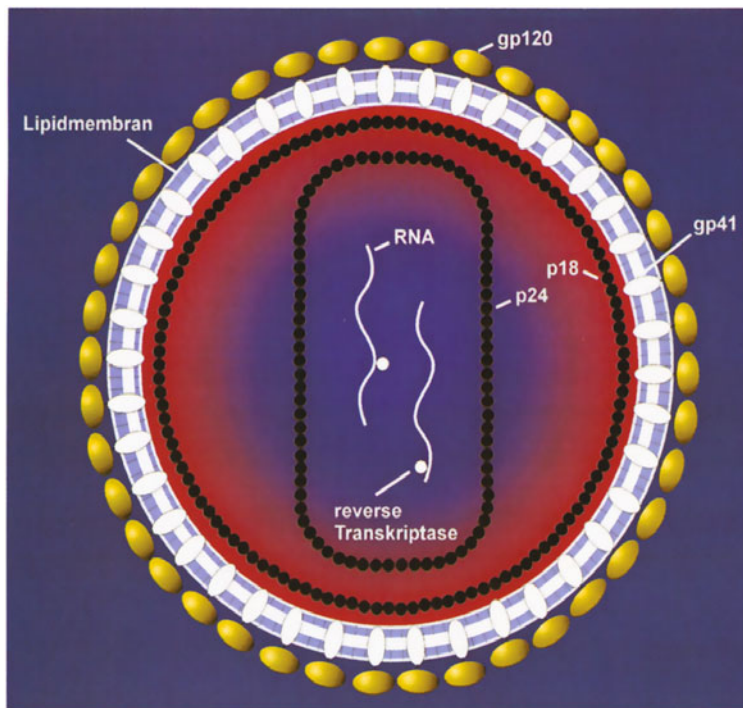


Abb. 10.14. Aufbau des HIV als Beispiel für ein Retrovirus

Die 4 anerkannten humanen Retroviren gehören zu 2 verschiedenen Gruppen: den humanen T-lymphotropen Viren HTLV-I und -II und den humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 (Tabelle 10.9). Die am weitesten verbreitete Ursache für die HIV-Infektion ist das HIV-1. HIV-2 wurde erstmals 1986 in westafrikanischen Patienten identifiziert, inzwischen aber auch in Europa, Südamerika, Kanada und den USA beobachtet. Trotz einer Nukleotidsequenzhomologie von 40% gegenüber HIV-1 ist es phylogenetisch sehr viel mehr mit dem SIV (*simian immunodeficiency virus*) verwandt.

**Virusmorphologie.** Elektronenmikroskopisch zeigte sich, dass das HIV-1-Virion eine ikosaedrale Struktur mit zahlreichen externen Spikes hat, die aus den 2 wichtigsten Hüllproteinen des Virus (dem äußerlichen gp120 und dem transmembranösen gp41) gebildet werden. Das Virion stülpt sich aus der Oberfläche infizierter Zellen und inkorporiert eine Reihe von Proteinen der Gastzelle in seine äußere Lipiddoppelschicht, einschließlich der MHC-Klasse-I- und -II-Antigene. Abb. 10.14 zeigt die schematische Struktur des HIV-1.

**Lebenszyklus des Virus.** Ein Kernpunkt des Lebenszyklus im Rahmen einer HIV-Infektion ist die reverse Transkription genomischer RNA in DNA mit Hilfe eines Enzyms, genannt Reverse Transkrip-

tase. Der HIV-Lebenszyklus beginnt mit der Bindung des gp120-Proteins via eines Anteils seiner VI Region nahe des N-Terminus mit hoher Affinität an den Rezeptor auf der Oberfläche der Gastzelle, das CD4-Molekül (Abb. 10.15). Das CD4-Molekül ist ein Protein, das sich vorwiegend auf einem bestimmten Subtyp von Lymphozyten findet, die für die Helfer- oder Induktionsfunktion bei der Immunantwort verantwortlich sind. Weiterhin wird es auf der Oberfläche von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie exprimiert. Nach der Bindung erfolgt via gp41-Molekül die Fusion mit der Membran der Gastzelle, die genomische HIV-RNA wird von der Hülle befreit und internalisiert. Die Reverse Transkriptase, die sich bereits im Virion befand, katalysiert die reverse Transkription der genomischen RNA in doppelsträngige DNA. Die DNA migriert zum Zellkern, wird dort in die Chromosomen der Gastzelle integriert, und zwar mit Hilfe eines anderen viralen Enzyms, der Integrase. Die Inkorporation dieses so genannten Provirus in das Zellgenom ist permanent. Dieses Provirus kann inaktiv (latent) bleiben oder eine umfangreiche Genexpression mit aktiver Virusproduktion auslösen.

Die zelluläre Aktivierung spielt im Lebenszyklus des HIV-Virus eine erhebliche Rolle. Die Aktivierung der HIV-Expression mit einem Übergang aus dem latenten in das aktive Stadium hängt von der Interaktion einer Reihe von zellulären und viralen

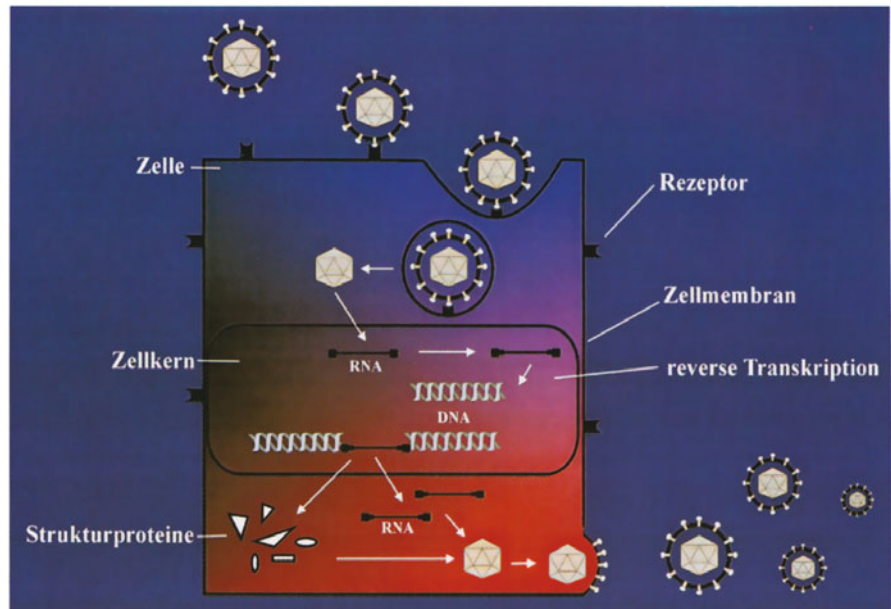


Abb. 10.15. Lebenszyklus eines Retrovirus (Beschreibung s. Text)

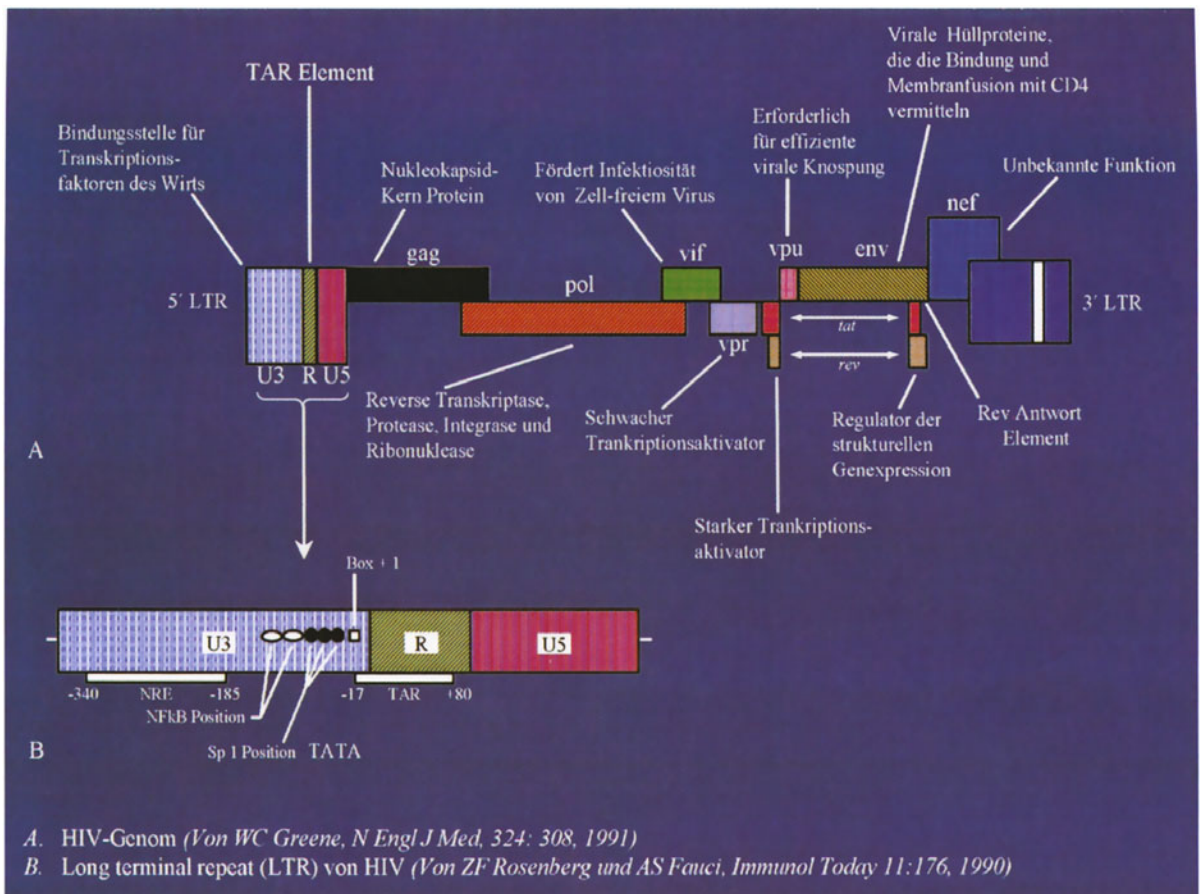
Faktoren ab. Inkomplett revers transkribierte DNA-Intermediate sind in nichtproliferierenden Zellen labil und werden nicht ausreichend in das Genom der Gastzellen integriert, es sei denn, dass es kurze Zeit nach der Infektion zu einer zellulären Aktivierung kommt. Weiterhin wird die Aktivierung der Gastzelle benötigt, um die Transkription der integrierten proviralen DNA in entweder genomische RNA oder mRNA auszulösen. Nach der Transkription wird die HIV-mRNA in Proteine translatiert, die durch Zerschneidung, Glykosylierung, Myristilierung oder Phosphorylierung modifiziert werden. Der Viruskern wird im Bereich der Plasmamembran der Zellen aus einer Ansammlung von HIV-Proteinen, -Enzymen und genomischer RNA gebildet. Das Ausstülpfen der Virionvorstufe geschieht durch die Zellmembran der Gastzelle, wo der Viruskern seine externe Hülle erhält.

**HIV-Genom.** Das Virusgenom ist schematisch in Abb. 10.16 gezeigt. Ähnlich wie andere Retroviren besteht auch HIV-1 aus Genen, die die viralen Strukturproteine enkodieren: *gag* enkodiert die Proteine, die den Viruskern formieren (einschließlich p24-Antigen); *pol* enkodiert die Enzyme, die für die reverse Transkription und die Integration verantwortlich sind; *env* enkodiert die Glykoproteine der Virushülle. HIV-1 ist jedoch komplexer als andere Retroviren insofern, dass es noch mindestens 6 andere Gene enthält (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*), die die Proteine enkodieren, die für die Regulation der HIV-Expression verantwortlich sind. Diese Gene werden von LTR flankiert,

die die regulatorischen Elemente für die Genexpression enthalten, wie der Polyadenylierungssignalsequenz, der TATA-Promotor-Sequenz, dem NF- $\kappa$ B und SP1-*enhancer-binding-sites*, den TAR-Sequenzen (*transactivating response sequences*), wo das *tat*-Protein bindet, und dem NRE (*negative regulatory element*), mit deren Deletionen die Stärke der Genexpression verstärkt wird (Abb. 10.16). Der Hauptunterschied der Genome von HIV-1 und HIV-2 ist, dass HIV-2 das *vpu*-Gen nicht besitzt, dafür jedoch ein *vpx*-Gen, das in HIV-1 nicht vorkommt.

**Gentherapie.** Häufig werden Gentherapiestudien für die Behandlung von Aids durch US-amerikanische Pharmafirmen durchgeführt, deren unabhängige Studien nicht notwendigerweise durch das *Recombinant DNA Advisory Committee* registriert werden. Bisher wurden im Rahmen von 29 Protokollen 405 Aids-Patienten gentherapeutisch behandelt. Interessant ist dabei, dass Gentherapiestudien für Aids grundsätzlich mehr als doppelt so viele Patienten einschließen konnten, als Nicht-Aids-Studien. Sie sind auch die einzigen Gentherapiestudien, in denen mehr als 100, teilweise sogar mehr als 200 Patienten rekrutiert werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte, mit Markergenen gekennzeichnete CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Reinfusion bis zu 10 Monate überlebten (Walker et al. 1995). Sie könnten somit die Ausgangsbasis für genetisch modifizierte T-Zellen zur Therapie oder Prävention von HIV-Infektionen sein. Während bereits zahlreiche potenziell thera-



**Abb. 10.16a,b.** Stadien der HIV-Replikation mit potenziellen Angriffspunkten für eine Genterapie, modifiziert nach Essex et al. (1995), a HIV-Genom, aus Greene (1991), b Long

terminal Repeat (LTR) von HIV, aus Rosenberg und Fauci (1990)

peutisch günstige Gene zur Verfügung stehen, besteht die wesentliche Limitierung derzeit noch in der Unfähigkeit, zu einem signifikanten Anteil reifer, autologer CD4<sup>+</sup>-Zellen Zugang zu bekommen bzw. sie zu transfizieren, da es sich hier um diejenigen Zellen handelt, die bereits durch das HIV zerstört wurden. Ziel einer Phase-I-Studie war deshalb, basierend auf diesen Markerstudien, die Herstellung von HIV-spezifischen T-Zellen zur Verstärkung einer Immunantwort gegen das Virus. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von HIV-freien Zwillingen wurden mit dem Gen eines antigenspezifischen chimerischen T-Zell-Rezeptors transduziert und in den HIV-infizierten Zwillingenbruder oder die Zwillingsschwester infundiert (Walker et al. 1995). Dieser chimerische Rezeptor besteht aus einer CD4-Domäne fusioniert mit einem Anteil des T-Zell-Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass die Infusion von bis zu 10<sup>9</sup> genmodifizierten Zellen nicht toxisch ist und dass diese Zellen in einigen Patienten bis zu 16 Wochen persistieren. 8 Wochen nach der Infusion waren noch 0,1% der peripheren

Blutlymphozyten modifiziert. Auf dieser Basis konnte inzwischen auch eine Phase-II-Studie mit auf die gleiche Weise transduzierten autologen T-Zellen und Knochenmarkstammzellen gestartet werden.

Bei den meisten therapeutischen Studien handelt es sich um Immunisierungstherapien mit dem Ziel, die Immunantwort gegen HIV zu verstärken. In einer Phase-I/II-Vakzinationsstudie wurden entweder Placebo oder ein retroviraler Vektor, HIV-IT(V), i.m. injiziert (Haubrich et al. 1995). HIV-IT(V) ist hochgradig rekombinant und wird von einer Hunde- und nicht wie sonst üblich von einer Mauszelllinie produziert, um In-vivo-Rekombinationsrisiken zu senken. Der virale Vektor trägt Segmente der potenziell vakzinierenden *env*- und *rev*-Gene von HIV-1 IIIB. Durch die Nachbeobachtung der ersten 16 Patienten konnte Toxizität ausgeschlossen werden. Es fand sich jedoch auch kein therapeutischer Effekt, weder in Bezug auf einen Impfeffekt noch auf die Virusbelastung. Diese Studie und ihr Phase-I-Vorgänger (Ziegner et al.

1995, Galpin et al. 1994) sind inzwischen abgeschlossen. Ihnen folgte die verwandte Phase-II-Studie von Parenti et al. [bisher nicht veröffentlicht, zitiert in Wiley (1998)], die ebenfalls mit HIV-IT(V) durchgeführt wird. Bereits in den ersten Monaten im Jahr 1995 waren 124 Patienten eingeschlossen, Ende 1997 bereits 216.

Auch MacGregor et al. (1998) verwendeten eine i.m. Vakzinationstherapie, wobei sie erstmalig nackte HIV-Gene einsetzten. DNA für HIV-1-MN-*env*- und *-rev*-Gene unter der Kontrolle eines CMV-Promotors wurden 13 Männern und 2 nicht schwangeren Frauen verabreicht. Die Zahl der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten betrug wenigstens 500/μl Blut, und es wurden keine antiviralen Medikamente verwendet. Entsprechend einem eskalierenden Dosischema wurden jeweils 5 Patienten in Form von 3 Injektionen in jeweils 10-wöchigem Abstand 30 μg, 100 μg oder 300 μg verabreicht. Da präklinische Untersuchungen gezeigt hatten, dass i.m. Bupivakainhydrochloridinjektionen jeweils vor der DNA-Injektion eine 20- bis 200fache Erhöhung der Transgenexpression bewirkten, und bereits gezeigt werden konnte, dass die Impfung Schimpansen gegen HIV-Infektionen schützte bzw. in bereits infizierten Tieren deren Anti-HIV-Abwehr verbesserte, wurde dieses Verfahren auch bei Menschen eingesetzt. Die Therapie wurde mit nur geringen Nebenwirkungen gut vertragen. Lediglich lokaler Schmerz und Steifheit wurden als impfungsbedingt erachtet. Es fanden sich weder hämatologische noch renale Toxizität. Bei allerdings bereits sehr variablen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenzahlen vor der Behandlung fand sich kein signifikanter therapeutischer Effekt. Auch die Virusbelastung blieb unverändert, wobei die HIV-RNA in 7 Patienten sogar um 30% anstieg und in 7 anderen Patienten um 30% fiel. Dagegen wurden die Anti-Env-Antikörper in Patienten geboostert, die 100 μg erhalten hatten. Anti-gp120-Antikörper stiegen in einzelnen Patienten der 100- und 300-μg-Gruppen. Die Anti-gp120-Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) und die Lymphozytenproliferationsaktivität nahmen ebenfalls zu.

Riddel et al. (1996) beobachteten in 6 Patienten mit HIV-Infektionen eine therapeutisch einsetzbare Immunreaktion gegen ein fremdes Transgen, nachdem sie eine adoptive Immuntherapie erhalten hatten. Periphere Blutlymphozyten der Patienten waren gesammelt und für HIV-gag-Protein spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten-Klone isoliert worden. Diese Klone waren in vitro mit einem retroviralen Vektor mit einem Fusionsgen transduziert worden, genannt HyTK, das für den Positiv-

selektionsmarker Hy (Hygromyзинresistenz) und den Negativselektionsmarker TK (Ganciclovirsensitivität) kodiert. Sie demonstrierten auf MHC I beschränkte anti-HIV-gag-zytotoxische Aktivität auf Target-Zellen in vitro. 1 der 3 Klone von HyTK-transduzierten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde expandiert und in autologe Patienten reinfundiert, wobei aufsteigende Dosen von 10<sup>8</sup>-3,3×10<sup>9</sup> Zellen/m<sup>2</sup> verabreicht wurden. Es fanden sich keine Zeichen für Toxizität, und es war keine zusätzliche Ganciclovirbehandlung notwendig. Vor der Infusion konnten keine Gedächtnis-CTL gegen Hy oder TK nachgewiesen werden. Nach der Infusion jedoch wurden in 5 von 6 Patienten HyTK-spezifische CTL gefunden. Patienten ohne nachweisbare anti-HyTK-zytotoxische Aktivität zeigten einen Anstieg an zirkulierenden HyTK-transduzierten Zellen nach jeder Infusion. In allen Fällen waren HyTK-transfizierte Zellen maximal 7 Tage nachweisbar. Somit waren also die hier behandelten Patienten in der Lage, die Transgen exprimierenden autologen Zellen schnell abzustößen, obwohl sie immunologisch nur eingeschränkt kompetent waren.

Calarota et al. (1998) verabreichten deshalb 9 symptomfreien HIV-1-Patienten i.m. Injektionen der Immunisierungskandidatengene HIV-1-*tat*, *-rev* oder *-nef*. Insgesamt wurden jeweils 3 Immunisierungen innerhalb von 6 Monaten verabreicht. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Vor der Behandlung waren in keinem der Patienten Antikörper und zellvermittelte Immunität gegen diese 3 regulatorischen Proteine vorhanden, danach fanden sich jedoch in allen 9 Patienten spezifische Gedächtniszellen und in 8 Patienten eine spezifische Zytotoxizität. Induzierte CTL waren auf MHC Klasse I beschränkt und vorwiegend CD8<sup>+</sup>-positiven Ursprungs. In 3 Patienten jedoch verringerte sich die zelluläre Aktivität nach dieser ursprünglichen Immunantwort. Die geringe Patientenzahl ließ nur die Vermutung zu, dass HIV-spezifische zytotoxische Antworten gegen regulatorische Proteine zu einer immunologischen Beseitigung infizierter Zellen führen könnten, bevor sie virale Partikel freigesetzt haben. Möglicherweise hätten nichtselektionierte oder nichtinfizierte Personen stärkere Immunantworten gezeigt als die selektionierten Patienten mit geringer oder ohne vorbestehende Antwort.

Neben der Stimulation einer verstärkten Immunantwort gegen HIV stehen noch zahlreiche Optionen für genterapeutische Behandlungsstrategien zur Verfügung, die eher auf eine „intrazelluläre Immunisierung“ abzielen, indem die virale

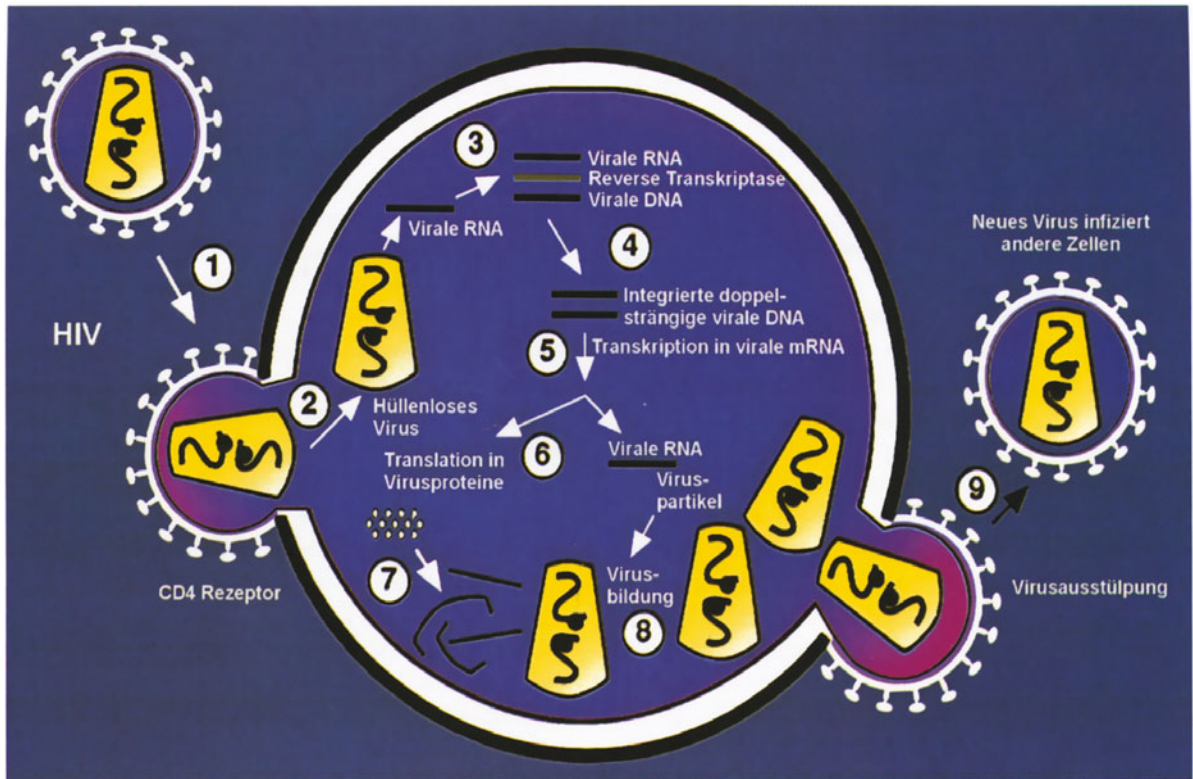


Abb. 10.17. Genetische Strukturelemente des HIV, modifiziert nach Harrison (1994)

Replikation inhibiert wird. Sie umfassen verschiedene dominant-negative Mutanten von Ribozymen, intrazelluläre Antikörper bis hin zu verschiedenen viralen Targets, wie fast alle Stadien des viralen Replikationszyklus. Letzteres wird durch letale Mutationen der viruseigenen *gag*-, *pol*-, *tat*-, *rev*- und *env*-Gene erreicht, die kompetitiv die Integration von intaktem Wildtypprotein verhindern (Abb. 10.17). In klinischen Phase-I-Studien werden derzeit ein transdominantes mutiertes HIV-Protein, Rev M10, das kompetitiv an das entsprechende Rev-respondierende Element bindet, sowie ein Haarnadelribozym gegen die 5'-Leitsequenz des Retrovirus getestet. In beiden Fällen wurden autologe CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von HIV-infizierten Patienten verwendet (Barinaga et al. 1993, Woffendin et al. 1996). Lediglich für die erste Studie (Rev) liegen derzeit Ergebnisse vor. T-Lymphozyten wurden mit Hilfe von Goldmikropartikeln mit Rev M10 transduziert. Die Überlebenszeit der T-Lymphozyten betrug in 1 der 3 ersten Patienten 15 Tage, verglichen mit 3,5 Tagen für einen Kontrollpatienten, der den gleichen Vektor ohne das therapeutische Gen erhielt (Woffendin et al. 1996).

Da immunisierende Monotherapien bisher wenig erfolgreich waren, ist es wahrscheinlich, dass sich eher Therapien unter dem gleichzeitigem Einsatz

von multiplen therapeutischen Genen, die gegen verschiedene virale Gene und/oder verschiedene Stadien der Virusreplikation gerichtet sind, durchsetzen werden, die alle idealerweise über den gleichen Vektor transferiert werden. Auch zielten alle bisher vorliegenden klinischen Studien nur auf die Behandlung von T-Lymphozyten ab, obwohl das Reservoir infizierter Zellen auch aus anderen Zellen, wie z. B. Makrophagen, dendritischen Zellen und den Gliazellen des Gehirns besteht, die teilweise eine sehr lange Lebensdauer haben. Eine verbesserte Therapieeffizienz ist möglicherweise auch über eine größere Vielfalt an Target-Zellen zu erreichen.

#### 10.4.4 Kardiovaskuläre Erkrankungen: periphere und koronare Gefäßkrankheit

Hier spielen insbesondere die arteriosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle, v. a. die periphere Gefäßkrankheit und die koronare Herzkrankheit.

##### 10.4.4.1 Arteriosklerose

Arteriosklerotische Läsionen werden in frühe Läsionen (initiale Läsionen und Lipideinlagerungen),

intermediäre Läsionen, fibröse Plaques und komplizierte Läsionen eingeteilt. Obwohl der Begriff der „generalisierten Arteriosklerose“ weit verbreitet ist, sind die Läsionen tatsächlich unregelmäßig verteilt; verschiedene Gefäße sind abhängig vom Alter und in verschiedenem Ausmaß betroffen. Die abdominale Aorta ist am frühesten und heftigsten betroffen und lässt den Befall anderer Arterien abschätzen. Gewöhnlich sind auch die Gefäße der unteren Extremitäten stärker betroffen als die der oberen. In Koronararterien sind v.a. die Hauptäste befallen, wobei auffällig ist, dass ausschließlich epikardiale Arterien und praktisch nie intramurale Gefäße betroffen sind. Es wird vermutet, dass die besonderen hämodynamischen Kräfte eine wichtige Rolle spielen, da in den Koronararterien im Gegensatz zu anderen wichtigen Arterien der Fluss in der Diastole größer ist als in der Systole. Eine spezielle Prädispositionsstelle der hirnversorgenden Arterien ist der proximale Anteil der *A. carotis interna*.

Eine allgemein akzeptierte Theorie zur Pathogenese der Arteriosklerose ist die Hypothese einer Verletzungsreaktion der Gefäße. Danach sind Endothelzellen, die die Intima zum Lumen hin begrenzen, einer wiederholten oder andauernden Bedrohung ihrer Integrität ausgesetzt. Die Verletzung des Endotheliums kann subtil oder grob sein. Dies führt schließlich zu einem Verlust der Fähigkeit der Zellen, normal zu funktionieren und weiter als eine Permeabilitätsbarriere zu funktionieren. Beispiele für Formen der Endothelverletzung sind die metabolische Verletzung durch die Hypercholesterinämie und Homozysteinämie, der mechanische Stress in Verbindung mit der Hypertonie und eine immunologische Beeinträchtigung nach Herz- oder Nierentransplantation. Die Endotheldysfunktion an dafür gefährdeten Stellen des Gefäßbaums kann zu einer Exposition des darunter gelegenen Gewebes gegenüber Plasmabestandteilen führen. Hierdurch kommt es zu einer Abfolge von Ereignissen:

1. Monozyten- und Plättchenadhäsion,
2. Migration von Monozyten in die Intima,
3. anschließende Umwandlung der Monozyten in Makrophagen,
4. Plättchenaggregation,
5. Formierung von Mikrothromben,
6. Freisetzung von sezernierbaren Produkten von Makrophagen und Plättchen:
  - Wachstumsfaktoren,
  - Zytokine [z.B. PDGF (*platelet-derived growth factor*), IL-1, CSF].

In Verbindung mit Plasmabestandteilen, wie Lipoproteinen, oder Hormonen, wie Insulin, können diese Faktoren das Wachstum intimaler glatter Muskelzellen im Bereich der Gefäßverletzung stimulieren. Diese proliferierenden glatten Muskelzellen können Bindegewebsmatrix abgelagern und Lipide akkumulieren, ein Prozess, der v.a. bei einer Hyperlipidämie verstärkt stattfindet. Auch von Monozyten abstammende Makrophagen können Lipide akkumulieren, die wiederum mit Proteinen Komplexe bilden können, die für oxidierte Lipoproteine typisch sind. Auch sind diese Zellen in der Lage, Lipoproteine in situ zu modifizieren, wodurch ihre Aufnahme durch *Scavenger-Rezeptoren* begünstigt wird. Endothelzellen und Makrophagen können ein *Chemoattractant-Protein* bilden, das die Akkumulation von von Monozyten abstammenden Makrophagen unterbindet.

Die Adhärenz von Monozyten an das alterierte Endothel und ihre Migration in die Gefäßwand, um zu dort sesshaften Makrophagen zu werden, ist wohl die 1. zelluläre Veränderung im Rahmen der Arterioskleroseentstehung. So kann eine wiederholte oder anhaltende Verletzung zu einer sich langsam entwickelnden Läsion führen, mit zunehmender Anzahl intimaler glatter Muskelzellen, Makrophagen, Bindegewebe und Lipide. Areale, in denen das Endothel den Scherkräften besonders ausgesetzt ist, wie Abgänge von Gefäßästen oder Gefäßaufzweigungen, sind besonders gefährdet. Während die Läsionen und die Intimadicke zunehmen, ändert sich auch der Blutfluss über diesen Engstellen (Stenosen), was die Verletzungsgefahr für das Endothel durch Scherkräfte noch weiter erhöht; ein *Circulus vitiosus*, der schließlich zur Ausbildung einer komplexen Stenose führt.

Ein anderer, die obige Theorie nicht unbedingt ausschließender Erklärungsversuch, ist die monoklonale Hypothese. Die Basis sind einzelne Isoenzymtypen, die sich in den Läsionen finden. Durch die Multiplikation einzelner, individueller glatter Muskelzellen, ähnlich wie in benignen Tumoren, kommt es durch die intimale Proliferation zu Läsionen. Auf diese Weise könnten mitogene, möglicherweise auch mutagene Faktoren die Proliferation glatter Muskelzellen durch Einwirkung auf einzelne Zellen stimulieren.

Die Theorie der fokalen Alterung von Zellen versucht zu erklären, wie intrinsische Alterungsprozesse zur Arterioskleroseentstehung beitragen. Danach stehen proliferierende glatte Muskelzellen, die zur Atherombildung beitragen, normalerweise unter der rückgekoppelten Kontrolle von Mitoseinhibitoren, die von glatten Muskelzellen der anhängen-

genden Media gebildet werden. Dieser *Feedback-Mechanismus* tendiert dazu, im Alter zu versagen, sodass Zellen sterben und dabei nicht ausreichend ersetzt werden.

Die lysosomale Therapie vertritt die Ansicht, dass eine alterierte lysosomale Funktion zur Arterioskleroseentstehung beiträgt. Da lysosomale Enzyme im Rahmen der kontinuierlichen Erneuerung den Abbau von zellulären Komponenten vollziehen können, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zellalterung und bei der Akkumulation von Lipofuszin, einem „Alterungspigment“. Es wurde angenommen, dass die vermehrte Ablagerung von Cholesterolestern in arteriellen glatten Muskelzellen teilweise durch einen relativen Mangel an der Aktivität der lysosomalen Cholesterolesterhydrolyase bedingt ist. In Übereinstimmung mit dieser Theorie könnten einige der seltenen Patienten mit lysosomalen Speicherkrankungen eine akzelerierte Arteriosklerose erworben haben. Die meisten der Lipidtröpfchen in Schaumzellen sind jedoch zytoplasmatisch und nicht lysosomal.

**Vulnerable Plaque und Plaqueruptur, Herzinfarkt.** Die Ruptur der arteriosklerotischen Plaques und die konsekutive Formation gefäßverschießender Thromben sind die wichtigsten Mechanismen, die zu akuten Ischämien, einschließlich Herzinfarkt, führen. Die vulnerable Plaque ist kleiner, lipidreicher und stärker von Makrophagen infiltriert als die stabile fibromuskuläre Läsion. Umgekehrt könnte eine Reduktion des Lipid- und Makrophagen-Pools zur Plaquestabilisierung beitragen und die Rupturinzidenz vermindern, andererseits eine antithrombotische Therapie die nachfolgende akute Ischämie verhindern.

**Restenose nach Angioplastie.** Die instrumentelle Behandlung stenosierender Erkrankungen der Herzkranzgefäße hat eine anfänglich unerwartete Entwicklung genommen. So lag die Zahl der Eingriffe in der BRD 1985 bei 5000, und 1996 wurden mehr als 100 000 Indikationen verzeichnet. Die Indikationserweiterung resultiert v. a. aus der schnellen Entwicklung und Modifikation von Ballon- und Schaftmaterialien mit der Folge einer besseren Erreichbarkeit und Passierbarkeit der Stenosen und auf der Entwicklung neuer Verfahren, insbesondere der Atherektomie und der Stent-Implantation. Durch die Einführung von Stents konnten die Akutergebnisse erheblich verbessert werden, gleichzeitig haben sie die Katheterverfahren sicherer gemacht.

Hinsichtlich der Restenoseprävention konnten dagegen keine überzeugenden Fortschritte erzielt

werden. Weder die zunehmende Erfahrung der interventionellen Gruppen noch die Einführung optimierter Ballonbestecke oder alternativer Verfahren setzten die Restenosehäufigkeit entscheidend herab, obwohl gerade die alternativen Instrumente wie Atherektomie, Laser- und Rotablationskatheter initial mit der Absicht entwickelt worden waren, durch Plaqueabtragung die Rezidivstenose zu vermeiden oder zumindest zu vermindern. Die absolute Zahl der Rezidivstenosen nimmt sogar mit der Indikationserweiterung und der zunehmenden Häufigkeit der durchgeführten Behandlungen weiter zu. Die Restenose nach Angioplastie repräsentiert somit wohl das bedeutendste und bislang ungelöste Problem der interventionellen Kardiologie. Auch in neuesten Studien mit richtungsweisendem Charakter liegt die Rezidivrate zwischen 20 und 50% (Tabelle 10.10, 10.11).

Wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte, läuft die Restenoseformation, ähnlich wie bei anderen Wundheilungsprozessen, in 3 überlappenden Phasen ab.

Die Phase der Entzündung beginnt mit dem Zeitpunkt der Gefäßverletzung, gelegentlich kombiniert mit thrombotischen Auflagerungen auf dem verletzten Areal. Sie dauert nur Stunden bis wenige Tage an und wird von der Granulationsphase gefolgt, die im Schweinmodell nach etwa 7 Tagen das Maximum der Proliferationsaktivität zeigt. Zu diesem Zeitpunkt sind viele Gefäßwandmyozyten unter dem Einfluss zahlreicher, bereits bekannter wachstumsstimulierender Proteine vom kontraktilen, ruhenden Phänotyp in das synthetische proliferative Stadium übergegangen. Schließlich kommt es, beginnend mit der 2. Woche nach dem Trauma und teilweise über Monate bis Jahre anhaltend, zur vermehrten Formation bzw. zum Umbau der Matrix. Die variable Auswirkung dieser Vorgänge auf die neue Struktur der Arterien, genannt *Remodelling*, erstreckt sich von der Gefäßdilatation über die kompensatorische Dickenveränderung der Wandschichten bis hin zur Lumeneinengung, der eigentlichen Restenose. Nicht alle Mechanismen dieses *Remodelling* sind bis heute voll verstanden.

**Gentherapie.** Bisher wurden mindestens 47 Patienten im Rahmen von 4 Protokollen gentherapeutisch behandelt (Wiley 1998).

**Angioneogenese.** Die periphere arterielle Verschlusskrankheit war die erste kardiovaskuläre Erkrankung, bei der die Gentherapie eingesetzt wurde (Isner et al. 1995, 1996 a, b, Isner 1998). Im Sta-



**Tabelle 10.10.** Vergleich von Atherektomie und Stent-Implantation bei der Prävention der Restenose

Studien Ergebnisse	Benestent		Stress		CAVEAT		CCAT	
	Stent	PTCA	Stent	PTCA	DCA	PTCA	DCA	PTCA
<i>n</i>	259	257	250	202	512	500	138	136
Erfolg [%]	93	91	95	92	89	80	98	91
Stenose [%]								
Vor 6 Monaten	64	64	76	74	71	73	71	70
Nach 6 Monaten	22	33	19	35	29	36	25	33
Später	38	43	42	49	52	54	49	48
Restenoserate [%]	22	32	32	42	49	57	46	43

**Tabelle 10.11.** Studien zur pharmakologischen Restenoseprävention, modifiziert nach Herrman (1993)

Medikamentenklasse	Medikament
Gerinnungshemmen- de Medikamente	Heparin, Hirudin, Marcumar, niedermolekulare Form von Heparin, Aspirin, Dipyridamol, Ticlopidin, Tx <sub>A2</sub> -Antagonisten, Dextran, Serotoninantagonisten, Prostazylin, Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorenblocker
Kalziumantagonisten	Nifedipin, Verapamil, Diltiazem
Antiinflammatorika	Kortikoide, nichtsteroidale Antiinflammatorika, Kolchizin, Trapidil
Antiproliferativa	ACE-Hemmer, photodynamische Behandlung
Lipidsenker	Lovastatin
Antioxidanzien	Kalzium-Calmodulin-Antagonisten, Tokopherol (Vitamin E), Fischöl

dium IV der Erkrankung mit ischämischen Ulzera und drohender Amputation wurde das Gen des VEGF (*vascular endothelial growth factor*) bisher transluminal oder subkutan in 33 Patienten im Rahmen von 2 Protokollen in den USA und in Finnland transferiert (Isner et al. 1996a, Isner 1998, Wiley 1998). Die DNA wurde entweder nackt oder als Liposomenkomplex transferiert. Durch die Angiogeneese und konsekutive Kollateralisierung konnte in einigen Patienten, abhängig v. a. von der applizierten DNA-Menge, klinisch eine Verbesserung der Gehstrecke erzielt werden, parallel dazu eine Zunahme der Perfusion in der konventionellen und in der Kernspangiographie. Als zusätzlicher Beweis für die biologische Wirkung des erfolgreich exprimierten Gens konnten die Ausbildung von großen *Spider naevi* im Bereich des Fußes sowie ein passageres peripheres Ödem infolge der vermehrten Gefäßpermeabilität beobachtet werden (Isner et al. 1996a, Baumgartner et al. 1998). Da VEGF von intakten Zellen sezerniert werden kann, war eine subkutane Anwendung

ebenso wirkungsvoll wie die direkte, transluminale Applikation über einen hydrogelbeschichteten Katheter. Nachteilig könnten jedoch die nachweislich erhöhten Plasmaspiegel für VEGF-Protein sein (Baumgartner et al. 1998), da VEGF auch bei der Tumorangiogenese eine bedeutende Rolle spielt und somit potenziell das Wachstum bis dahin nicht erkannter Mikrotumoren anregen könnte. Crystal et al. (1995) initiierten inzwischen eine klinische Studie mit adenoviralem Transfer des VEGF-Gens in periphere Arterien. Ergebnisse hierzu liegen derzeit noch nicht vor.

Ähnlich wie zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erfolgte inzwischen auch von Ylä-Hertualla et al. [bisher nicht veröffentlicht, zitiert in Wiley (1998)] im Rahmen einer finnischen Studie bei 3 Patienten die Behandlung der koronaren Herzkrankheit. Hier wurden die Lipofektion und Adenoviren eingesetzt. 3 weitere klinische Studien mit adenoviralem VEGF-Transfer bzw. der Applikation von nackter VEGF-DNA sowie adenoviralem Transfer des FGF-4-Gens (*FGF: fibroblast growth factor*) wurden begonnen (Wiley 1998). Derzeit liegen noch keine Ergebnisse über Patientenzahlen oder Ergebnisse vor.

Bisher erhielten 5 Patienten, bei denen eine konventionelle Therapie versagt hatte, direkte myokardiale Injektionen von phVEGF<sub>165</sub>-Plasmid durch eine minimalinvasive Brustwanderöffnung (Losordo et al. 1998). Das Verfahren erwies sich als sicher, und alle Patienten hatten signifikant weniger Angina pectoris.

**Prävention der Restenose.** Eine weitere Indikation zum Einsatz des VEGF bei der peripheren Verschlusskrankheit war die Prävention der Restenose nach Ballonangioplastie durch die frühzeitige Ausbildung eines Neendothels (Isner et al. 1996c). Hier erfolgte der Einsatz bisher bei mindestens 11 Patienten (Wiley 1998). Eine andere Gruppe testet

derzeit klinisch, trotz kontroverser Ergebnisse in Tierexperimenten, den Einsatz von *Antisense*-Oligonukleotiden gegen das Protoonkogen *c-myc* (Kutryk et al. 1997). Eine Reihe anderer antiproliferativer Gene, wie *Antisense-c-myc*, *p21*, Riboblastoma und Cecropin, befinden sich derzeit in der präklinischen Testung (Simons et al. 1992, Nikol et al. 1999, Huehns et al. 1999, Chang et al. 1995a,b). Neben dem direkten Gentransfer befindet sich auch die Verwendung genetisch modifizierter Zellen in Verbindung mit z.B. Stents in Erprobung (Dichek et al. 1989).

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

#### 10.4.5 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Bei der ALS handelt es sich um eine neurologische Erkrankung mit Zelltod von Motoneuronen. In präklinischen Studien hatte sich gezeigt, dass neurotrophische Faktoren auf Nagermodelle für die humane Erkrankung einen therapeutischen Effekt haben. Einer dieser Faktoren, der ziliäre neurotrophische Faktor (CNTF), wurde in einer nichtgentherapeutischen klinischen Studie untersucht, indem Patienten mit ALS das CNTF-Protein systemisch erhielten. Dabei fanden sich erhebliche Nebenwirkungen, wie die Induktion von Akutphasenreaktoren, erheblicher Hustenreiz und Gewichtsverlust, die zum Abbruch der Studie führten. Weitere Probleme waren die kurze Halbwertszeit der Mole-

küle und ihre Unfähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

**Gentherapie.** Aebischer et al. (1996) entwarfen eine klinische Phase-I-Studie, bei der die Wirkungen einer lokalen Applikation und Verfügbarkeit im Nervensystem beobachtet werden sollten. Hierfür wurde eine Nierenzelllinie des Babyhamsters (BHK-Zelllinie) *in vitro* mit dem CNTF-Gen transduziert und in Polymerkapseln eingeschlossen. Die CNTF-Expression lag bei etwa 1 µg/Tag. Die Implantation erfolgte im lumbalen intrathekalen Zwischenraum der Patienten. Bisher erhielten mindestens 12 Patienten derartige Kapseln. Zur Untersuchung der In-vivo-Expression entnommene sukzessive Liquoruntersuchungen, die vor der Therapie negativ waren, zeigten danach mehrere 100 pg von CNTF bis zu 15 Monate nach der Implantation. Explantierte Kapseln enthielten noch lebende CNTF-produzierende BHK-Zellen. Keiner der Patienten zeigte die in der vorangegangenen systemischen Studie beobachteten schweren Nebenwirkungen. Entsprechend verschiedener klinischer Graduierungsschemen wurde trotz der erfolgreichen Expression in allen Patienten ein Fortschreiten der Krankheit festgestellt. Als nächster Schritt ist eine Kombination mit einem anderen neurotrophischen Faktor, dem NT4/5, geplant, da sich bereits *in vitro* ein besserer kurativer Effekt aufgrund einer Synergie der beiden Faktoren gezeigt hatte. Derzeit werden Zelllinien, die sowohl CNTF als auch NT4/5 produzieren, in Tiermodellen zur Motoneuronendegeneration getestet.

#### 10.4.6 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Multisystemerkrankung mit unbekannter Ursache. Eine Reihe von systemischen Manifestationen sind möglich, wobei die persistierende entzündliche Synovitis im Vordergrund steht, die meist die peripheren Gelenke in symmetrischer Weise befällt. Kennzeichen dieser Erkrankung ist die Knorpeldestruktion durch die Entzündungen der Synovia mit nachfolgenden Gelenkdeformationen. Der Verlauf kann sehr unterschiedlich sein, von milden Symptomen bis hin zu Gelenkdestruktionen, die die Implantation von Gelenkprothesen erfordern.

**Epidemiologie.** Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis beträgt in der Bevölkerung etwa 1% (0,3–2,1%). Frauen sind etwa 3-mal häufiger betroffen als Männer. Die Prävalenz steigt mit dem Alter,

wobei sich im höheren Alter die Geschlechtsunterschiede verwischen. Die rheumatoide Arthritis tritt in der ganzen Welt auf und betrifft alle Rassen. Sie beginnt meist in der 4. oder 5. Lebensdekade, wobei 80% der Betroffenen die Krankheit zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr entwickeln.

**Genetik.** Familienuntersuchungen geben Hinweise dafür, dass eine genetische Prädisposition existiert. Schwere rheumatoide Arthritiden treten z. B. 4-mal häufiger bei seropositiven Verwandten 1. Grads auf, und 10% der Betroffenen haben einen ebenfalls befallenen Verwandten 1. Grads. Eineiige Zwillinge haben, bei Erkrankung eines Zwillinges, ein ebenfalls 4fach höheres Risiko für eine rheumatoide Arthritis, das Risiko bei zweieiigen Zwillingen ist ähnlich dem von Geschwistern. In vielen Populationen konnte ein genetischer Zusammenhang mit dem Auftreten von HLA-DR4 gefunden werden, das bei 70% der Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimiert wird, im Gegensatz zu 28% in Kontrollpersonen. In anderen Populationen besteht ein Zusammenhang mit der Expression von HLA-DR1 und HLA-Dw16. Analysen dieser Histokompatibilitätskomplexgene haben ergeben, dass eine bestimmte Aminosäuresequenz in der 3. hypervariablen Region des HLA-DR-Moleküls das entscheidende genetische Element für die mögliche Erkrankung an einer rheumatoiden Arthritis ist. Diese Region scheint Einfluss auf die Selektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und die Präsentation antigener Peptide gegen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu haben.

Nicht allein die genetischen Faktoren sind für die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis verantwortlich, sondern auch zusätzliche Umgebungsfaktoren, wie Klima und Urbanisierung. Unklar bleibt jedoch, was letztlich das auslösende Agens ist, insbesondere, ob verschiedene virale oder bakterielle Infektionen beteiligt sind.

Neben den genetischen Prädispositionen für das Auftreten der rheumatoiden Arthritis gibt es auch noch genetische Prädispositionen für evtl. Nebenwirkungen gegen Antirheumatika. Hier ist das HLA-DR3-Allel mit Nebenwirkungen bei der Goldtherapie und dem Einsatz von D-Penicillamin assoziiert.

**Pathologie und Pathogenese.** Die frühesten Läsionen in der rheumatoiden Synovitis scheinen durch mikrovaskuläre Verletzungen und eine Zunahme der auskleidenden Synovialzellen verursacht zu sein. Es folgen perivaskuläre Infiltrationen und Infiltrationen mit mononukleären Zellen. Im weiteren Verlauf wird die Synovia ödematös und dringt als

villöse Wucherungen in die Gelenkhöhle ein. Die infiltrierenden Zellen sind vorwiegend T-Lymphozyten, wobei CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen gegenüber den CD8<sup>+</sup>-T-Suppressorzellen überwiegen. Typisch für die rheumatische Synovitis ist die andauernde immunologische Aktivität. Dabei finden sich charakteristischerweise auch eine Reihe von sezernierten Produkten aktivierter Lymphozyten, Makrophagen und anderer Zellarten (Tabelle 10.12). Die lokale Produktion dieser Zytokine ist für viele der pathologischen und klinischen Manifestationen der rheumatoiden Arthritis verantwortlich. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass es

**Tabelle 10.12.** Zytokine bei rheumatoiden Entzündungen, modifiziert nach Harrison (1994)

Manifestation	Freigesetzte Zytokine
<b>Entzündung des Synoviagewebes</b>	
Erhöhte Adhäsion von postkapillaren Venolen	IL-1, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$
Chemotaxis von T-Zellen	IL-8
T-Zell-Aktivierung und -Proliferation	IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-2
B-Zell-Differenzierung und -Antikörperbildung	IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-2, INF $\gamma$
Erhöhte Expression von HLA-Antigenen	INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , BM-CSF
Makrophagenaktivierung	INF $\gamma$ , GM-CSF, M-CSF, IL-2
<b>Entzündung der Synoviaflüssigkeit</b>	
Erhöhte Adhäsion von postkapillaren Venolen	IL-1, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$
Chemotaktisches Agens für PMN	TNF $\alpha$ , IL-8
Aktivierung von polymorphkernigen Zellen	TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-8
<b>Synoviaproliferation</b>	
Fibroblastenwachstum	PDGF, IL-1, IGF, FGF, TGF $\beta$ , EGF
Neovaskularisierung	TNF $\alpha$ , FGF, TGF $\beta$
<b>Knorpel- und Knochenschädigung</b>	
Aktivierung von Chondrozyten	IL-1, TNF $\alpha$
Aktivierung von Fibroblasten	IL-1, TNF $\alpha$
Aktivierung von Osteoklasten und -blasten	IL-1, TNF $\alpha$
<b>Systemische Manifestationen</b>	
Fieber, Allgemeinsymptome	IL-1, TNF $\alpha$
Akutphasenreaktoren	IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6

IL Interleukin TNF $\alpha$  Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; INF $\gamma$  Interferon  $\gamma$ ; GM-CSF Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; M-CSF makrophagenkoloniestimulierender Faktor; PDGF platelet-derived growth factor; PMN polymorphkernige Zellen; IGF insulin-like growth factor; FGF fibroblast growth factor; TGF $\beta$  transforming growth factor  $\beta$ ; EGF epidermal growth factor.

sich bei der rheumatoiden Arthritis um eine immunologische Erkrankung handelt.

**Laborergebnisse.** Es gibt keine für die rheumatoide Arthritis spezifischen Labormarker. Allerdings findet sich bei etwa 2/3 der Fälle ein positiver Rheumafaktor. Es handelt sich hierbei um einen Autoantikörper gegen den Fc-Anteil von Immunglobulin G. Der Rheumafaktor ist aber auch in etwa 5% der Gesunden positiv. Weiterhin sind auch eine ganze Reihe anderer Autoimmun- und Infektionskrankungen mit positivem Rheumafaktor assoziiert. Somit kann mit dem Rheumafaktor allein keine Diagnose, sondern lediglich eine Prognose gestellt werden, da bei hohen Titern häufig ein schwerer Verlauf mit extraartikulären Manifestationen besteht.

**Therapien.** Eingesetzt werden nichtsteroidale Antiinflammatorika, Glukokortikoide, Immunsuppressiva und Antirheumatika, wie Antimalariamittel, D-Penicillamin, Sulfasalazin und die Goldtherapie. Alle diese Medikamente müssen chronisch eingenommen werden und sind durch ihre hohen Nebenwirkungsraten oder das Nichtansprechen der Krankheit limitiert. Bei Gelenkdestruktionen bleibt ultimativ allenfalls die Implantation einer Endoprothese.

**Gentherapie.** Seit Juli 1995 wurden 2 klinische Studien zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis genehmigt. In einer Studie wird davon ausgegangen, dass es sich um eine invalidisierende Autoimmunerkrankung handelt, die die Knochengelenke befällt, bei der IL-1-assoziierte Entzündungen des lokalen Bindegewebes in chronischen Schmerzen, Gewebsarosion und eingeschränkter Beweglichkeit resultieren. Deshalb wird hier das Gen für das IL-1-Rezeptor-Antagonistprotein (IRAP) eingesetzt, das die durch IL-1 verursachten Gelenksarosionen blockiert. Im Juli 1996 behandelten Evans et al. (1996) schließlich die 1. Patientin. Diese 68-jährige Frau erhielt autologe Synovialzellen, die ex vivo mit einem retroviralen Vektor für das IRAP-Gen transduziert worden waren. Die transduzierten Zellen wurden intraartikulär injiziert. Insgesamt sollen 9 Patienten in diese Studie eingeschlossen werden, bisher wurden 7 Patienten aufgenommen.

In einer weiteren Studie wird von Roessler et al. das Thymidinkinasegen als nackte DNA eingesetzt (Wiley 1998).

## 10.5 Verbesserungsmöglichkeiten der Gentherapie

Die Erwartungen an die Gentherapie als eine schnelle Lösungsmöglichkeit für sonst kaum behandelbare Krankheiten sind hoch. Die vorliegenden Ergebnisse – und viele stehen noch aus – bestätigen, dass zwar Hoffnung für die erfolgreiche Therapie oder zumindest auf Linderung besteht, weisen aber auch auf eine ganze Reihe von Problemen hin, die vor einer breiten klinischen Anwendung gelöst werden müssen. Dieser Zustand wird noch mehrere Jahre andauern. Es kann kein einheitliches Transferschema für alle betroffenen Krankheiten geben, die Art des Transfers muss an die Besonderheiten der jeweiligen Krankheit angepasst werden. Viel versprechend sind die vielfältigen Entwicklungsmöglichkeiten, gleichermaßen im Hinblick auf Effizienz und auf Sicherheit. Ein Erfolg hätte weitreichende Folgen, denn langfristig könnten die Verringerung von Behandlungsdauern und wiederholten operativen und interventionellen Eingriffen neben einer verminderten Belastung für den Patienten auch zu einer erheblichen Kostensenkung im Bereich dieser überwiegend chronischen Erkrankungen führen.

### 10.5.1 Verbesserung der Vektoren

Ein Schwerpunkt bei der Verbesserung der Gentherapie ist die Verbesserung der viralen Vektoren (Günzburg und Salmons 1995). Am weitesten verbreitet sind Retro- und Adenoviren (Abb. 10.18). Ziele sind hierbei v.a. die Erhöhung der Transfer-effizienz und eine verbesserte Sicherheit der einzelnen Verfahren, insbesondere durch eine bessere Zielrichtung und Selektivität (als Übersicht Harris et al. 1996) sowie Verbesserung der Effizienz (Laitinen et al. 1997).

#### 10.5.1.1 Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren wurden bisher bei etwa 50% der Patienten weltweit bevorzugt für den Ex-vivo-Transfer eingesetzt (1607 Patienten in 177 Protokollen) (Wiley 1998). Eine stabile Expression für mindestens 36 Monate wurde nach retroviralem Gentransfer nachgewiesen, im Gegensatz zu maximal 9 Tagen nach adenoviralem Transfer (Crystal et al. 1995) (Abb. 10.19). Weitere Vorteile der Retroviren sind neben der stabilen kolinearen Integration von DNA die ausgezeichneten Kenntnisse

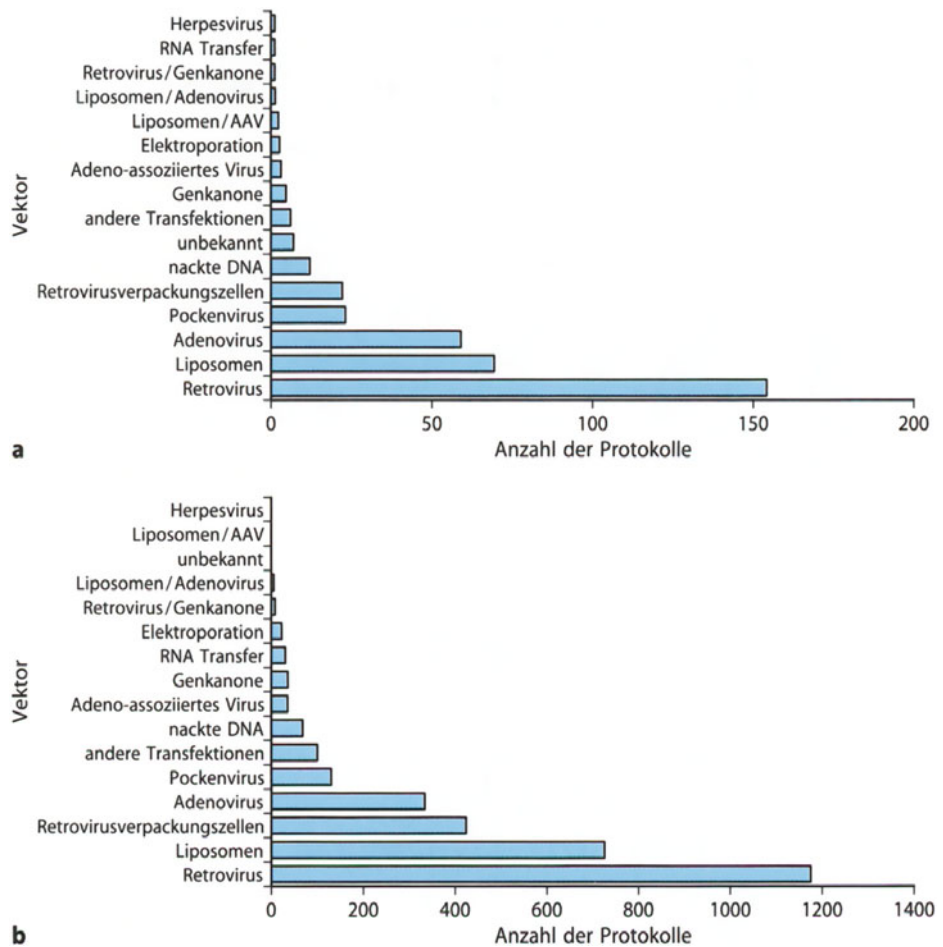


Abb. 10.18 a, b. Protokolle (a) und Patienten (b) im klinischen Gentransfer weltweit, aufgeschlüsselt nach Vektoren. Stand 1.12.1998, Wiley 1998

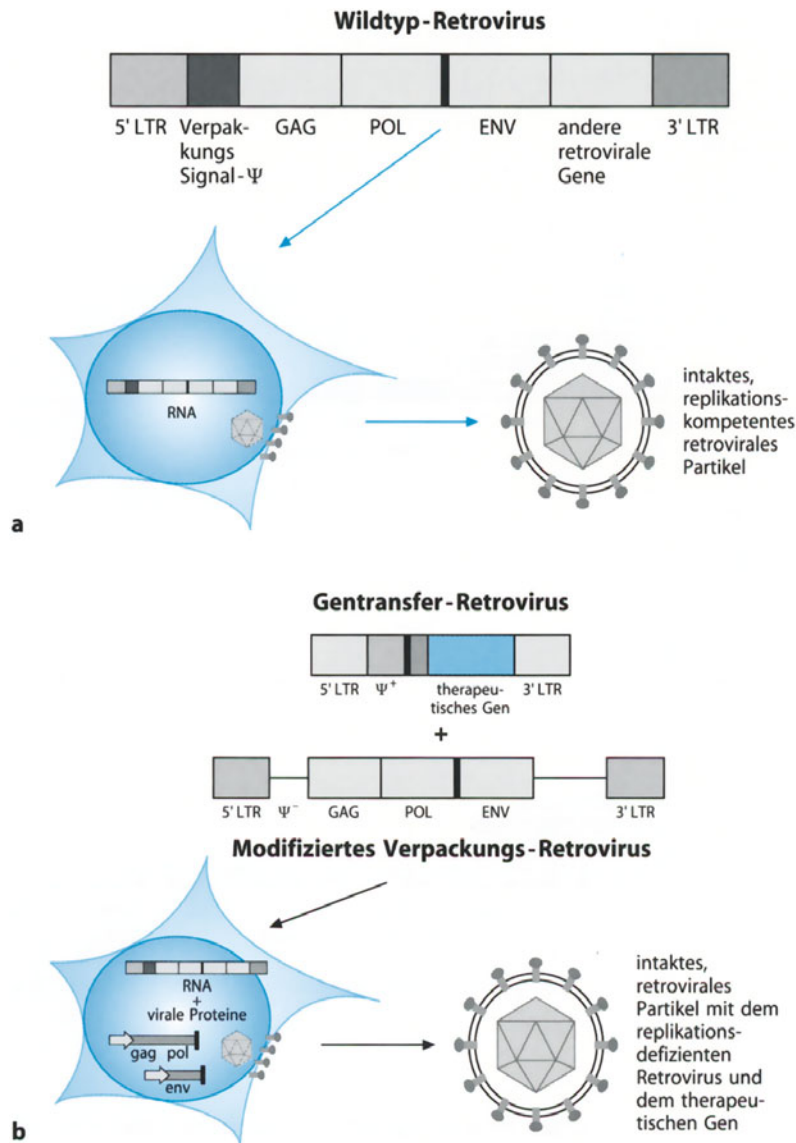
ihrer Biologie, niedrige Kopiezahlen, die relativ große DNA-Insertionsfähigkeit bis 7 kb, die Selektivität für proliferierende Zellen und die nur seltsame Humanpathogenität und Immunogenität.

Ein Nachteil der Retroviren waren bisher die relativ niedrigen Virustiter von  $10^6$ – $10^7$  cfu/ml. Durch die Herstellung von Virus pseudotypen, bei denen Proteine der Virushülle durch das VSV-G-Protein (VSG: *vesicular stomatitis virus*), das Hüllprotein eines Rhabdovirus, ersetzt wurden, können jetzt aufgrund der verbesserten Virusstabilität Virustiter  $>10^9$  erreicht werden (Burns et al. 1993). Auch durch neue amphotropische Verpackungszelllinien können hohe Virustiter und Komplementresistenz erreicht werden (Rigg et al. 1996).

Ein weiteres Problem war die kurze Halbwertszeit der Retroviren in vivo, v. a. durch Degradation in Anwesenheit von Komplement. Eine mögliche Lösung, die bereits entwickelt wurde, ist der Einschluss von virusproduzierenden Zellen in Zellulosefatskapseln. Sie schützen vor der immunologi-

schen Neutralisierung der Retroviren und ermöglichen die verzögerte Freisetzung über mindestens 6 Wochen. Eine andere Möglichkeit wären die Herstellung von Pseudotypen mit einem verändertem Hüllprotein und damit modifizierter Antigenität oder die Entwicklung von Vektoren, die auf einer anderen retroviralen Klasse basieren, wie z. B. den *Spumaviridae*, die gegenüber humanem Komplement weniger sensibel sind (Flügel et al. 1991).

Die bisher für den klinischen Gentransfer verwendeten Retroviren enthalten alle Vektoren, die auf dem MLV (*mouse leukemia virus*) basieren. Ihre Selektivität für proliferierende Zellen ist bei malignen und anderen proliferierenden Erkrankungen ein großer Vorteil. Bisher ist es allerdings nicht möglich gewesen, DNA stabil in das Genom von nichtproliferierenden Zellen zu integrieren, wie es z. B. bei der Behandlung von monogenen Erkrankungen wünschenswert wäre. Angestrebt wird nun die Entwicklung von Vektoren auf der Basis von HIV, die einen aktiven Transport von ge-



**Abb. 10.19. a** Wildtypretroviren enthalten die gesamte genetische Information, um in das Genom von Wirtszellen integriert werden und infektiöse Partikel produzieren zu können. Zu den Genen gehören 2 Long-terminal-Repeat-Regionen (*LTR*), Signale für die Verpackung des retroviralen Genoms in das virale Kapsid  $\Psi$ , Gene für die Proteine *Gag* (Kapsidproteine), *Pol* (retrovirale Enzyme), *Env* (Hüllproteine) sowie andere virale Proteine. **b** Das Gentransferretrovirus ist ein modifiziertes Retrovirus, das die *LTR*-Regionen,  $\Psi$  und das therapeutische Gen, angetrieben durch einen retroviralen oder anderen starken Promotor (z. B. CMV-Pro-

motor), enthält. Um Verpackungsfunktionen für das Gentransferretrovirus bereitzustellen wird ein 2. modifiziertes Verpackungsretrovirus hergestellt. Dieses Virus enthält die *LTR*-Regionen und die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene (*GAG*, *POL*, *ENV*), jedoch nicht das Verpackungssignal  $\Psi$ . Um intakte virale Partikel mit replikationsdefizienten Retroviren zu produzieren, werden geeignete Zellen mit beiden modifizierten Plasmiden kotransfiziert. Alternativ kann das Gentransferretrovirus in eine spezielle Verpackungszelllinie transferiert werden, die so konstruiert wurde, dass sie beständig die fehlenden Proteine *Gag*, *Pol* und *Env* produziert

netischem Material in den Nukleus und damit auch die Integration in nichtproliferierende Zellen erlauben würden (Buchsacher et al. 1992, 1993, Lewis et al. 1994).

Viel diskutiert ist auch die Möglichkeit der insertionellen Mutagenese durch die zufällige Integration des eingebrachten genetischen Materials in die Genome der Zielzellen. Hierdurch können

theoretisch die Expression anderer zelleigener Gene vermindert oder sogar ganz ausgeschaltet oder defekte Proteine produziert werden. Tatsächlich ist die Gefahr der Beeinflussung eines wachstumsregulierenden Proteins bei der therapeutischen Integration einzelner Gene statistisch sehr selten. Wie in vielen Tierexperimenten gezeigt werden konnte, ist die Onkogenese komplex und macht wieder-

holte Infektionen durch onkogene Viren erforderlich, eine einzelne Infektion reicht in der Regel nicht aus. Bisher liegt kein einziger Bericht über eine derartige Komplikation im Rahmen der zahlreichen klinischen Gentherapiestudien, die im Lauf der letzten 7 Jahre durchgeführt wurden, vor. Obwohl diese Gefahr offensichtlich überschätzt wurde, werden Strategien zur locuspezifischen Integration entwickelt. Eine Möglichkeit könnte in der Kombination der viralen Integrase mit einem Rekombinationsenzym bestehen, das nur an spezifische DNA-Konfigurationen bindet.

Weitere Optimierungsbestrebungen sollen die Gewebespezifität erhöhen. Durch Veränderung der Antigenität der Hüllproteine sollen bestimmte Gewebe selektiv bzw. bevorzugt infiziert werden (von Kalle et al. 1994). So wurde z.B. das Hüllprotein des Moloney-Virus gegen das Hüllprotein des Gibbonaffen-Leukämievirus ausgetauscht, um so einen effizienteren Gentransfer in humane Knochenmarkstammzellen zu ermöglichen (von Kalle et al. 1994). In einem anderen Beispiel konnte durch hepatropische retrovirale Pseudotypen eine Beschränkung des Transfers auf Leberzellen erreicht werden (Spiegel et al. 1998). Auch durch zell- und gewebespezifische Promotoren kann die Expression der therapeutischen Gene selektiver gemacht werden. Außerdem kann die Expression der therapeutischen Gene mit bestimmten Promotoren mit Hilfe bestimmter Medikamente systemisch (als Übersicht Günzburg et al. 1992), durch lokale Radiotherapie sogar lokal induziert werden.

#### 10.5.1.2 Adenovirale Vektoren

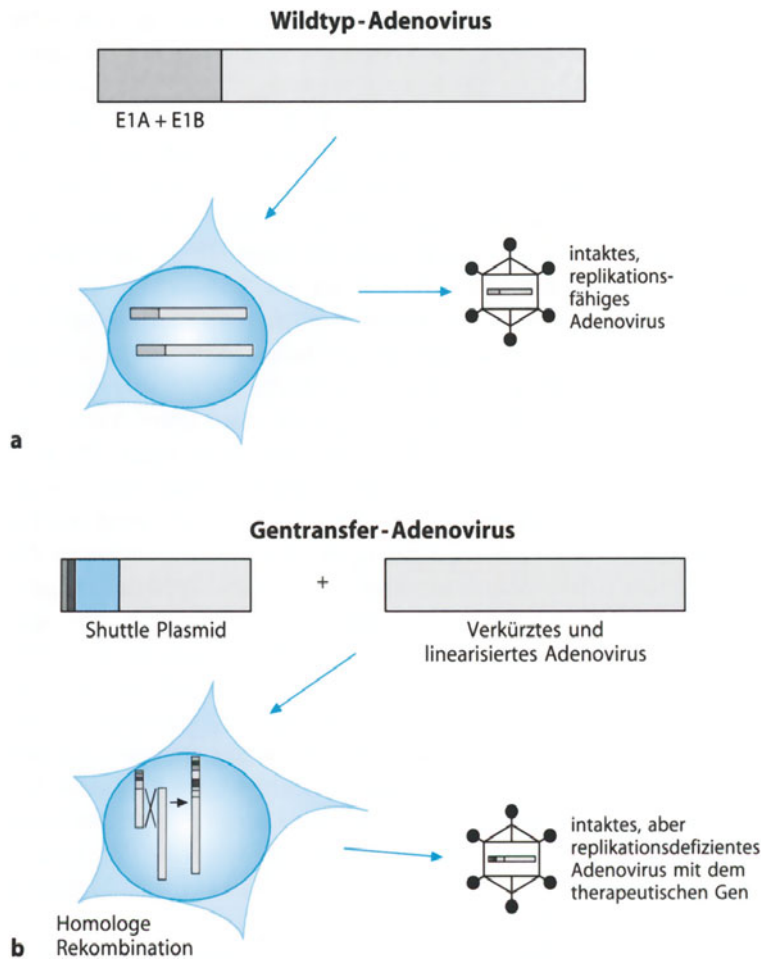
Bei den klinischen Studien haben neben den Retroviren bisher auch die Adenoviren eine große Rolle gespielt (335 Patienten in 60 Protokollen) (Abb. 10.18) (Wiley 1998). Vorteile sind die relativ hohen Virustiter und Transfektionseffizienzen, u. a. durch ihre Fähigkeit, auch ruhende Zellen zu transfizieren. Das Adenovirus liegt episomal im Kern vor, d. h. es wird nicht in das Wirtsgenom integriert (Abb. 10.20). Daraus resultiert der Nachteil, dass die transferierten Gene lediglich transient exprimiert werden. Bei bestimmten proliferativen Erkrankungen kann eine zeitlich limitierte Genexpression ausreichend sein, bei Gendefekten oder Genmangelkrankungen ist eine lang anhaltende Expression wünschenswert. Hierdurch notwendige wiederholte Genapplikationen werden durch die Humanpathogenität der Adenoviren mit konsekutiven Entzündungsreaktionen und Antikörperproduktionen kompliziert (Yang et al.

1994a). Obwohl sie normalerweise nur milde Infektionen des respiratorischen Trakts auslösen, können sie insbesondere bei Immunsuppression ernste, teils sogar tödliche Infektionen auslösen, wenn das Virus weitere Organe außerhalb seines Wirtsspektrums befällt (Niemann et al. 1993).

Der zytoplasmatische Transfer mit einer lediglich transienten Genexpression ist ein unveränderliches Charakteristikum der Adenoviren. Um den wiederholten Transfer möglich zu machen und die Effektivität der adenoviralen Vektoren auch beim Vorliegen primärer Antikörpertiter sicherzustellen, wird derzeit die Antigenität der verwendeten Adenoviren verändert. Im Extremfall muss für jede Applikation ein adenoviraler Vektor mit jeweils unterschiedlichem Viruskapsid und somit veränderter Antigenität eingesetzt werden, um somit die Immunantwort gegen den zuvor applizierten adenoviralen Vektor für die nachfolgende Therapie wirkungslos zu machen (Matrangeli et al. 1994). Interessanterweise ist die Immunantwort auf das fremde, nach erfolgreichem Gentransfer exprimierte Protein stärker als gegen die viruseigenen Proteine selbst. Die Immunreaktion ist dann besonders stark, wenn das Gen von einer anderen Spezies stammte. Hierdurch wird die Wirkdauer des Gentransfers erheblich herabgesetzt (Tripathy et al. 1996).

Ein weiterer Nachteil der Adenoviren war bisher die relativ geringe Insertionsgröße. Es werden derzeit die Serotypen Ad5 und Ad2 verwendet. Nach Deletion der E1-Region ergibt sich Raum für 3,2 kb Fremd-DNA, nach zusätzlicher Deletion von E3 für mehr als 2 weitere kb. Da das Adenovirus mit insgesamt 105% seines Genoms bepackt werden kann, ergibt sich für die adenoviralen Vektoren der 1. Generation eine Bepackungskapazität von maximal 7,5 kb. Ein Nachteil der Entfernung von E3 ist eine potenzielle Zunahme der Immunreaktion gegen das Adenovirus, da E3 dem Virus hilft, der Immunantwort des Gewebes zu entgehen. Eine Möglichkeit hierzu könnte die frühe, fetale Gentherapie der Lunge sein, wie bereits im Rattenexperiment mit Hilfe eines Reportergens gezeigt werden konnte (Sekhon et al. 1995).

Bei adenoviralen Vektoren der 2. Generation fehlt die E4-Region und damit die Fähigkeit zur Eigenproduktion essenzieller regulatorischer Genprodukte, die für die Replikation notwendig sind (Perricaudet, pers. Mitteilung). In einem anderen Beispiel konnte neben E1A und E1B zusätzlich noch das adenovirale Element E2A aus dem Virusgenom entfernt werden. Die Folge waren substanzial längere Expressionszeiträume für das thera-



**Abb. 10.20. a** Wildtypadenoviren enthalten die gesamte genetische Information für die Replikation und die Produktion von infektiösen Partikeln. Zu diesen Genen gehören frühe Aktivatoren der viralen Gene (E1A und E1B) sowie andere Gene, die später im viralen Lebenszyklus aktiviert werden und die DNA-Produktion und die Kapsidproteinsynthese regulieren. **b** Zur Produktion rekombinanter replikationsdefizienter Adenoviren wird zuerst ein *Shuttle-Plasmid* hergestellt. Dieses Plasmid enthält das gewünschte therapeutische Gen, angetrieben durch einen starken Promotor (z. B. CMV-Promotor), und eine lange Region mit adenoviralen Sequen-

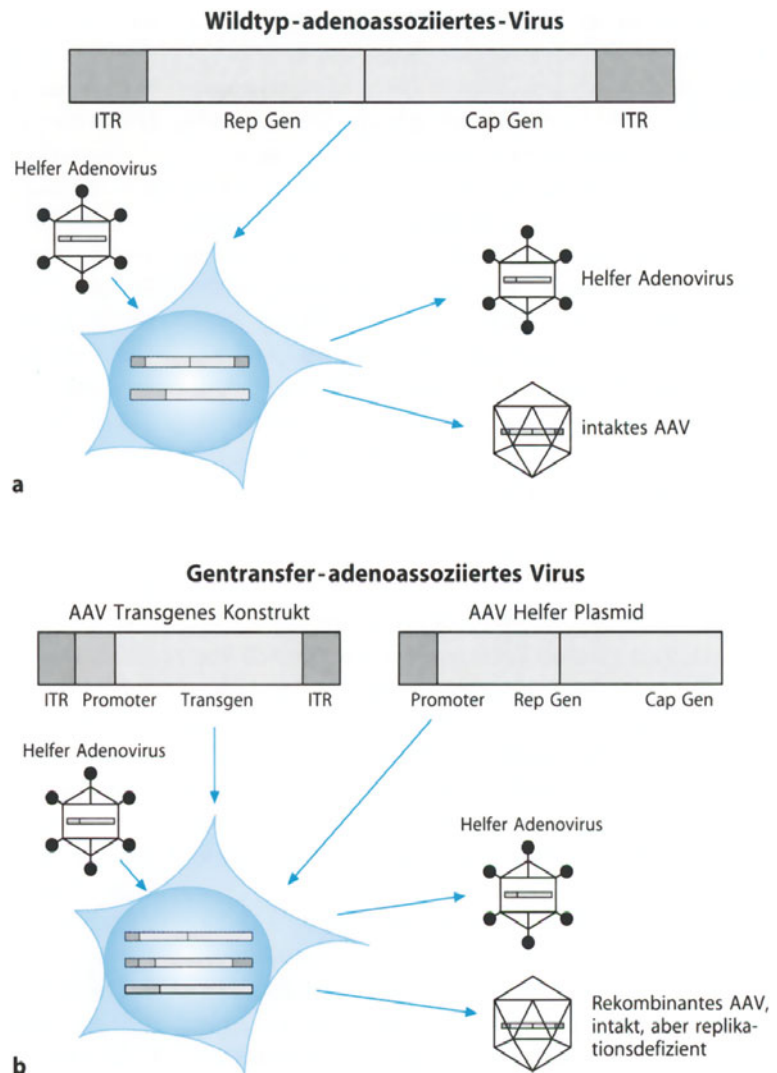
zen. Die Sequenzen der E1A- und E1B-Gene wurden entfernt. Dann wird ein linearisiertes adenovirales Konstrukt hergestellt, indem das E1-Gen und andere Regionen des Genoms entfernt werden. Um intakte rekombinante Adenoviren herzustellen, werden 293 Zellen mit dem *Shuttle-Plasmid* und dem verkürzten adenoviralen Konstrukt kotransfiziert. Durch homologe Rekombination entsteht ein rekombinantes Virus, das das therapeutische Gen und alle viralen Gene mit Ausnahme der E1-Region enthält. In 293-Zellen, die die E1-Funktion *in trans* zur Verfügung stellen, entstehen intakte, jedoch replikationsinkompetente virale Partikel

peutische Gen mit weitaus geringeren Entzündungsreaktionen (Yang et al. 1994 b).

Vektoren der 3. Generation sind bisher kaum verfügbar. Hier konnten v. a. die Verpackungszelllinien verbessert werden, insofern, dass diese mehr Virusproteine unter der Kontrolle stärkerer Promotoren produzieren und damit hohe Virustiter erreicht werden können (Perricaudet, pers. Mitteilung) bzw. weitere Elemente gleichzeitig aus den adenoviralen Vektoren entfernt werden. Die Gesamtkapazität kann so bis zu 10 kb erreichen, mit Virustitern höher als  $10^{10}$  pfu/ml (Günzburg und Salmons 1995). Die fehlende genetische Information des Adenovirus muss in eine andere Zelllinie

integriert werden, die jetzt die adenoviralen Proteine *in trans* produziert. Werden diese Proteine überexprimiert, können sie für die jeweiligen Zellen toxisch sein, wodurch dieses Verfahren limitiert wird. Da Adenoviren basierend auf Serotyp Ad5 und Ad2 humanpathogen sind, besteht auch die Möglichkeit, dass deletierte Bestandteile der Adenoviren aufgrund früherer oder aktueller Infektionen als Fragmente in Zellen des menschlichen Organismus vorkommen und somit die Rekombination zu Wildtypviren möglich wird. Erst 1996 gelang es, wie in den Retroviren das gesamte Virusgenom durch therapeutische Gene zu ersetzen (Halbert et al. 1995). Hierdurch besteht mehr





**Abb. 10.21. a** Wildtyp-adenoassoziierte-Viren (AAV) enthalten die gesamte genetische Information für die Replikation und die Produktion von infektiösen Partikeln zwischen 2 ITR-Elementen. Zu diesen Genen gehören Kapsid- und Replikationsgene (*Cap*, *Rep*). Zur Replikation und Infektion wird ein Helferadenovirus benötigt. **b** Zur Produktion rekombinanter replikationsdefizienter AAV werden 2 Konstrukte hergestellt. Ein Konstrukt enthält das Transgen zwi-

schen den ITR-Sequenzen, das andere die Kapsid- und Replikationsgene unter der Kontrolle eines starken Promotors. Zur Produktion von infektiösen AAV-Partikeln werden wiederum Helferadenoviren benötigt. Die Verpackungszelllinie produziert infektiöse rekombinante AAV-Partikel und Helferadenoviren, die anschließend bei der therapeutischen Anwendung wieder getrennt werden müssen

Platz für therapeutische Gene und gleichzeitig eine Verringerung des Risikos durch Wildtypviren.

### 10.5.1.3 Adenoassoziierte Virusvektoren

Adenoassoziierte Viren (AAV) wurden bisher bei 36 Patienten im Rahmen von 3 Protokollen eingesetzt (Abb. 18). Sie erlauben wie Retroviren eine stabile Integration, verfügen aber über weniger Raum für ein therapeutisches Gen. Es handelt sich um ein kleines (4,7 kb), einzelsträngiges Parvovirus, das Adenoviren für seine Vermehrung benö-

tigt (Abb. 10.21). Somit ist es von vornherein replikationsdefizient und außerdem ohne bekannte Pathogenität. Wie die Genexpression nach adenoassoziiertem Gentransfer gezeigt hat, benötigt dieses Virus, im Gegensatz zu Retroviren, nicht die Replikation der Wirtszelle (Flotte et al. 1994, Halbert et al. 1995, Podsakoff et al. 1994). Während das nichtrekombinante Wildtypvirus eine stabile, locuspezifische Integration in Chromosom 19 bevorzugt, bleibt nach Entfernung des AAV-*rep*-Gens zwar die Integration erhalten, jedoch ohne Locuspezifität (Samulski et al. 1993). Etwa 70%

der Erwachsenen sind für AAV seropositiv. Insbesondere für Knochenmarkstammzellen konnte jedoch gezeigt werden, dass in diese trotz vorangegangener AAV-Infektion erfolgreich Gene mittels AAV transferiert werden konnten (Anderson et al. 1997). Ein Problem, das derzeit noch zu bewältigen ist, umfasst die Produktion großer Mengen von hochtitrigem Virus. Weiterhin wurden neben teilweiser Genintegration auch relativ hohe episodische Anteile des Vektors beobachtet (Flotte et al. 1995). Der Verlust der Locusspezifität bei der Integration durch das rekombinante AAV könnte zur Mutagenese führen, und schließlich ist die Insertion regulatorischer Elemente in das Virus durch seine geringe Größe erschwert.

#### 10.5.1.4 Neue virale Vektoren

Neben meist verwendeten, zwischenzeitlich weiterentwickelten viralen Vektoren werden klinisch vereinzelt neue Viren eingesetzt (Abb. 10.18). Dazu gehören Herpesviren (bisher kein Patient in einem genehmigten Protokoll) und Pockenviren (130 Patienten in 23 Protokollen), mit den hier umfassten Vacciniaviren, Canarypoxviren und Fowlpoxviren (Wiley 1998). Berichte liegen derzeit nur in Einzelfällen vor.

Das Herpes-simplex-Virus (HSV) könnte insbesondere bei der Behandlung von Erkrankungen des ZNS (z.B. Glioblastom und Morbus Parkinson) eine besondere Bedeutung erlangen, da es einen natürlichen Tropismus für Zellen des Zentralnervensystems hat und auch in der Lage ist, postmitotische Zellen wie Neuronen zu infizieren, und in einem latenten Stadium verharrren kann, in dem es über lange Zeit therapeutische Gene exprimieren kann, ohne selbst zu replizieren und somit pathogen zu sein. Weiterhin erlaubt sein großes Genom die Unterbringung großer oder auch mehrerer therapeutischer Gene. Nach der Infektion wird die Genexpression über die RNA-Polymerase II der Wirtszelle reguliert, und die elektrophysiologischen Eigenschaften des infizierten Neurons bleiben unverändert (als Übersicht Freese et al. 1996). Zur Behandlung von Glioblastomen könnte ein 2fach mutiertes HSV Bedeutung erlangen, das in Glioblastom- und anderen sich teilenden Zellen replikationskompetent ist und eine attenuierte Neurovirulenz, Temperatur- und Ganciclovirempfindlichkeit besitzt. Es ist in der Lage, Glioblastomzellen *in vitro* abzutöten und *in vivo* eine Tumorkleinerung herbeizuführen, wobei es nach intrazerebraler Inokkulation in tumorfreiem Gewebe avirulent ist (Mineta et al. 1995). Ein anderes Virus,

das für neurologische Erkrankungen Bedeutung erlangen könnte, ist das in Afrika bekannte Sinbis-Virus, das insbesondere das Nervensystem befällt (Herweijer et al. 1995).

Ebenfalls in präklinischer Testung sind Vektoren, die aus Hepatitisviren, hier insbesondere Deltaviren, zur Behandlung der Hepatitis B für die Verabreichung biologisch aktiver RNA (Hsieh und Taylor 1992) und Tollwutviren (Rabiesvirus aus der Familie der Rhabdoviren) (Mebatsion et al. 1996) entwickelt wurden. Als „Plasmoviren“ werden chimere Gentransfervektoren bezeichnet, die die Einfachheit von Plasmiden mit der Infektiosität und der lang andauernden Expression von Retroviren verbinden. Es wird erwartet, dass durch die Kombination der Vorteile beider Systeme große Mengen von klinisch verwendbarem Genmaterial produziert werden können, was eine effektive und sichere lokale Anwendung erlaubt (Noguzie-Hellin et al. 1996).

#### 10.5.1.5 Nichtvirale Vektoren

DNA kann auch „nackt“ oder kombiniert mit nichtviralen Helfern der Transfektion, allen voran die Liposomen (Abb. 10.22), appliziert werden (728 Patienten in 72 Protokollen) (European Working Group of Gene Therapy 1996, Wiley 1998).

Liposomen erlauben eine verbesserte Transfer-effizienz überwiegend durch Endozytose (Zabner et al. 1995) (Abb. 10.23). Die Transfektionseffizienz war bisher zwar, verglichen mit dem viralen Transfer, nur gering, aber aufgrund der Sicherheit der Anwendung von Liposomen besteht weiter Interesse an ihrer Verwendung. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass weder Autoimmunität durch Liposomen noch ein Transfer der therapeutischen Gene in andere Organe einschließlich Gonaden erfolgte (Nabel et al. 1992a, Nikol et al. 1999, Huehns et al. 1999). Durch die Weiterentwicklung der Liposomen werden Verbesserungen erwartet (als Übersicht Chonn 1995). Liposomen können auch in Kombination mit anderen Therapien eingesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass Cisplatin bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms nicht nur als Chemotherapeutikum wirkt, sondern auch die Sensitivität und damit die Effizienz für den liposomalen Gentransfer erhöht (Son et al. 1994).

Neben Liposomen stehen auch mechanische Methoden wie die Elektroporation und die Zellkompression durch mikroskopische Glaskugeln sowie der Beschuss mit beschichteten Partikeln zur

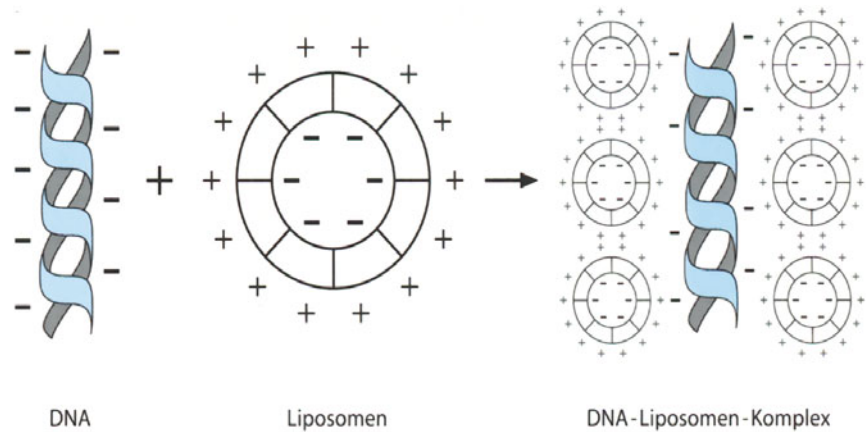


Abb. 10.22. Liposomen sind künstliche Lipiddoppelschichten, die DNA binden können und somit in der Lage sind, Nukleinsäuren in das Zytosol zu transportieren. Die am

häufigsten verwendeten Lipidpräparationen besitzen positive Ladungen, die an die negativ geladene DNA binden und so Liposomen-DNA-Komplexe bilden

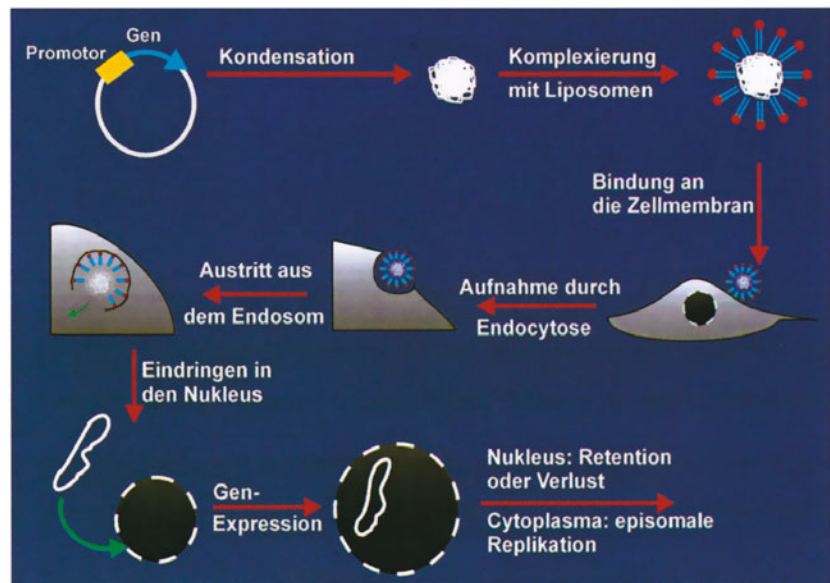


Abb. 10.23. Prinzip des liposomalen Gentransfers: Kondensierung und anschließende Komplexierung der DNA-Plasmide. Hierdurch ist eine Anbindung und anschließende Endozytose durch die Zellmembran möglich. Innerhalb der Zelle bildet sich ein Endosom, aus dem die cDNA freigesetzt

wird. Für eine erfolgreiche Genexpression muss die DNA in den Zellkern eindringen. Im Lauf der Zeit verlieren Nucleus und Zelle das Plasmid wieder. Kommt es davor zur Zellreplikation, kann auch die Plasmid-DNA episomal replizieren

Verfügung (*gene gun*) (Rakhmilevich et al. 1996, Woffendin et al. 1996). Bestimmte Organe wie Lunge, Leber und Endothelium sowie Gewebe wie Muskeln, Haut oder oberflächliche Tumormassen, die durch direkte interstitielle Injektionen leicht erreicht werden können, sind für die nichtvirale Gentherapie besonders attraktiv (als Übersicht Ledley et al. 1995). Auch hier können induzierbare Promotoren zur zusätzlichen Sicherheit beitragen (Lang et al. 1996).

### 10.5.2 Lokale Applikation

Mit der Tendenz vom technisch aufwendigen Ex-vivo- zum einfacheren In-vivo-Gentransfer rückte auch die Entwicklung von lokalen Applikationsmethoden in den Vordergrund. Da die Direktinjektion von genetischem Material oder virusproduzierenden Zellen in die Zielorgane nicht immer möglich ist, wurden diverse, v.a. perkutane, transluminale Methoden mittels spezieller Katheter entwickelt (Abb. 10.24). Sie erlauben die Verabreichung

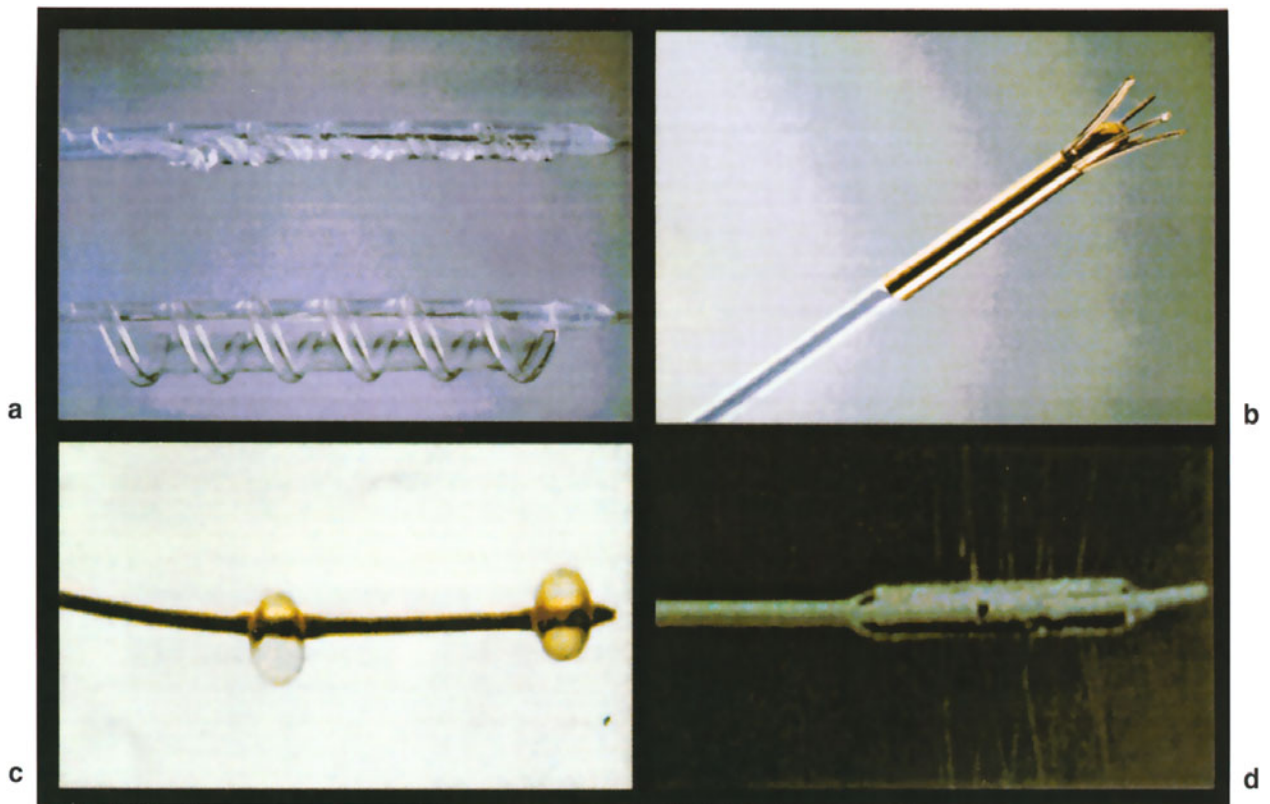


Abb. 10.24 a–d. Verschiedene lokale Applikationskatheter aus dem kardiovaskulären Bereich: a Doppelballonkatheter,

b Dispatch-Katheter mit mehreren spiralig angeordneten Kammern, c poröser Ballon, d Nadelinjektionskatheter

in fast alle innere Organe und Blutgefäße einschließlich der Koronarien. Diese Katheter wurden v. a. für den kardiovaskulären Gebrauch entwickelt. Aber auch bei der Tumorbehandlung wurde bereits die lokale Behandlung mittels eines speziellen Katheters berichtet, wobei das Gen zur Behandlung einer entfernt gelegenen Melanometastase über die Pulmonalgefäße appliziert wurde (Nabel et al. 1994a). In einer 2. Phase-I-Studie wird derzeit der regelmäßige Einsatz von Kathetern zur Genapplikation in die Mikrozirkulation von Tumoren getestet (Nabel et al. 1995).

Ein ganz anderer Weg der lokalen, nichtinvasiven Genapplikation wurde unter der Verwendung von transfizierten Spermien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auf diesem Weg bestimmte Genpartikel in Präimplantationsembryonen transferiert werden konnten (Chan et al. 1995). Dieser Umstand könnte therapeutisch zur frühen Korrektur von Genen ausgenutzt werden, weist aber auch die potenziell problematische Möglichkeit der nichtbeabsichtigten Übertragung viraler oder bakterieller DNA in das sich entwickelnde Embryo via Spermien auf.

### 10.5.3 Neue Target-Gene

Es besteht die Möglichkeit, Gene zu transferieren, durch die defekte oder nicht vorhandene Gene ersetzt oder ergänzt werden, und zusätzliche, körperfremde Gene einzubringen, deren Proteine therapeutische Funktionen übernehmen. Daneben kann aber auch die Expression bestimmter körpereigener Gene gezielt gehemmt werden. Hierfür werden v. a. Antisense-RNA bzw. -DNA (Stein und Cheng 1993), Ribozyme (katalytische RNA) (Barinaga et al. 1993) und Triplex-DNA verwendet (als Übersichten Scanlon et al. 1995 und Rossi et al. 1995). Durch diese Verfahren kommt es zu einer Expressionshemmung durch Bindung von RNA, was zur Blockierung der Translation in Protein führt.

Vieldiskutiert und experimentell weit verbreitet ist der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden. Es handelt sich um künstliche DNA-Sequenzen mit einer Länge von meist 15–30 Nukleotiden, die hierzu komplementäre, reverse RNA spezifisch hemmen sollen. Für eine zuverlässige therapeutische Wirkung wurden mehrere Bedingungen gefordert: die einfache Massenproduktion, die Stabi-

lität *in vivo*, die Fähigkeit, in Zielzellen einzudringen, die Retention in der Zielzelle und die Fähigkeit zur Interaktion mit der Zielzelle ohne in Bezug auf die Sequenz unspezifische Interaktionsweisen (Stein und Cheng 1993). Leider erwies es sich, dass *in vivo* insbesondere 2 Bedingungen kaum verbessert werden können: Die Instabilität der Oligonukleotide und unspezifische Wirkweisen, insbesondere immunologischer Art (Halpern und Pitsetsky 1995). Dennoch haben auch Antisense-Oligonukleotide Eingang in die klinische Genterapie gefunden. Durch den Transfer von Oligonukleotiden gegen das Protoonkogen *c-myc* sollen chronisch-myeloische Leukämiezellen aus Knochenmarkproben eliminiert werden, die für die autologe Knochenmarktransplantation verwendet werden sollen (Hijiya et al. 1994). Auch zur Prävention der Restenose nach Ballonangioplastie werden derzeit klinisch Antisense-Oligonukleotide gegen ein weiteres Protoonkogen, *c-myc*, getestet (Kutryk et al. 1997). Problematisch sind jedoch weiterhin ihre Toxizität, die geringe Spezifität, Stabilität und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sowie unspezifische immunologische Reaktionen.

Ribozyme haben insbesondere bei der Behandlung von Aids Verwendung gefunden (Barinaga et al. 1993). Ribozyme sind RNA-Moleküle mit enzymatischer Aktivität (Endoribonukleasen), die nach Bindung an komplementäre Nukleinsäureketten durch ein Zerschneiden dieser Ketten die katalytische Degradation bewirken.

Durch das zunehmend bessere Verständnis pathogenetischer Zusammenhänge werden insbesondere bei komplexen Erkrankungen mit multifaktoriellen Ursachen bzw. Krankheitsbeeinflussungen, wie z.B. bei den Tumorerkrankungen und der Arteriosklerose, immer wieder neue und interessante Wirkstoffe charakterisiert. Die Kenntnis einiger Substanzen führte auch zur Entwicklung neuer genterapeutischer Strategien.

### 10.5.3.1 Antiangiogenese

Es wurde beobachtet, dass gerade Tumoren und arteriosklerotische Plaques von einer persistierenden, unregelmäßigen Gefäßneubildung gekennzeichnet sind. Die verantwortlichen Faktoren wurden inzwischen weitgehend charakterisiert (als Übersicht Schweigerer et al. 1995). Es ist jetzt allgemein akzeptiert, dass es über mindestens 2, wahrscheinlich jedoch eher noch mehr Mutationen zur Tumorenstehung kommt, die wiederum zur Aktivierung von Onkogenen und/oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Da wahr-

scheinlich mehrere dieser Gene gleichzeitig repariert werden müssten, wurde als neue Therapiestrategie die Antiangiogenese entwickelt, bei der der komplexe genetische Ursprung der Erkrankung keine Einschränkung darstellt (Fujiwara et al. 1994). Neuerdings wurden neben eher „konservativen“ (als Übersicht s. Burrows et al. 1994) auch einige genterapeutische Strategien entwickelt.

Durch die mutationsbedingte Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 kommt es z.B. in Glioblastomzellen zu einer starken angiogenetischen Aktivität. Zellen, die Wildtyp-p53 exprimieren, sezernieren dagegen einen Faktor, der diese starke angiogenetische Aktivität von Tumorzellen neutralisieren kann (van Meir et al. 1994). Einer dieser Angiogeneseinhibitoren, deren Expression von Wildtyp-p53 stimuliert wird, ist Thrombospondin-1 (Dameron et al. 1994).

VEGF ist einer der von Tumoren gebildeten angiogenetischen Faktoren. Die Wirkung ist von der Expression seines zugehörigen und ausschließlich auf Endothelzellen vorhandenen Rezeptors Flk-1 abhängig. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Transduktion mit einer Flk-1-dominant-negativen Mutante zu einer Verhinderung von Tumorwachstum führte. Hieraus könnten sich neue klinische Therapieansätze ergeben (Millaer et al. 1994).

Bei den pädiatrischen Tumoren ist der Ursprung zwar häufig im Gegensatz zu adulten Tumoren nur monogenetisch oder allenfalls oligogenetisch (Malkin et al. 1994), hier stellen jedoch das schnelle Tumorwachstum und die frühe hämatogene Metastasierung ein großes Problem dar, dessen Voraussetzung eine verstärkte Vaskularisierung ist, was ebenfalls eine antiangiogenetische Strategie nahe legt.

**Genterapie.** Neben der Gabe von antiangiogenetischen Proteinen besteht auch die Möglichkeit der Genterapie. Das Tumorsuppressorgen p53 z.B. steigert die Expression des antiangiogenetischen Thrombospondins (Dameron et al. 1994) und des *Glioma-derived angiogenesis inhibitory factor* (van Meir et al. 1994), während es die Expression des angiogenetischen Moleküls bFGF inhibiert (Ueba et al. 1994).

### 10.5.3.2 Thrombose

Das normale hämostatische System begrenzt den Blutverlust unter genau geregelten Interaktionen zwischen Komponenten der Gefäßwand, zirkulierenden Blutplättchen und Plasmaproteinen. Eine

ungeregelte Aktivierung des hämostatischen Systems dagegen kann zur Thrombose und zu Embolien führen, die schließlich den Blutfluss zu kritischen Organen wie Gehirn und Myokard unterbrechen können. Es konnten bestimmte Personengruppen identifiziert werden, die ein besonderes Thrombose- und Embolierisiko haben:

- nach Operationen immobilisierte Patienten,
- Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz,
- Patienten mit arteriosklerotischer Gefäßerkrankung,
- Tumorpatienten oder
- Schwangere.

Die meisten dieser Personen haben jedoch keine identifizierbare Störung der Hämostase, bis auf bestimmte Patienten mit angeborenen oder erworbenen hyperkoagulativen oder präthrombotischen Störungen, die eine Disposition für rezidivierende Thrombosen darstellen. Hierzu gehören u. a.

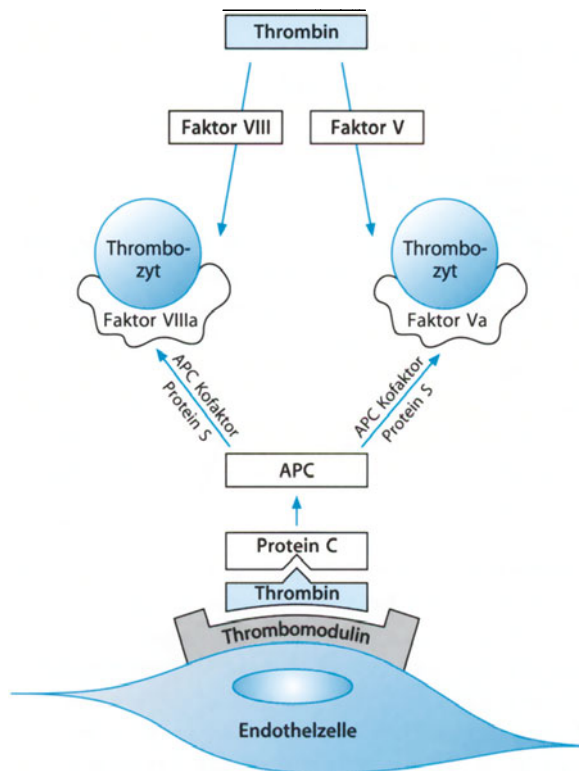


Abb. 10.25. Protein-C-abhängige antikoagulante Wirkung: Thrombin konvertiert *Faktor VIII* und *Faktor V* in ihre aktivierten Formen *Faktor VIIIa* und *Faktor Va*. Ein Komplex aus Thrombin und dem Thrombomodulin für den Endothelzellrezeptor aktiviert Protein C. Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert *Faktor VIIIa* und *Faktor Va* auf der Plättchenoberfläche, wobei diese Reaktion durch APC-Kofaktor und freies *Protein C* beschleunigt wird. Ein mutierter *Faktor Va* kann durch APC nicht inaktiviert werden, modifiziert nach Bauer (1994)

Thrombozytose, Mangel an Antithrombin III, Protein C und Protein S, Resistenz gegen aktiviertes Protein C aufgrund einer Mutation des Faktors V (Faktor V Leiden) (Abb. 10.25) und die Hyperfibrinogenämie.

Wenn ein definitiver Thrombus gebildet worden ist, beginnen sofort die Thrombolyse und die Gefäßreparatur. Es gibt 3 Hauptaktivatoren der Fibrinolyse:

1. Fragmente des Hagemann-Faktors,
2. Urokinase und
3. t-PA,

wobei Endothelzellen wiederum Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) freisetzen, der die Aktion von t-PA hemmt (Abb. 10.26).

Thrombose und Fibrinolyse sind genau geregelt, sodass jeweils nur geringe Mengen der beteiligten Enzyme in ihre aktive Form konvertiert werden.

**Gentherapie.** Ein interessanter Ansatz könnte die Einführung des Gens für den humanen t-PA sein, um längerfristig thrombotische Komplikationen bei Gefäßerkrankungen einschließlich der Plaqueruptur im Präinfarktstadium bzw. nach Gefäßinterventionen oder Operationen zu verhindern. Ein signifikanter Anstieg der t-PA-Aktivität nach retroviralem Transfer des Gens in humane Endothelzellen konnte bereits gezeigt werden (Ekhterae und Stanley 1995). Eine der wichtigsten Limitationen dieses Vorgehens ist jedoch die Inaktivierung von rekombinantem t-PA durch die Bindung von t-PA-Molekülen an den PAI-1. Unter Verwendung einer einzelsträngigen DNA für Urokinase ist es gelungen, dieses Problem zu umgehen (Lee et al. 1992, 1993).

### 10.5.3.3 Diabetes mellitus

Es gibt 2 Formen des Diabetes mellitus, den Typ-1- oder insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) und den Typ-2- oder nichtinsulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM). Beim IDDM handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung mit Infiltration der Langerhans-Inseln mit aktivierten T-Zellen, wodurch es zur kompletten Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen kommt. Als Ursachen gibt es Hinweise für virale und genetische Komponenten dieser Erkrankungen. Die Patienten sind abhängig von täglichen Insulininjektionen. Der NIDDM ist etwa 10-mal so häufig wie der IDDM (3% vs. 0,3% Inzidenz). Es handelt sich um eine relativ heterogene Störung mit einer gestörten Insulinwirkung und B-Zell-Funktion. Mit dem

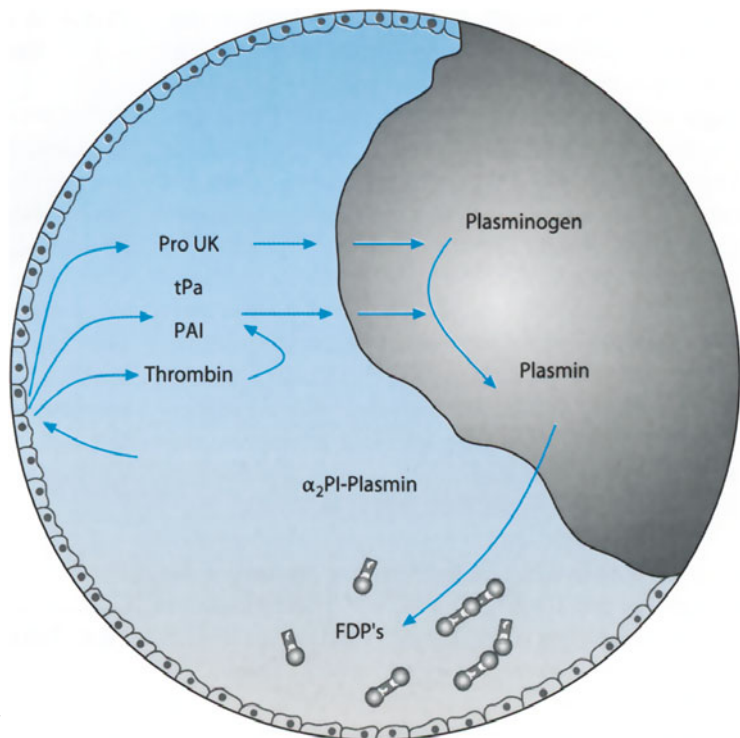


Abb. 10.26. Schema des fibrinolytischen Stoffwechsels, modifiziert nach Harrison (1994)

NIDDM sind genetische Faktoren und mangelhafte Ernährung *in utero*, im Alter v.a. Übergewicht und Bewegungsmangel assoziiert. Häufig sind zunächst Diät und körperliche Betätigung zur Normalisierung des Zuckerspiegels ausreichend, viele Patienten benötigen jedoch zusätzlich eine medikamentöse Therapie zur Stimulation der B-Zell-Aktivität oder Verstärkung der Insulinwirkung, bis schließlich die Gabe von Insulin selbst notwendig wird.

**Gentherapie.** Für die potenzielle gentherapeutische Behandlung des Diabetes mellitus stehen 2 verschiedene Strategien kurz vor der klinischen Anwendung:

1. der Ex-vivo-Transfer in verschiedene, implantierbare Zelllinien und
2. der direkte In-vivo-Transfer des Insulingens (Docherty et al. 1997).

Ex vivo transfizierte B-Zellen und Inselstammzellen haben den Vorteil, dass sie den Blutglukose Spiegel wahrnehmen können und somit eine physiologische Regulation der Insulinsekretion möglich ist. Nachteilig ist, dass insbesondere beim Typ-I-Diabetes die gleichen immunologischen Mechanismen, die die Krankheit herbeigeführt haben, durch Antikörper auch zur Zerstörung der implantierten Zellen führen können. Dies ist bei transfizierten Nicht-B-Zelllinien zwar nicht der Fall, da-

für fehlt hier die lebenswichtige Regulation, sodass diese Zellen nur für die Erhaltung eines Basisinsulinspiegels verwendet werden können. Alternativ kann das Gen auch direkt appliziert werden, was technisch einfacher ist, jedoch kaum eine Kontrolle der Genexpression ermöglicht. Insulin ist ein potenziell letales Protein mit einer geringen therapeutischen Breite, das in hohen Dosierungen Hypoglykämien und Tod verursachen kann. Die Entwicklung der Gentherapie für die Behandlung des Diabetes mellitus unterscheidet sich deshalb erheblich von den Strategien zur Behandlung der oben erwähnten Erkrankungen, da hier rekombinantes Insulin zur relativ erprobten regelmäßigen Applikation zur Verfügung steht, sodass der Nutzen durch die Gentherapie in diesem Fall gegenüber den Risiken relativ gering ist. Jede Form von Gentherapie, die zur Expression von exogenem Insulin führt, muss reversibel sein, sodass im Fall von zu hohen Insulinspiegeln das jeweilige Implantat wieder entfernt werden kann. Dies ist im Fall eines direkten, systemischen Gentransfers sicher schwerer zu gewährleisten als nach der Implantation von ex vivo transfizierten Zellen.

#### 10.5.3.4 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung, die allein in den USA >1

Mio. Patienten betrifft. Die pathologischen Veränderungen umfassen einen 60- bis 80%igen Verlust von dopaminergen Zellen innerhalb der Substantia nigra und eine Dopamininnervation des Striatums. Die Mehrheit der Patienten sind nach 5–10 Jahren Therapie nur unzureichend behandelt. Dies hat zur Einführung von alternativen, rekonstruktiven Therapiestrategien, einschließlich der Transplantation von fetalem Gewebe geführt. Trotz neuraler Transplantation kam es jedoch nur zu einer partiellen Verbesserung, sodass die Patienten oft erheblich behindert blieben. Die Frage der Immunsuppression ist noch nicht geklärt, das erforderliche Gewebe ist nur eingeschränkt verfügbar, zumal für jeden Patienten multiple Spender notwendig sind (als Übersicht Freeman et al. 1997).

Deshalb wurde zur Therapie des Morbus Parkinson anstelle der Behandlung mit fetalem Striatumgewebe als Dopaminquelle die Transplantation von transfizierten, dopaminexprimierenden Zellen vorgeschlagen (Freeman et al. 1997). Durch die Verwendung von migrationsfähigen Zellen soll dabei mehr Einfluss als durch immobile Transplantate erreicht werden.

**Gentherapie.** Auch hier befindet sich die Gentherapie an der Schwelle der klinischen Erprobung, wobei sie mit geeigneten, modifizierten chirurgischen Techniken, einschließlich stereotaktischer Applikation kombiniert werden muss. Es stehen eine Ex-vivo-Therapie und die direkte Applikation zur Verfügung. Alternativ zur Transfektion von Enzymen, die die Biosynthese von Dopamin kontrollieren, wird auch die Verwendung von Wachstumsfaktoren, so genannten neurotrophischen Faktoren, erprobt, die die nigrostriatale Degeneration von Neuronen verhindern oder die Regeneration begünstigen sollen (Freese et al. 1996, Redmond 1997). Ein bisher ungeklärter, spezifischer genetischer Defekt wird noch als Ursache für möglich gehalten und würde eine noch gezieltere Therapie erlauben. Probleme in den präklinischen Testungen umfassen v.a. Applikationstechniken, Immunantworten und Zytotoxizität sowie die mangelnde Expressionsregulation (als Review Freese et al. 1996). Neben Adenovirus und adenoassoziiertem Virus könnte deshalb das HSV hier besondere Bedeutung erlangen.

### 10.5.4 In-vivo-Imaging der Expression transferierter Gene

Bisher wurden in 169 Patienten im Rahmen von 33 Protokollen Markergene eingesetzt, um durch die Kennzeichnung von Tumorzellen die Ausdehnung und Metastasierung von Tumoren erkennen zu können (Wiley 1998). Es wird erwartet, dass durch klinisch etablierte bildgebende Verfahren langfristig auch solche Markersubstanzen, z.B. durch Radioaktivität, sichtbar gemacht werden können. Hierdurch könnten in Patienten nicht nur In-vivo-Tumorgewebe, sondern auch der Erfolg einer Gentherapie dargestellt und kontrolliert werden (Tjuvajev et al. 1995).

## 10.6 Zukunftsperspektive

Ein desillusionierendes Ergebnis vieler Gentherapiestudien ist leider die Beobachtung, dass die derzeitigen Mittel und Techniken für den therapeutischen Gentransfer und die Genexpression inadäquat sind (Crystal 1995, Motulski und Orkin 1995, Touchette 1996, Friedmann 1996). Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie wird es sein, das richtige Gen im maximal effizienten und sicheren Vektor in Target-Gewebe einzubringen, z.B. unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors, durch receptorspezifische Liganden und/oder lokal durch einen optimierten Applikationskatheter. Neben der Entwicklung effizienter, nicht toxischer Vektoren, müssen die physiologischen Defekte der Zellen, die für die Pathophysiologie der einzelnen Erkrankungen verantwortlich sind, besser verstanden werden, um auch die geeigneten therapeutischen Gene auswählen zu können. Soll ein bestimmtes Organ behandelt werden, wird es am Ende nicht genügen, nur Gene dorthin einzubringen. Vielmehr muss die spezielle Zellunterart herausgefunden werden, die in dem jeweiligen Organ behandelt werden muss. Ultimatives Ziel muss es sein, ein Maximum an Effektivität und Sicherheit für die Therapie zu erreichen.

Keines der geschilderten Probleme des Gentransfers erscheint unlösbar, es braucht allerdings mehr Zeit als ursprünglich angenommen. Erschwerend ist, dass Ergebnisse aus Tierexperimenten nicht immer auf den Menschen übertragbar sind, sodass auch hier noch mit Misserfolgen gerechnet werden muss. Auch wenn sich die Gentherapie derzeit noch in den Kinderschuhen befindet,



basiert sie auf einer Reihe von soliden wissenschaftlichen Grundlagen; die bisher unzureichenden klinischen Erfolge reflektieren nur das Anfangsstadium einer neuen Therapieform. Die logischen Zusammenhänge, die dem Prinzip des Gentransfers zugrunde liegen, sind verlockend und in Kombination mit dem 1990 initiierten Humangenomprojekt, das zur Aufdeckung aller 3 Mio. Basenpaare, die die etwa 100 000 menschlichen Gene enkodieren, führen wird, ergibt sich ein enormes Potential für innovative Therapien und das zunehmende Verständnis für die menschliche Biologie. Bis zum Ende des Jahrtausends sollen bereits mehr als 90% der menschlichen Gene bekannt sein. DNA als Medikament ist bereits Wirklichkeit, seine Möglichkeiten sind bisher jedoch nicht ausgeschöpft.

## 10.7 Literatur

- Aebischer P, Schluep M, Deglon N et al. (1996) Erratum: Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. (*Nat Med* (1996) 2:696–699). *Nat Med* 2:1041
- Albelda SM (1997) Gene therapy for lung cancer and mesothelioma. *Chest* [Suppl 6] 111:144S–149S
- Anderson RJ, Galatowicz G, Macdonald ID, Lowdell MW, Corbett TJ, Prentice HG (1997) Detection of adeno associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells. *Exp Hematol* 25:256–262
- Barinaga M (1993) Ribozymes: killing the messenger. *Science* 262:1512–1514
- Barnes MN, Dshane JS, Rosenfeld M, Siegal BG, Curiel DT, Alvarez RD (1997) Gene therapy and ovarian cancer: a review. *Obstet Gynecol* 89:145–155
- Bauer KA (1994) Hypercoagulability – A new cofactor in the protein C anticoagulant pathway. *N Engl J Med* 330:566–567
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al. (1998) Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97:1114–1123
- Belli F, Arienti F, Sulesuso J et al. (1997) Active immunization of metastatic melanoma patients with interleukin 2 transduced allogeneic melanoma cells: evaluation of efficacy and tolerability. *Cancer Immunol Immunother* 44:197–203
- Bellon G, Michelcalemard L, Thouvenot D et al. (1997) Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 8:15–25
- Blaese RM, Anderson WF, Culver KW, Rosenberg SA (1990) The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther* 1:327–362
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475–480
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S et al. (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276:1719–1724
- Bordignon C, Bonini C, Verzeletti S et al. (1995a) Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Gene Ther* 6:813–819
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N et al. (1995b) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 270:470–475
- Boucher RC, Knowles MR, Johnson LG et al. (1994) Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity. The University of North Carolina at Chapel Hill. *Hum Gene Ther* 5:615–639
- Buchsacher GJ, Panganiban AT (1992) Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes. *J Virol* 66:2731–2739
- Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP et al. (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666–669
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033–8037
- Burrows FJ, Thorpe PE (1994) Vascular targeting – a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol Ther* 64:155–174
- Burt K, Chema D, Timmons T (1997) Tracing the dissemination of adenoviral vectors in patient body fluids (abstract). *J Mol Med* [Suppl 5] 75:B28(86)
- Calarota S, Bratt G, Nordlund S et al. (1998) Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* 351:1320–1325
- Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG et al. (1995) Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1:39–46
- Chan PJ, Kalugdan T, Su BC et al. (1995) Sperm as a noninvasive gene delivery system for preimplantation embryos. *Fertil Steril* 63:1121–1124
- Chang MW, Barr E, Min-Min-Lu, Barton K, Leiden JM (1995a) Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 96:2260–2268
- Chang MW, Barr E, Seltzer J et al. (1995b) Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of retinoblastoma gene product. *Science* 267:518–522
- Chonn A, Cullis PR (1995) Recent advances in liposomal drug-delivery systems. *Curr Opin Biotechnol* 6:698–708
- Conry RM, LoBuglio AF, Curiel DT (1996) Polynucleotide-mediated immunization therapy of cancer. *Semin Oncol* 23:135–147
- Cornetta K, Srour EF, Moore A et al. (1996) Retroviral gene transfer in autologous bone marrow transplantation for adult acute leukemia. *Hum Gene Ther* 7:1323–1329
- Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270:404–410
- Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA et al. (1994) Administration of an adenovirus containing the human

- CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 8:42-51
- Crystal RG, Jaffe A, Brody S et al. (1995) A phase 1 study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum Gene Ther* 6:643-666
- Culver KW, Blaese RM (1994) Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 10:174-178
- Culver KW, Osborne WR, Miller AD et al. (1991a) Correction of ADA deficiency in human T lymphocytes using retroviral-mediated gene transfer. *Transplant Proc* 23:170-171
- Culver KW, Anderson WF, Blaese RM (1991b) Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther* 2:107-109
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265:1582-1584
- Davidson A, Morey S, Musk AW et al. (1997) Gene therapy or therapy by intratumoral cytokines by infusion in mesothelioma patients. *Lung Cancer [Suppl 2]* 18:94
- Deisseroth AB, Kavanagh J, Champlin R (1994) Clinical protocol: use of safety-modified retroviruses to introduce chemotherapy resistance sequences into normal hematopoietic cells for chemoprotection during the therapy of ovarian cancer: a pilot trial. *Hum Gene Ther* 5:1507-1522
- Deshane J, Siegal GP, Wang MH et al. (1997) Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti ErbB 2 intracellular single chain antibody for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol* 64:378-385
- Dichek DA, Neville RF, Zwiebel JA, Freeman SM, Leon MB, Anderson WF (1989) Seeding of intravascular stents with genetically engineered endothelial cells. *Circulation* 80:1347-1353
- Docherty K (1997) Gene therapy for diabetes mellitus. *Clin Sci* 92:321-330
- Dube ID, Cournoyer D, (1995) Gene therapy: here to stay. *Can Med Assoc J* 152:1605-1613
- Dunbar C, Kohn D, Karlsson S et al. (1996) Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 7:231-253
- During M (1996a) Gene therapy chronology. *Science* 273:416-417
- During MJ (1996b) Gene trial in New Zealand. *Lancet* 348:618
- Ekhterae D, Stanley JC (1995) Retroviral vector-mediated transfer and expression of human tissue plasminogen activator gene in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 21:953-962
- Engel BC, Laws HJ, Buttlies B, Kahn T, Gobel U, Burdach SEG (1998) Induction of a CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> lymphocyte population following gene therapy with transgenic IL-2 secreting fibroblasts in a child with peripheral neuroectodermal malignancy. *Med Pediatr Oncol* 31:56-60
- Essex M, Matsuda Z, Yu X, Lee TH (1995) Gene therapy against retroviral diseases. *Leukemia* 9:71-74
- European Working Group of Gene Therapy E (1996) Newsletter No. 5
- Evans CH, Mankin HJ, Ferguson AB Jr et al. (1996) Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 7:1261-1306
- Feldman LJ, Isner JM (1995) Gene therapy for the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 26:826-835
- Fenton RT, Sznol M, Luster DG, Taub DD, Longo DL (1995) A phase I trial of B7-transfected or parental lethally irradiated allogeneic melanoma cell lines to induce cell-mediated immunity against tumor-associated antigen presented by HLA-A2 or HLA-A1 in patients with stage IV melanoma. NCI protocol T93-0161. BRMP protocol 9401. *Hum Gene Ther* 6:87-106
- Flotte TR, Afione SA, Zeitlin PL (1994) Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:517-521
- Flotte TR, Conrad C, Reynolds TZ (1995) Preclinical evaluation of AAV vectors expressing the human CFTR cDNA (abstract). *J Cell Biochem [Suppl 21A]* 364:C366-112
- Flotte TR, Carter B, Conrad C et al. (1996) A phase 1 study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 7:1145-1159
- Flügel RM (1991) Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 4:739-750
- Freeman TB (1997) From transplants to gene therapy for Parkinsons disease. *Exp Neurol* 144:47-50
- Freeman SM, McCune MC, Robinson E (1992) Treatment of ovarian cancer using HSV-TK gene-modified vaccine. *Hum Gene Ther* 3:342
- Freese A, Stern M, Kaplitt MG et al. (1996) Prospects for gene therapy in Parkinsons disease. *Mov Disord* 11:469-488
- Friedmann T (1996) Human gene therapy - an immature genie, but certainly out of the bottle. *Nat Med* 2:144-147
- Fujiwara T, Grimm EA, Roth JA (1994) Gene therapeutics and gene therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 6:96-105
- Gahery-Segard H, Molinier-Frenkel V, Le Boulaire C et al. (1997) Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study of the immune responses to transgene and viral products. *J Clin Invest* 100:2218-2226
- Galpin JE, Casciato DA, Richards SB (1994) A phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (TAF) (HIV-1IIIIBenv-transduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *Hum Gene Ther* 5:997-1017
- Gänsbacher B, Notzer R, Houghton A et al. (1992) A pilot study of immunization with interleukin-2 secreting allogeneic HLA-A2 matched renal cell carcinoma cells in patients with advanced renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 3:691-703
- Gänsbacher B, Rosenthal FM, Zier K (1993) Retroviral vector-mediated cytokine-gene transfer into tumor cells. *Cancer Invest* 11:345-354
- Gill DR, Southern KW, Mofford KA et al. (1997) A placebo controlled study of liposome mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4:199-209
- Ginsberg HS (ed) (1984) *The adenoviruses*. Plenum Press, New York
- Greene WC (1991) The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 324:308-317

- Grossman M, Raper SE, Kozarsky K et al. (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6:335-341
- Grossman M, Rader DJ, Muller DW et al. (1995) A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1:1148-1154
- Günzburg WH, Salmons B (1992) Factors controlling the expression of mouse mammary tumour virus. *Biochem J* 283:625-632
- Günzburg WH, Salmons B (1995) Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1:410-417
- Habib NA, Ding SE, El-Masry R et al. (1996) Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev* 20:103-107
- Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM, Miller HD (1995) Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *Virology* 69:1473-1479
- Halpern MD, Pisetsky DS (1995) In vitro inhibition of murine IFN gamma production by phosphorothioate deoxyguanosine oligomers. *Immunopharmacology* 29:47-52
- Harris JD, Lemoine NR (1996) Strategies for targeted gene therapy. *Trends Genet* 12:400-405
- Harrison's principles of internal medicine, 13th edn (1994) McGraw-Hill, New York
- Hatzoglou M, Lamers W, Bosch F, Wynshaw BA, Clapp DW, Hanson RW (1990) Hepatic gene transfer in animals using retroviruses containing the promoter from the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 265:17285-17293
- Haubrich R, McCutchan JA, Holdredge R, Heiner L, Merritt J, Merchant B (1995) An open label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1(IIIB)(env/rev) retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther* 6:941-955
- Hay JG, McElvaney NG, Herena J, Crystal RG (1995) Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 6:1487-1496
- Herrman JPR, Hermans WR, Vos J, Serruys PW (1993) Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (Part I). *Drugs* 46:18-52
- Herweijer H, Latendresse JS, Williams P et al. (1995) A plasmid-based self-amplifying sindbis virus vector. *Hum Gene Ther* 6:1161-1167
- Hesdorffer C, Antman K, Bank A, Fetell M, Mears G, Begg M (1994) Clinical protocol: human MDR gene transfer in patients with advanced cancer. *Hum Gene Ther* 5:1151-1160
- Hesdorffer C, Ayello J, Ward M et al. (1998) Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 16:165-172
- Hijiya N, Zhang J, Ratajczak MZ et al. (1994) Biologic and therapeutic significance of MYB expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4499-4503
- Hoogerbrugge PM, von Beusechem VW, Kaptein LC, Einerhand MP, Valerio D (1995) Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Br Med Bull* 51:72-81
- Hoogerbrugge PM, Van Beusechem VW, Fischer A et al. (1996) Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 3:179-183
- Horowitz MS (1990) Adenoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology*. Raven Press, New York, pp 1679-1740
- Hsieh SY, Taylor J (1992) Delta virus as a vector for the delivery of biologically-active RNAs: possibly a ribozyme specific for chronic hepatitis B virus infection. *Adv Exp Med Biol* 312:125-128
- Huebner RJ, Rowe WP, Ward TG et al. (1954) Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. *N Engl J Med* 251:1077-1086
- Huehns TY, Krausz E, Mrochen S et al. (1999) Neointimal growth can be influenced by local adventitial gene manipulation via a needle injection catheter. *Atherosclerosis* 144:135-150
- Hui KM, Ang PT, Huang L, Tay SK (1997) Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 4:783-790
- Isner JM (1998) Arterial gene transfer of naked DNA for therapeutic angiogenesis: early clinical results. *Adv Drug Deliv Rev* 30:185-197
- Isner JM, Walsh K, Symes J et al. (1995) Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 91:2687-2692
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al. (1996a) Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patients with ischaemic limb. *Lancet* 348:370-374
- Isner JM, Walsh K, Symes J et al. (1996b) Clinical protocol: arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther* 7:959-988
- Isner JM, Walsh K, Rosenfield K et al. (1996c) Arterial gene therapy for restenosis. *Hum Gene Ther* 7:989-1011
- Izquierdo M, Cortes ML, Martin V et al. (1997) Gene therapy in brain tumours: implications of the size of glioblastoma on its curability. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 68:111-117
- Jantschkeff P, Bongartz G, Dietrich PY et al. (1997) Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 75:B31
- Juengst ET (1995) Prevention and the goals of genetic medicine. *Hum Gene Ther* 6:1595-1605
- Kalle C von, Kiem HP, Goehle S et al. (1994) Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* 84:2890-2897
- Kircheis R, Kichler A, Wallner G et al. (1997) Coupling of cell binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4:409-418
- Knowles MR, Hohnaker KW, Zhou Z et al. (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 333:823-831
- Kohn D, Weinberg KI, Parkman P et al. (1993) Gene therapy for neonates with ADA-deficient SCID by retroviral-mediated transfer of the human ADA cDNA into umbilical cord CD34<sup>+</sup> cells. *Blood [Suppl 1]* 82:315a
- Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA et al. (1995) Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1:1017-1023
- Kohn DB, Hershfield MS, Corbonaro D et al. (1998) T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after

- transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4:775-780
- Kutryk MJB, Groot MR de, Brand M van den et al. (1997) Feasibility of the local delivery of antisense oligonucleotide against *c-myc* for the prevention of in-stent restenosis: acute results of the Thoraxcentre „ITALICS“ trial. 14th Congress of the European Society of Cardiology, Stockholm, p 2918
- Laitinen M, Pakkanen T, Donetti E et al. (1997) Gene transfer into the carotid artery using an adventitial collar: comparison of the effectiveness of the plasmid-liposome complexes, retroviruses, pseudotyped retroviruses, and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 8:1645-1650
- Lang ZH, Feingold JM (1996) An autonomously replicating eukaryotic expression vector with a tetracycline responsive promoter. *Gene* 168:169-171
- Ledley FD (1995) Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6:1129-1144
- Lee SW, Kahn ML, Dichek DA (1992) Expression of an anchored urokinase in the apical endothelial cell membrane. Preservation of enzymatic activity and enhancement of cell surface plasminogen activation. *J Biol Chem* 267:13 020-13 027
- Lee SW, Kahn ML, Dichek DA (1993) Control of clot lysis by gene transfer. *Trends Cardiovasc Med* 3:61-66
- Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68:510-516
- Link CJ, Moorman D, Seregina T, Levy JP, Schabold KJ (1995) A phase I trial of in vivo gene therapy with the Herpes simplex thymidine kinase ganciclovir system for the treatment of refractory or recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2:230-231
- Liu JM (1998) Gene transfer for the eventual treatment of Fanconi's anemia. *Semin Hematol* 35:168-179
- Liu JM, Young NS, Walsh CE et al. (1997) Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther* 8:1715-1730
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al. (1998) Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of pVEGF<sub>165</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98:2800-2804
- Lotze MT, Rubin JT (1995) Report of the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH)
- Lotze MT, Rubin JT, Carty S et al. (1994) Gene therapy of cancer: a pilot study of IL-4-gene-modified fibroblasts admixed with autologous tumor to elicit an immune response. *Hum Gene Ther* 5:41-55
- Lu DR, Zhou JM, Zheng B et al. (1993) Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B* 36:1342-1351
- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE et al. (1998) First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 178:92-100
- Mackensen A, Veelken H, Lahn M et al. (1997) Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts. *J Mol Med* 75:290-296
- Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N et al. (1997) Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12 133-12 138
- Malkin D, Portwine C (1994) The genetics of childhood cancer. *Eur J Cancer* 30a:1942-1946
- Marcel T, Grausz JD (1996) TCM Worldwide Gene Therapy Enrollment Report. TMC Development
- Marshall E (1996) New Zealand's leap into gene therapy. *Science* 271:1489-1490
- Matrangoli A, Harvey BG, Yao J (1994) Efficient in vivo adenovirus-mediated gene transfer to the airway epithelium of animals immunized with different adenovirus serotypes. North American Cystic Fibrosis Meeting. Late Breaking Science S5-6
- McElvaney NG, Crystal RG (1995) IL-6 release and airway administration of human CFTR cDNA adenovirus vector [2]. *Nat Med* 1:182-184
- Mebatsion T, Schnell MJ, Cox JH, Finke S, Conzelmann KK (1996) Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7310-7314
- Merrouche Y, Negrier S, Bain C et al. (1995) Clinical application of retroviral gene transfer in oncology: results of a French study with tumor-infiltrating lymphocytes transduced with the gene of resistance to neomycin. *J Clin Oncol* 13:410-418
- Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367:576-579
- Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL (1995) Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1:938-943
- Motulski A, Orkin SC (1995) Report and recommendation of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. Website: <http://www.nih.gov/news/panel-rep.html>
- Mukherjee S, Haenel T, Epton M (1997) Intralesional vaccinia virus-interleukin-2 (VV-IL-2) gene therapy in malignant mesothelioma (MM). *Lung Cancer [Suppl 1]* 18:236
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY et al. (1992a) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3:649-656
- Nabel GJ, Chang A, Nabel EG et al. (1992b) Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Hum Gene Ther* 3:399-410
- Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY et al. (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11 307-11 311
- Nabel EG, Yang Z, Muller D et al. (1994a) Safety and toxicity of catheter gene delivery to the pulmonary vasculature in a patient with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 5:1089-1094
- Nabel GJ, Chang AE, Nabel EG et al. (1994b) Immunotherapy for cancer by direct gene transfer into tumors. *Hum Gene Ther* 5:57-77
- Nabel GJ, Yang ZY, Nabel EG et al. (1995) Direct gene transfer for treatment of human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 772:227-231
- Niemann TH, Trigg ME, Winick N, Penick GD (1993) Disseminated adenoviral infection presenting as acute pancreatitis. *Hum Pathol* 24:1145-1148

- Nikol S, Huehns TY, Krausz E et al. (1999) Needle injection catheter delivery of the gene for an antibacterial agent inhibits neointimal formation. *Gene Ther* 6:737-748
- Noguez Hellin P, Meur MR, Salzmann JL, Klatzmann D (1996) Plasmoviruses: nonviral/viral vectors for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4175-4180
- Oldfield EH, Ram Z, Chiang Y, Blaese RM (1995) Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. GTI 0108. A phase I/II study. *Hum Gene Ther* 6:55-85
- Onodera M, Ariga T, Kawamura N et al. (1998) Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91:30-36
- O'Shaughnessy JA, Cowan KH, Nienhuis AW et al. (1994) Clinical protocol: retroviral mediated transfer of the human multidrug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hum Gen Ther* 5:891-911
- Parmiani G, Arienti F, Sulesuso J et al. (1996) Tissue Culture Society Congress, Brno, April 21-24, 1996. Cytokine based gene therapy of human tumors. An overview. *Folia Biol (Prah a)* 42:305-309
- Podsakoff G, Wong Jr KK, Chatterjee S (1994) Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* 68:5656-5666
- Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G et al. (1997) Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4:210-218
- Qiu X, Lu D, Zhou J et al. (1996) Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients. *Chin Med J (Engl)* 109:832-839
- Rakhmilevich AL, Turner J, Ford MJ et al. (1996) Gene gun mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6291-6296
- Ram Z, Culver K, Oshiro E (1995) Summary of results and conclusions of the gene therapy of malignant brain tumors: clinical study. *J Neurosurg* 82:343A
- Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der NIH (1995) Data management scientific report and status report, Stand 2.6.1995
- Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) der NIH (1996) Human gene transfer protocols, Stand 26.4.1996
- Redmond DE (1997) Gene therapy approaches to Parkinsons disease: preclinical to clinical trials, or what steps to take to get there from here. *Exp Neurol* 144:160-167
- Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA et al. (1996) T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med* 2:216-223
- Rigg RJ, Chen J, Dando JS, Forestell SP, Plavec I, Bohnlein E (1996) A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology* 218:290-295
- Rosenberg SA (1992) Karnofsky Memorial Lecture. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 10:180-199
- Rosenberg ZF, Fauci AS (1990) Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today* 11:176
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K et al. (1990) Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323:570-578
- Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC et al. (1994) Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86:1159-1166
- Rossi JJ (1995) Therapeutic antisense and ribozymes. *Br Med Bull* 51:217-225
- Roth JA (1996) Modification of tumor suppressor gene expression in non small cell lung cancer (Nslc) with a retroviral vector expressing wildtype (normal) p53. *Hum Gene Ther* 7:861-874
- Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD et al. (1996) Retrovirus mediated wild type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 2:985-991
- Roth JA (1997) 33rd American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting (Abstract)
- Roth JA, Cristiano RJ (1997) Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going. *J Natl Cancer Inst* 89:21-39
- Rubin J, Charboneau JW, Reading C, Kovach JS (1994) Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer. *Hum Gene Ther* 5:1385-1399
- Sakiyama Y (1996a) Clinical study of gene therapy for ADA deficiency. *Aerugi* 45:621-626
- Sakiyama Y (1996b) Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Hokkaido Igaku Zasshi* 71:27-32
- Samulski RJ (1993) Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 3:74-80
- Scanlon KJ, Ohta Y, Ishida H et al. (1995) Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB J* 9:1288-1296
- Schadendorf D, Czarnetzki BM, Wittig B (1995) Interleukin-7, interleukin-12, and GM-CSF gene transfer in patients with metastatic melanoma. *J Mol Med* 73:473-477
- Schweigerer L (1995) Antiangiogenesis as a novel therapeutic concept in pediatric oncology. *J Mol Med* 73:497-508
- Sekhon HS, Larson JE (1995) In utero gene transfer into the pulmonary epithelium. *Nat Med* 1:1201-1203
- Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD (1992) Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 359:67-70
- Sobol RE, Fakhrai H, Shawler D et al. (1995) Interleukin-2 gene therapy in a patient with glioblastoma. *Gene Ther* 2:164-167
- Son K, Huang L (1994) Exposure of human ovarian carcinoma to cisplatin transiently sensitizes the tumor cells for liposome-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12669-12672
- Spiegel M, Bitzer M, Schenk A et al. (1998) Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F. *J Virol* 72:5296-5302
- Stein CA, Cheng YC (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - is the bullet really magical? *Science* 261:1004-1012
- Sterman DH, Treat J, Litzky LA et al. (1998a) Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy

- nancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 9:1083-1092
- Sterman DH, Kaiser LR, Albelda SM (1998b) Gene therapy for malignant pleural mesothelioma. *Gene Ther* 12:553-568
- Stopeck AT, Hersh EM, Akporiaye ET et al. (1997) Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 15:341-349
- Sun Y, Jurgovsky K, Moller P et al. (1998) Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 5:481-490
- Tait DL, Obermiller PS, Redlin-Frazier S et al. (1997) A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 3:1959-1968
- Tan Y, Xu M, Wang W et al. (1996) IL-2 gene therapy of advanced lung cancer patients. *Anticancer Res* 16:1993-1998
- Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R et al. (1995) Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 55:6126-6132
- Tolstoshev P (1993) Gene therapy, concepts, current trials and future directions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:573-596
- Touchette N (1996) Gene therapy - not ready for prime time. *Nat Med* 2:7-8
- Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2:545-550
- Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J (1995) Generation of human cytotoxic T-cell specific for human carcinoembryonic antigen (CEA) epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA (rV-CEA) vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87:982-990
- Tursz T, Cesne AL, Baldeyrou P et al. (1996) Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 88:1857-1863
- Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA et al. (1994) Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and heptacellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9009-9013
- Van Meir EG, Polverini PJ, Chanzin VR, Huang H-J, Tribolet N de, Cavenee WK (1994) Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 8:171-176
- Veelken H, Mackensen A, Lahn M et al. (1997) A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int J Cancer* 70:269-277
- Waddill W, Wright W, Unger E, et al. (1997) Human gene therapy for melanoma: Ct guided interstitial injection. *AJR Am J Roentgenol* 169:63-67
- Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3410-3414
- Walker R, Bechtel CM, Natarajan V et al. (1995) Adoptive transfer of genetically modified, HIV-specific, syngeneic cytotoxic T lymphocytes (CTL) in HIV discordant identical twins. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Washington, DC, Abstract 404
- Weber F, Bojar H, Priesack HB et al. (1997) Gene therapy of glioblastoma - one year clinical experience with ten patients (abstract). *J Mol Med [Suppl 5]* 75:B40
- Welsh MJ, Zabner J, Graham SM, Smith AE, Moscicki R, Wadsworth S (1995) Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: Part A. Safety of dose and repeat administration in the nasal epithelium. Part B. Clinical efficacy in the maxillary sinus. *Hum Gene Ther* 6:205-218
- Wiley Stand 1.12.1998, Wiedergabe mit Erlaubnis von Wiley J. Gene Medicine. Website: <http://www.wiley.co.uk/genmed>.
- Wills KN, Maneval DC, Menzel P et al. (1994) Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding human p53 for gene therapy of cancer. *Hum Gene Ther* 5:1079-1088
- Wilson JM (1995) Report of the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the National Institutes of Health (NIH)
- Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ (1996) Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2889-2894
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM (1994a) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4407-4411
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM (1994b) Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 7:362-369
- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75:207-216
- Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270:18997-19007
- Zabner J, Ramsey BW, Meeker DP et al. (1996) Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 97:1504-1511
- Ziegner UH, Peters G, Jolly DJ et al. (1995) Cytotoxic T-lymphocyte induction in asymptomatic HIV-1-infected patients immunized with retrovector-transduced autologous fibroblasts expressing HIV-1IIIIB Env/Rev proteins. *AIDS* 9:43-50