Leibniz Online 08/2010 Zeitschrift der Leibniz-Sozietät e. V. ISSN 1863-3285 http://www.leibniz-sozietaet.de/journal/archive/08_10/coutelle.pdf



Charles Coutelle

Hoffnungen und Risiken einer präventiven pränatalen Gentherapie genetischer Erkrankungen

Vortrag vor dem Plenum der Leibniz-Sozietät am 10. Juni 2010

Adresse des Verfassers:
Charles Coutelle
Emeritus Professor of Gene Therapy
Imperial College London, Faculty of Medicine
National Heart and Lung Institute, Molecular and Cellular Medicine Section
Sir Alexander Fleming Building
SW7 2AZ

e-mail: c.coutelle@imperial.ac.uk; Tel.: +44(0) 207 594 3111, Fax: +44(0) 207 594 3000

Das genetische Lotto und das Konzept der Gentherapie

Genetisch-bedingte Erkrankungen können jeden von uns betreffen. Meist treten sie völlig unerwartet auf, ohne dass vorher Anzeichen dieser Erkrankung in der Familie beobachtet wurden (Abb.1). Es ist geschätzt worden, dass jeder Mensch Mutationen, die schwerwiegende Krankheiten hervorrufen können, in etwa zehn verschiedenen Genen seines Genoms trägt. Dass diese Mutationen meist nicht zu manifester Erkrankung führen, liegt daran, dass unser chromosomales Genom aus jeweils 2 Chromosomen der gleichen Art (zweimal 22 Autosomen) und den Sexchromosomen XY (bei Männern) bzw. XX (bei Frauen) besteht. Jedes Chromosom eines Paars, je eines von jedem Elternteil, trägt die gleichen, für dieses Chromosom charakteristischen, Gene (Allele). Solange eines der beiden Allele keine potentiell krankheitsverursachende Mutation trägt, kann es in den meisten Fällen einen Defekt des anderen Allels kompensieren. Daher sind die Träger dieser heterozygoten Genkombination phänotypisch unauffällig für diese vererbbare Erkrankung. Kinder von Eltern, die beide Träger eines mutierten Allels des gleichen Gens sind, können auf Grund der Zufallsverteilung der elterlichen Gene bei der Befruchtung, mit einer Wahrscheinlichkeit von 25%, das mutierte Allel von beiden Eltern erhalten. Personen mit zwei defekten Allelen sind homozygot für diesen Gendefekt und manifestieren die entsprechenden Krankheitssymptome. Zu den Krankheiten mit diesem als autosomal-rezessiv bezeichneten Erbgang gehören u.a. die Mukoviszidose (Zystische Fibrose) und die Phenylketonurie.

Bei den X-chromosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen besteht ein Risiko von 50% für die männlichen Nachkommen einer Mutter, die heterozygot für einen X-chromosomalen Gendefekt ist, das defekte Gen zu erhalten und zu erkranken, da sie vom Vater kein kompensatorisches X-Chromosom, sondern das männliche Y-Chromosom erhalten. Obwohl das Krankheitsrisiko bei X-chromosomal vererbten Erkrankungen meist eher in diesen Familien bekannt ist, kommt es auch hier, u. a. auf Grund von Neumutationen, zu unerwarteten Erkrankungsfällen. Beispiele für

Krankheiten mit diesem Erbgang sind die Muskeldystrophie Duchenne und die Hämophilien A und B (Bluterkrankheit).

Abb. 1

DAS PROBLEM

Genetische Erkrankungen

- meist unerwartete postnatale Diagnose ("genetisches Lotto")
- häufig Frühmanifestation ohne Heilung oder effektive Therapie
- DNA-Analyse ermöglicht frühe, sichere und kausale Diagnostik
 - Pränatal verlangt Entscheidung über Abort oder Akzeptanz

Humangenom-Sequenzierung

- Möglichkeit der DNA Analyse für praktisch jede monogenetisch bedingte Erkrankung
- Perspektive einer kausalen Arzneimittel- oder Gentherapie

Abgesehen von ihrem unerwarteten Auftreten, zeigen viele dieser Erkrankungen häufig eine Manifestation im frühen Lebensalter, was frühzeitig zum Tode oder zu irreparablen Organschäden führt. Sie sind oft schwer diagnostizierbar, meist nicht heilbar und/oder nur ungenügend behandelbar. Die Diagnostik dieser Erkrankungsgruppe ist durch die Einführung der DNA-Analyse, die es erlaubt, die familiäre Genmutation zu identifizieren, wesentlich verbessert worden, und die großen Fortschritte der Humangenom-Sequenzierung erlauben es prinzipiell für jede dieser Erkrankungen eine DNA-Diagnostik zu entwickeln. An der Entwicklung dieser Verfahren und ihrer Einführung in das Gesundheitswesen der DDR in einem kooperativen Projekt "Genomische Diagnostik" des Ministeriums für Gesundheitswesen war meine Gruppe am Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR in den 80iger Jahren maßgeblich beteiligt ¹. Diese Verfahren erlauben nicht nur eine schnelle und sichere molekulare Diagnostik bei erkrankten Patienten, sondern auch das Erkennen des heterozygoten Erbträger-Status in einer Familie sowie, während der Schwangerschaft, eine pränatale Diagnostik an Feten mit Risiko für eine spezifische genetische Erkrankung. Das System der Schwangerenberatungen in der DDR ermöglichte es uns, am Beispiel der Mukoviszidose, die Akzeptanz eines genetisches Screenings in der Frühschwangerschaft zu zeigen und gegen das blinde genetische Lotto die Optionen der Schwangerschaftsunterbrechung oder des bewussten und vorbereiteten Annehmens eines betroffenen Kindes zu setzen ².

Abb.2:

DIE LÖSUNG - GENTHERAPIE?

Somatische Gentherapie:

Transfer/Expression der normalen Gensequenz in betroffene somatische Zielzellen -

Gen-Addition, nicht Gensequenz-Korrektur

Postnatale Gentherapie:

Häufig ineffektiv, weil:

- Zielzellen in differenzierten Geweben schwer erreichbar
- Meist nur transiente Persistenz der korrigierten Zellen
- Immunreaktionen gegen therapeutisches Eiweiß
- Hohe Vektordosen erforderlich
- Meist zu spät, um Frühschäden zu verhindern

Natürlich sind weder Akzeptanz eines betroffenen Kindes noch der Abort einfache Lösungen des Problems. So war für mich 1992 der Ruf, die Leitung einer Gentherapiegruppe am Biochemistry Department des St Mary's Hospital Medical School, London, zu übernehmen, die logische Fortsetzung der begonnenen Arbeiten. Durch Gentherapie, also auf der Ebene der defekten Gene, genetische Erkrankungen zu behandeln, erscheint als der sinnvollste und konsequenteste Zugang zur Lösung des therapeutischen Dilemmas genetischer Erkrankungen (Abb.2). Eine echte Genkorrektur durch Austausch des defekten Gens oder eines mutierten Genabschnittes ist auch jetzt, nach mehr als 20 Jahren Arbeit auf diesem Gebiet, erst in den experimentellen Anfängen, aber schon 1992 konnte erwartet werden, dass bei den meisten autosomal-rezessiven und X-chromosomalen genetischen Erkrankungen die einfache Einführung der normalen Gensequenz und ihre Expression zur Produktion des fehlenden therapeutischen Proteins in den betroffenen Zellen genügen müsste, um die Krankheit zu heilen: Ein normales Allel genügt ja bereits bei heterozygoten Defektgen-Trägern, um sie phänotypisch gesund zu halten. Es stellte sich aber bald weltweit heraus, dass unser Optimismus verfrüht war, und bis heute hat die Gentherapie, trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte, nur sehr wenige wirkliche klinische Erfolge aufzuweisen. Die Ursachen dafür sind, dass die Zielzellen in den differenzierten Geweben eines erwachsenen Organismus nur schwer erreichbar sind und selbst in den korrigierten Zellen ein therapeutischer Effekt oft nur vorübergehend ist, da sie das eingebrachte Gen bei der Zellteilung rasch verlieren oder da diese Zellen, in Folge ihrer Produktion des "fremden" therapeutischen Proteins, durch zelluläre Immunreaktionen eliminiert werden.

Außerdem sind sehr hohe Gendosen erforderlich, um überhaupt einen Effekt zu sehen, und für frühmanifestierende Erkrankungen kommt eine Therapie im Jugend- oder Erwachsenenalter meist zu spät, um irreparable Organschäden zu verhindern. Wir stellten uns daher etwa 1994 die Frage, ob

eine Applikation der therapeutischen Gensequenz noch während der fetalen Entwicklung diese Hindernisse überwinden könne.

Die Hoffnungen einer pränatalen Gentherapie

Unsere Hypothese war, dass ein solches Vorgehen eine frühe Krankheitsmanifestation verhindern könne, da es einen effektiven Zugang zu den noch einfach strukturierten fetalen Geweben mit expandierenden Stammzellen ermöglichen würde; ferner, dass das therapeutische Protein als "Eigeneiweiß" erkannt und toleriert würde, da die Erkennung von Eigen- und Fremdproteinen erst während der Fetalperiode erfolgt. Schließlich erwarteten wir auch, dass das kleine Körpervolumen des Feten eine relative geringe Vektordosis erfordern würde³.

Unsere Hoffnung war, dass wir damit eine pränatale Prävention der genetischen Erkrankung erreichen und so eine dritte Option zu Akzeptanz oder Abort anbieten könnten. Diese Option würde auch eine neue Sicht auf pränatales Screening geben (Abb.3).

Abb.3

HOFFNUNGEN DER FETALEN GENTHERAPIE

- Frühe Krankheitsmanifestation verhindern
- Effektiver Zugang zu später schwer erreichbaren Geweben/Organen
- Permanente therapeutische Genexpression (expandierende Stammzellen)
- Immuntoleranz gegen Vektor und therapeutisches Eiweiß
- Günstiges Zell-Vektor-Verhältnis (geringere Vektordosis)
- Bei Erfolg:
 - Pränatale Prävention
 - 3. Option zu Akzeptanz oder Abort
 - Neue Sicht auf <u>pränatales Screening</u>
 - Weniger belastend als Selektion durch Präimplantationsdiagnose in bekannten Risikofamilien

Als wir 1994 parallel zu einigen Gruppen in den USA mit diesem Forschungsprojekt begannen, war dieses Gebiet völliges Neuland. Deshalb haben wir in den vergangenen Jahren systematisch an folgenden Fragen gearbeitet:

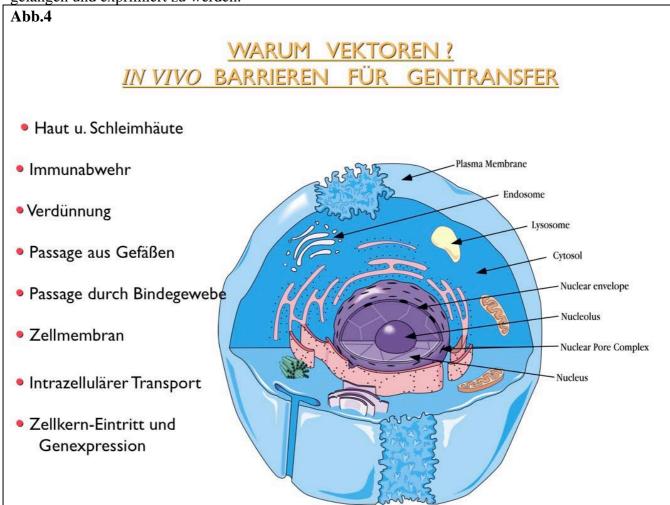
- Welche Gentransfer-Vektoren sind am besten für in-utero-Gentherapie geeignet?
- Mit welchen Tiermodellen können wir welche Fragen beantworten?
- Wie, wann und wohin kann bei ihnen der Vektor appliziert werden?
- Welche Erkrankungen kommen für eine *in-utero-*Gentherapie in Frage?
- Welche möglichen Risiken birgt die in-utero-Gentherapie?

Ohne die wichtigen Beiträge anderer Gruppen, die in den referierten Übersichtsarbeiten zitiert

werden, zu übersehen, beschreibt dieser Vortrag im Wesentlichen die Arbeiten unserer Gruppe in London zur zielgerichteten Entwicklung der pränatalen Gentherapie für eine potentielle Prävention genetischer Erkrankungen des Menschen.

Warum Vektoren und welche Vektoren?

Gentherapie erfordert die Einführung therapeutischer Nukleinsäuresequenzen in die korrekturbedürftigen Zellen eines Patienten. Nukleinsäuren können jedoch nicht einfach in die Zellen höherer Organismen eindringen, da diese im Laufe der Evolution eine Reihe protektiver Barrieren gegen eine Invasion durch Viren, andere Pathogene und Makromoleküle entwickelt haben (Abb.4). Die ersten Barrieren sind die Haut und Schleimhäute, die den Körper von der Umwelt abgrenzen. Im Körper behindern die Entfernung zu den Zielzellen, die Verdünnung in den Körperflüssigkeiten, der Abbau durch Serumnukleasen sowie Bindegewebe, Schleim, Zilien und die Plasmamembran, die diese Zellen schützend umgeben, den Zugang. Aber selbst nach Überwindung dieser Hindernisse und Eindringen in die Zelle muss die Fremd-DNA intrazelluläre Abbauwege vermeiden und die Kernmembran erreichen und passieren, um in den Zellkern zu gelangen und exprimiert zu werden.



Neben den genannten, eher passiven, physikalischen Barrieren hat sich das sehr effektive und flexible humorale und zelluläre Immunsystem entwickelt, um aktiv Eindringlinge abzuwehren und zu zerstören. Viren und andere Pathogene haben ihrerseits Mechanismen entwickelt, um diese Hindernisse zu überwinden: Eine hohe Mutationsrate, die der Immunüberwachung ausweicht, sowie die Adaptation an zelluläre Mechanismen des Wirtes wie Rezeptorerkennung für Aufnahme der Viren durch die Zelle und Reprogrammierung des zellulären Syntheseapparates für die Produktion der viralen Proteine und die Vermehrung der Virus-DNA.

Für die Gentherapie verlangen diese zellulären Abwehrsysteme die Entwicklung spezifischer Träger zur Überwindung dieser vielfachen Barrieren und der sicheren "Anlieferung" der therapeutischen Nukleinsäure an die Zielzellen. Die Entwicklung effektiver Vektoren hat sich als bedeutendste Voraussetzung für einen erfolgreichen Gentransfer herausgestellt. Das ist von besonderer Wichtigkeit, wenn das Erreichen eines spezifischen Zelltyps und/oder wenn eine bestimmte Höhe und Dauer der Genexpression für einen therapeutischen Effekt erforderlich sind. Weiterhin müssen negative Nebenwirkungen durch die Vektoren vermieden oder wenigstens minimiert werden, um die Vorteile der therapeutischen Wirkung nutzen zu können. Diese Anforderungen haben zur Entwicklung verschiedener Vektoren mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen geführt (Abb. 5). Es hat sich gezeigt, dass es keinen Allzweck-Vektor gibt, sondern, dass die verschiedenen therapeutischen Ziele wesentlich bestimmen, welches Vektorsystem am besten für die Erfüllung eines bestimmten Zwecks geeignet ist.

Abb.5

VEKTOREN FÜR FETALE GENTHERAPIE

• Nicht-integrierende Vektoren - Bauen sich nicht in Wirts-DNA ein

Adenovirus -Vektoren

- Transiente Persistenz Verlust durch fetale Zellteilung
- Starke Immunogenität
- Produktion in großen Mengen und mit hohem Titer
- Breiter Zelltropismus
- Guter "Pfadfinder"-Vektor

• Integrierende Vektoren - Bauen sich in die Wirts-DNA ein

Onco-Retro- und Lentivirale Vektoren

- Geringe Immunogenität
- Permanent, aber Genotoxizitätsrisiko

Adeno-associated-Virus-Vektoren

- Nicht menschenpathogen, gering immunogen
- Geringe Integration. Hohe Stabilität Langsamer Verlust durch fetale Zellteilung

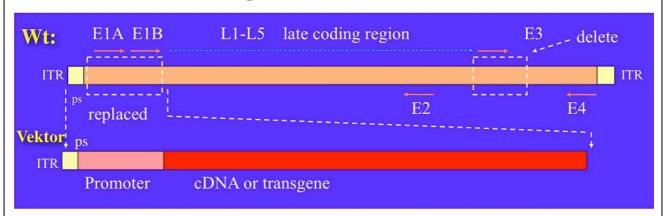
Die meisten genetischen Erkrankungen erfordern die permanente Bereitstellung des bei dieser Erkrankung fehlenden Genprodukts, meistens ein Protein, in therapeutischer Menge. Idealerweise sollte das mit einer Genapplikation in die Stammzellen der Zellen, die das therapeutische Gen normalerweise exprimieren, erreicht werden. Das spezifische Gen sollte über die Lebenszeit des behandelten Patienten zum gewünschten physiologischen Differenzierungsstadium der Tochterzellen aktiv sein. Am besten kann das durch den Einbau der therapeutischen Gensequenz in die chromosomale DNA dieser Stammzellen mit Hilfe sogenannter integrierender Vektoren (Retro-/Lentivirus-Vektoren) erreicht werden. Auf diese Weise wird das Gen, ohne Ausverdünnung bei der Zellteilung, an die Stammzellpopulation und die differenzierenden Tochterzellen weitergegeben. Alternativ kann das Ziel der lebenslangen Therapie auch durch wiederholte Applikation

nichtintegrierender Vektoren (z.B. Adeno- und Adeno-associate-Virus (AAV)-Vektoren) in die differenzierten Zielzellen erreicht werden. Während das Wildyp-AAV die Fähigkeit zur Genomintegration besitzt, haben die AAV-Vektoren diese Eigenschaft weitgehend eingebüßt. Sie zeichnen sich aber durch eine, für nicht-integrierende Vektoren ungewöhnlich große Persistenz in den durch sie infizierten Zellen aus, wodurch sie, selbst bei intensiver Zellteilung, nur relativ langsam verloren gehen. Für AAV ist keine Menschenpathogenität bekannt. Dagegen enthält die Gruppe der Retroviren auch die tumorinduzierenden Onko-Retroviren, AIDS wird von dem HIV-Lentivirus hervorgerufen, und Adenoviren sind Erreger von Gastroenteral- und Erkältungskrankheiten. Die meisten gegenwärtigen Vektoren werden also von durchaus ernst zu nehmenden und effizienten Pathogenen abgeleitet.

Abb. 6

PRINZIP EINES VIRUS-VEKTORS

1ste Generation eines Replikations-defizienten-Adenovirus-Vektors



- Entfernung der Gensequenzen, die die Virusvermehrung kodieren
- Gewonnener Platz im Vektorgenom f
 ür Einbau virusfremder (therapeutischer)
 Gensequenz genutzt
- Benötigt spezielles Produktionszellsystem mit den deletierten Virusgenen zur sichern Virusvektor-Produktion

Ziel der kontinuierlichen Vektorforschung und -Entwicklung ist es daher, bei den Vektoren, die Gentransfereffizienz der Viren beizubehalten, aber die Fähigkeit zur Synthese viraler Proteine und zur Weitervermehrung zu eliminieren. Dazu werden große Abschnitte des Virusgenoms, die diese Funktionen steuern, entfernt und an ihrer Stelle Expressionskassetten für die jeweilig therapeutischen Gene eingesetzt (Abb. 6). Die Vektoren sind dadurch in der Lage, in die Zielzellen einzudringen und dort die Produktion des therapeutischen Proteins zu steuern. Sie können sich aber

nicht wie die Wildtyp-Viren in der Zielzelle weiter vermehren und andere Zellen infizieren. Zu ihrer sicheren und effektiven Produktion benötigt man daher Produktionszellen, die die zur Virusvermehrung erforderlichen viralen Gene enthalten. Obwohl in den vergangenen 30 Jahren große Fortschritte in der Vektorentwicklung gemacht wurden, muss ständig weiter an der Verbesserung der Zellspezifität, Expressionseffektivität und Sicherheit der Gentransfervektoren gearbeitet werden.

Tiermodelle

Die fetale Maus

unseren Vektoren zu erreichen.

In der Anfangsphase unserer Arbeiten ging es darum, die Techniken der in-utero-Genapplikation in geeigneten Tiermodellen zu entwickeln und eine rasche Aussage zur anatomischen Lokalisation der mit den verschiedenen Applikationswegen erfolgreich durch Gentransfer erreichten Gewebe und Organe zu finden. Hierbei haben die sehr effektiven Adenovirus-Vektoren hervorragende Dienste erwiesen. Allerdings sind sie auf Grund ihrer Immunogenität und nur kurzzeitigen Gentransferaktivität nicht für langfristige therapeutische oder wiederholte Anwendungen geeignet. Dafür haben sich die kaum immunogenen integrierenden Lentivirus-Vektoren in Langzeit-Korrekturexperimenten sehr bewährt. Ihre Anwendung ist jedoch durch das noch zu diskutierende Risiko der Genotoxizität überschattet. In jüngster Zeit sind die weitgehend atoxischen AAV-Vektoren, die nur eine geringe Fähigkeit zur Genomintegration haben, aber ungewöhnlich lange als autonome Einheiten im Wirtszellkern verbleiben können, sowohl für die postnatale wie experimentelle *in-utero*-Gentherapie erfolgreich eingesetzt worden. Der Hauptvorteil des Maus-Modells ist, dass es eine Reihe natürlich auftretender Mausstämme mit genetischen Defekten gibt, die identisch mit dem entsprechenden humanen Krankheitsbild sind oder diesem sehr ähneln. Darüber hinaus können relativ einfach reinerbige Inzucht-Mausstämme mit spezifischen Mutationen, die denen des Menschen entsprechen, durch Genmanipulation hergestellt werden (transgene Mäuse). Weiterhin sind die kurzen Generationszeiten mit vielen Nachkommen sowie die relativ einfachen und ökonomischen Haltungsbedingungen von Vorteil. Die Nachteile sind natürlich, dass die Maus anatomisch, besonders hinsichtlich ihrer Größe, aber auch in einer Reihe physiologischer Parameter erheblich vom Menschen abweicht. Im Ergebnis unserer Arbeiten sind wir heute in der Lage, über verschiedene Applikationswege praktisch alle für die

unterschiedlichen Modelle menschlicher genetischer Erkrankungen relevanten Organsysteme mit

Auf Grund der Kleinheit des fetalen Maus-Modells ist es für die verschiedenen Applikationswege notwendig, zunächst unter Narkose eine Öffnung der Bauchhöhle (Laparotomie) vorzunehmen. Dann werden nacheinander die V-förmig angeordneten beiden Uterus-Hörner herausgezogen (Abb. 8). In jedem Horn befinden sich, wie Perlen auf einer Schnur angeordnet, je 2-6 Embryonen. Jeder Fetus ist von einem eigenen Amnionsack (Fruchtsack) umgeben. Die Konturen der Feten sind gut durch die dünne Uterusmuskulatur hindurch erkennbar, wodurch, ohne Öffnung des Uterus, die topische Injektion in die einzelnen Organe, in die Körperhöhlen oder, über die oberflächlichen Dottersackgefäße, in die fetale Zirkulation möglich ist. Die Tiere tolerieren die Anästhesie und Operation sehr gut mit einer fetalen Überlebensrate zur normalen Geburt von etwa 90%.

Die Abb. 7 zeigt eine fetale Maus im Sagitalschnitt und listet die Besonderheiten dieses Tiermodells auf.

Abb.7 **FETALE MAUS ANTERIOR** Tragzeit 21 Tage • Genetische Krankheitsmodelle Studien zu Krankheitskorrektur - Toleranz & Sicherheit (Keimbahntransfer, Vektor-Genotoxizität) Applikationen Intra-amniotische Injektion (ab Tag 13) - Haut - beste Infektion ab SST 13 - Lunge - durch fetale "Atmung" ab SST 15 - Lokale Injektion Muskel, Leber, Herz, ZNS, Peritoneum Dottersack-Gefäßinjektion (ab Tag 11) beste an SST 15/16 POSTERIOR

Abb.8

INTRA-AMNIOTISCHE INJEKTION IN MAUS FETUS



Zur Entwicklung der Technologie der Gen-Applikation, zur Einschätzung der Gentransfer-

Effektivität der verschiedenen Vektoren sowie zum Verfolgen der biologischen Verteilung des

Abb. 9

FETALE MAUS

Injektion in Amnionhöhle

13. SCHWANGER-SCHAFTSTAG

(B-gal-Adenovirus)



Abb. 10

FETALE MAUS

Injektion in Amnionhöhle

13. SCHWANGER-SCHAFTSTAG

(B-gal-Adenovirus)

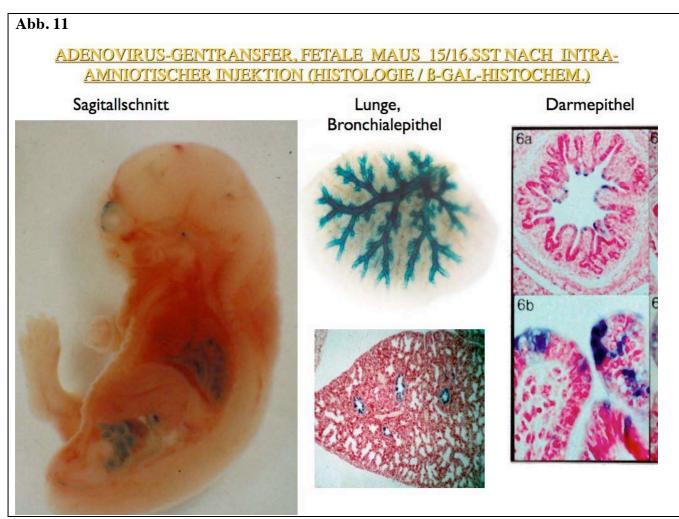


Vektors im injizierten Organismus werden in der Gentherapieforschung Markergene benutzt. Die Expression dieser Gene kann gewöhnlich über die Enzymaktivität des produzierten Markerproteins durch histochemische Reaktionen verfolgt werden. Alternativ können diese Proteine oder auch die therapeutischen Proteine durch Antikörperreaktionen immunhistochemisch nachgewiesen werden. In den hier vorgestellten Arbeiten wurde vor allem das bakterielle LacZ-Gen, das das Enzym β-Galaktosidase kodiert, als Marker benutzt. Die Reaktion der β-Galaktosidase mit seinem

künstlichen X-Gal-Substrat führt zu einer charakteristischen Blaufärbung der Zellen. Um die Reaktion von unspezifischen Reaktionen der endogenen, zytoplasmatischen, β-Galaktosidase zu unterscheiden, ist die gentechnische β-Galaktosidase so verändert, dass sie sich in den Zellkernen der erfolgreich durch Gentransfer erreichten Zellen anreichert und diese blaufärbt. Der immunhistochemische Nachweis der β-Galaktosidase ist mit einer Peroxydasereaktion gekoppelt und führt zu einer Braunfärbung der positiven Zellkerne.

Die Abb. 9-11 zeigen die histochemische/immunhistochemische Nachweisreaktion (Blaufärbung/Braunfärbung) des β-Galaktosidase-Markergens nach Transfer durch verschiedene Vektoren über unterschiedliche Applikationswege und zu unterschiedlichen Injektionszeitpunkten. Bei Injektion in die Amnionhöhle am 13. Schwangerschaftstag wird vor allem die Haut und die Mundschleimhaut des Fetus infiziert (Abb. 9/10).

Am 15. SST erfolgt dagegen kein Gentransfer mehr in die Haut, die inzwischen beginnt Keratin zu bilden, aber die Lungen- und Darmepithelien werden jetzt erreicht (Abb. 11), da der Fetus beginnt, sporadische Schluck- und "Atem"-Bewegungen durchzuführen.



Ein effektiver Gentransfer in die Atemwegsepithelien ist die Grundvoraussetzung für eine Gentherapie der Mukoviszidose (Zystische Fibrose). Das hier erreichte Ausmaß des Gentransfers in die einfach strukturierten fetalen Atemwegsepithelien steht im deutlichen Gegensatz zu dem nur sehr begrenzten Gentransfer im Erwachsenenalter. Diese Effektivität des fetalen Gentransfers ist inzwischen auch mit neueren, permanenteren Vektoren in Arbeiten meiner früheren Mitarbeiter gelungen und bietet sich für eine, zunächst präklinische, *in-utero-*Gentherapie der Mukoviszidose an.

Durch gezielte topische Injektion durch die Uteruswand hindurch in die Thoraxhöhle wird die Interkostal- und Zwerchfellmuskulatur erreicht. Gentransfer in die Abdominalmuskulatur und in die

untere Seite des Zwerchfells erfolgt bei Injektion in die Bauchhöhle und in einzelne Muskelgruppen der Extremitäten durch direkte topische Injektion. Diese Ergebnisse sind für eine fetale Gentherapie der Muskeldystrophie Duchenne und anderer Muskeldystrophien relevant. Abb. 12 zeigt den Gentransfer in die Muskulatur des Thorax, Abdomens und der Extremitäten sowie Abb. 13 in Hirn und Rückenmark nach topischer Injektion in diese Körperteile.

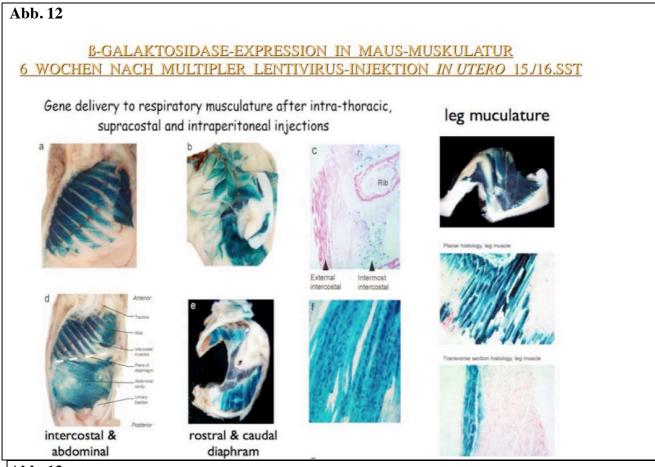
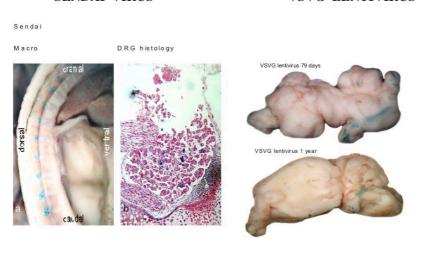


Abb. 13



SENDAI VIRUS

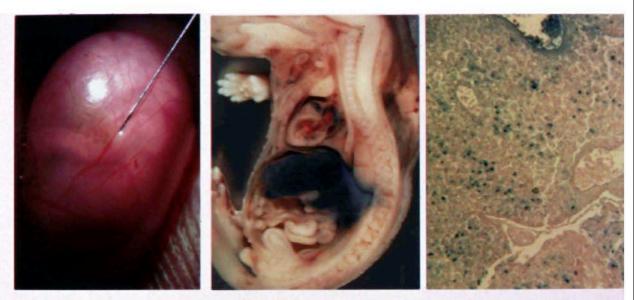
VSVG LENTIVIRUS



Über die Dottersackgefäße bzw. die Nabelschnurvene wird vor allem die Leber erreicht, zu der sie im fetalen Kreislauf einen direkten Zufluss haben. Abb.14 und 15 zeigen das Ergebnis der Dottersackgefäß-Injektion von β-Galaktosidase exprimierenden Adenovirus- (Abb.14) bzw. Lentivirus-Vektoren (Abb.15)

Abb. 14

FETALE MAUS 16. SST, DOTTERSACKGEFÄSS-INJEKTION (LEBER, HISTOLOGY / B-GAL-HISTOCHEM.)

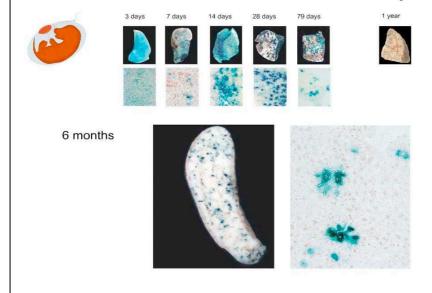


Injection into the yolk sac vessel of a fetal mouse 16 days post-coitus (left). β-Galactosidase expression after injection of vector into the mouse fetus at 16 days post coitus. Gross appearance of liver and heart expression (middle) and microscopic appearance of liver expression (right) 48 hours after injection of Ad-LacZ into yolk sac vessels.

Abb.15

LENTIVIRALER GENTRANSFER ZUR LEBER

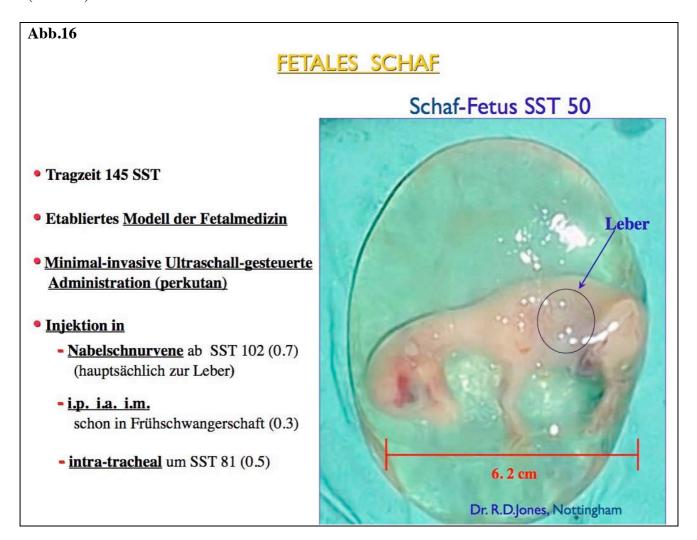
After intra-vascular LacZ lentivirus at 16 days



Mit dem integrierenden ß-Galaktosidase-Lentivirus-Vektor haben wir die Weitergabe des ß-Galaktosidase-Gens in die Tochterzellen der primär injizierten Zellen der Leber zeigen können. Über einen Zeitraum von einem halben Jahr sind makroskopisch und mikroskopisch Zellgruppen erkennbar, deren Entstehung am ehesten durch klonale Expansion von Zellen mit Stammzellcharakteristika erklärbar ist. Die Nutzung dieser Ergebnisse in einem erfolgreichen präklinischen Gentherapieversuch der Bluterkrankheit wird später berichtet.

Das fetale Schaf

Zur Vorbereitung auf eine mögliche Anwendung beim Menschen haben wir in Kooperation mit der Fetale Medicine Unit, University College, London (UCL), das Modell des Schaf-Fetus gewählt (Abb. 16).



Das Schaf ist ein etabliertes Modell der Fetalmedizin, da der Schaf-Fetus viele Ähnlichkeiten in Physiologie und Immunologie mit dem menschlichen Fetus aufweist. Vor allem erlaubt auch seine Größe den Einsatz und die Entwicklung von perkutan durchführbaren minimal-invasiven Ultraschall-gestützten Injektionstechniken, wie sie bereits in der menschlichen Fetalmedizin Anwendung finden. An diesem Modell ist es gelungen, praktisch alle für einen therapeutischen Gentransfer *in utero* relevanten Organe mit diesen Techniken zu erreichen⁴.

Abb. 17 zeigt ein Ultraschallbild der intrauterinen Adenovirus-Injektion in die Nabelschnurvene eines Schaf-Fetus und Abb. 18 den resultierenden Gentransfer in die fetalen Hepatozyten.

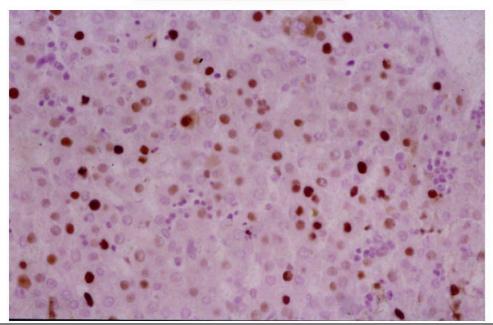
Abb. 17

SPÄTSCHWANGERSCHAFT SCHAF-FETUS PERKUTANE NABELSCHNUR-INJEKTION UNTER ULTRASCHALL-SICHT



Abb.18

LEBER, B-GAL-IMMUNO-HISTOLOGIE 3 TAGE NACH ADENOVIRUS-NABELSCHNUR-INJEKTION IN 130. SST SCHAF-FETUS



Die folgende Tabelle (Abb.19) demonstriert die daraus resultierende Vektor-Verteilung (Gendetektion durch Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR1, und nested PCR, PCR2) und Expression durch RNA-Detektion (Reverse-Transkription-PCR, RT) und β-Galaktosidase-Histochemie im Körper der Mutter und des Fetus aus zwei Experimenten (jeweils 3. bzw. 9. Tag nach *in utero* Injektion des Adenovirus-Vektors). Erkennbar ist der bevorzugte Gentransfer in die Leber, gefolgt von der Nebennierenrinde (geschuldet der eingriffsbedingten hohen Durchblutungsrate) des Feten. Die Vektornachweisbarkeit und seine Expression fällt bei diesem transienten Vektorsystem erwartungsgemäß vom 3. zum 9. Tag nach Injektion stark ab. Die Plazenta stellt, wie man sieht, eine recht wirksame, wenn auch nicht absolute, Barriere gegen den Übertritt des Virus in die mütterliche Zirkulation dar, der nur durch die sehr empfindliche nested PCR nachgewiesen werden kann.

Abb. 19								
VER	TEIL	UNG	8	EXPRESSIO	N VON	AdR	SVBG	AL-VIRUS IN
				RSCHIEDEN				
								10004
	Maternal (No. 4) day 3				Fetal (No. 4) day 3			
	PCR1	PCR2	RT	Histochem	PCR1	PCR2	RT	<u>Histochem</u>
Lung	-	-	-		(+)	+	+	(+)
Liver	-	+	-	1.5	+	+	+	+++
Gonads	1.5	-	-	180	(+)	+	-	#
Adrenals	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	+++ (cortex)
Kidney	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	
Brain	nd	nd	nd	nd	0.00	12	-	(+)
Heart	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)
Placenta	?	?	?	250	(+)	+	-	•
	Maternal (No. 5) day 9				Neonatal (No. 5) day 9			
<u> </u>	PCR1	PCR2	RT	Histochem	PCR1	PCR2	RT	Histochem
Lung	+1	100		-	(+)	+	+	: * 0
Liver	-	-	•	-	+	+	+	÷
Gonads		10		-	(+)	+	-	
Adrenals	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	
Kidney	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	
Brain	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	-
Heart	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Placenta	?	?	?	-	nd	nd	nd	

Die perkutane intrauterine Punktion der Nabelschnurvene ist eine etablierte Technik der modernen Fetalmedizin. Viele genetisch-bedingte metabolische Erkrankungen werden durch Mutationen in Genen, die in den Leberzellen exprimiert werden, hervorgerufen. Die Nutzung dieses Applikationsweges zum effektiven Gentransfer in die fetale Leber eröffnet daher besonders für die pränatale Gentherapie dieser Erkrankungen eine breite Anwendung.

Der Zugang zu den Epithelen der Atemwege ist in größeren Tiermodellen und dem Menschen

komplizierter, als bei der Maus beschrieben. Die Injektion in die Amnionhöhle führt in diesen Fällen zu erheblicher Vektorverdünnung in der Amnionflüssigkeit und zu Vektorverlust durch Gentransfer in extraembryonale Gewebe. Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten haben unsere Kooperationspartner der Fetal Medicine Unit des UCL am Schafmodell eine neue minimalinvasive transkutane Injektionstechnik entwickelt. Wie bei der Nabeschnurveneninjektion wird unter Ultraschallsicht, ohne Laparotomie, eine Nadel durch die Bauchdecke, den Uterus und den fetalen Thorax in die Trachea, oberhalb der Teilung in die beiden Bronchien, eingeführt und dient zur Injektion des Genvektors. Die Trachea wird dafür mit einer ebenfalls eingeführten Manschette nach oben abgedichtet. Nach Applikation des Genvektors wird dieser durch Injektion mit einer inerten Flüssigkeit, Perflubron, in die kleineren peripheren Atemwege gedrückt, die die wesentlichen Zielepithelien für eine Gentherapie der Mukoviszidose darstellen. Die Übertragbarkeit der entwickelten Injektionstechnologie auf den menschlichen Fetus wird entscheidend für eine potentielle Anwendung dieser Ergebnisse für menschliche Erkrankungen sein.

Abb.20 zeigt das Ultraschallbild und die schematische Darstellung der Vektorinjektion in die fetalen Atemwege und Abb. 21 die Expression nach Gentransfer in die Atemwegsepithelien des Schaf-Fetus.

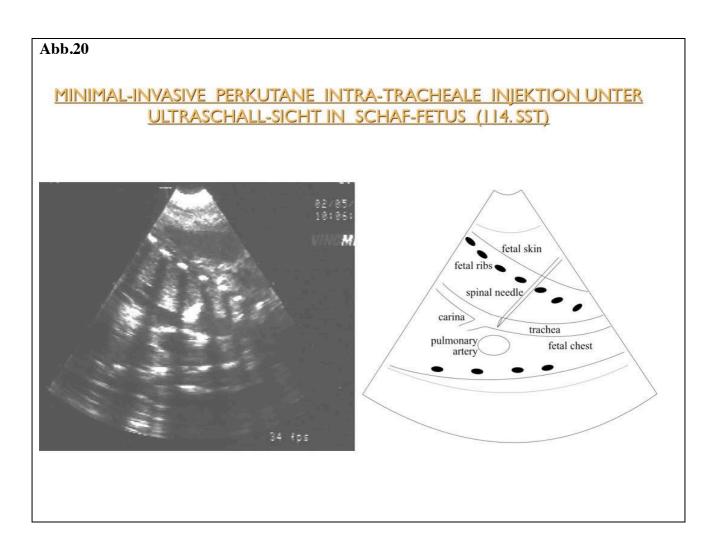
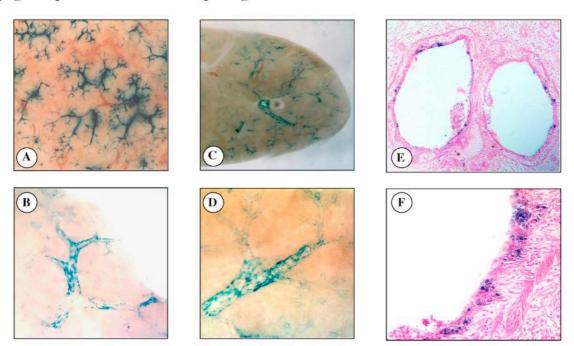


Abb.21

CAPRATE-STIMMULIERTER ADENOVIRUS-GEN-TRANSFER IN ATEMWEGE 114 SST. SCHAF-FETUS

 β -gal expression in fetal sheep lungs after intratracheal installation of adeno *lacZ*



X-gal staining of distal airways of fetal sheep lungs. A. Fetus administered 5ml 100mM sodium caprate in PBS followed by $1x10^{12}$ pfu Ad lacZ in 5ml complexed with DEAE dextran (5 μ g/ml in PBS) followed by 5ml perflubron. B,C,D. As A but in the absence of perflubron. E,F. Paraffin embedded sections from C and D counterstained with eosin.

Andere Tiermodelle

Es gibt noch eine Reihe weiterer, in der Gentherapie genutzter, Tiermodelle anderer Spezies. Die meisten sind natürliche (z. B. Gun Ratte – Hyperbilirubinämie; Watanabe Kaninchen – Hypercholesterinämie; DMD-Hund – Duchenne Muskeldystrophie) oder transgen-erzeugte (CFTR-KO-Schwein – Mukoviszidose) Krankheitsmodelle. Andere Modelle weisen für eine bestimmte Fragestellung besonders relevante physiologische Eigenschaften auf. So wären vor einer klinischen Einführung, aus den noch zu diskutierenden Sicherheitsgründen, Langzeitstudien an einem nichthumanen Primatenmodell sehr angeraten.

Hierzu werden durch die Arbeitsgruppe um Tarantal^{5,6} und durch eine Gruppe um meine früheren Kooperationspartner und Mitarbeiter⁷ Pionierarbeiten an Rhesusaffen durchgeführt.

Erste "Proofs of Principle" einer erfolgreichen in-utero-Gentherapie

Nach Erarbeitung der dargestellten Grundlagen für einen erfolgversprechenden *in-utero*-Gentransfer wurden, von anderen und uns, erste Experimente zu einer kurativen *in-utero*-Gentherapie durchgeführt. Diese benutzten sowohl Lenti- als auch AAV-Vektoren an verschiedenen Nager-Modellen menschlicher Gendefekte. Sie zielten auf Erkrankungen mit Defekten in der Expression essentieller Proteine im Hirn, in der Retina, in der Muskulatur und in der Leber ⁸. Die Genapplikation erfolgte, mit Ausnahme unserer Experimente, durch direkte Injektion in die jeweiligen Organe.

Wir benutzen eine Dottersackgefäß-Injektion zur Applikation von Adenovirus- und Lentivirus-Vektoren mit der korrektiven Gensequenz des Antihämophilen Proteins B (FIX). Die Dottersackgefäße führen das Blut über die Narbenschnurvene des fetalen Kreislaufs in einem hohen Prozentsatz direkt zur Leber. Das antihämophile Protein B (FIX) ist der Blutgerinnungsfaktor, der bei der Bluterkrankheit, Hämophilie B, fehlt oder mutiert ist. (Abb. 22) 9, 10. Wir haben diese schwerwiegende genetisch-bedingte Erkrankung ausgewählt, weil dieses Protein in der Leber exprimiert wird und daher ein gutes Modell für Gentransferuntersuchungen dieses Organs ist.

Abb. 22

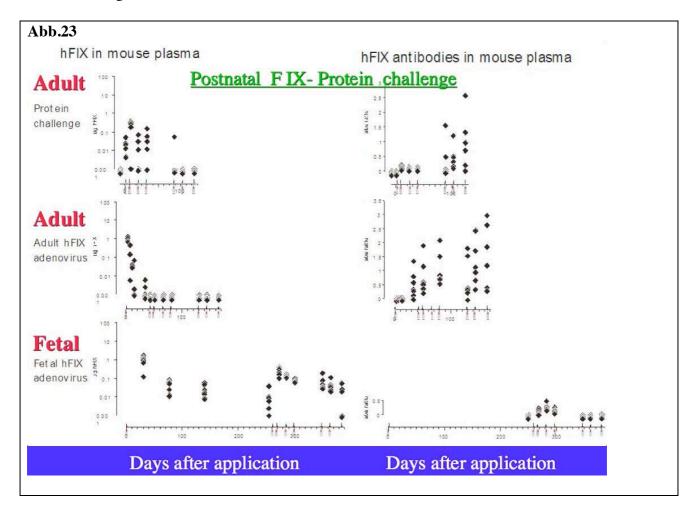
BEISPIEL HÄMOPHILIE B (BLUTERKRANKHEIT)

- Mangel an Blutgerinnungsfaktor IX (FIX)
 Tiermodel FIX Knock-out Maus
- X-chromosomale genetische Erkrankung
 Häufigkeit etwa 1 in 25 000 männlichen Neugeborenen
- Häufige oft schwere Blutungen nach minimalem Trauma, kann Gelenksdeformation oder lebensbedrohliche intra-peritoneale oder Hirnblutungen verursachen. Perinataler Risikofaktor
- Erfordert lebenslange Faktor IX Substitution
 Teuer, oft nur bei akuten Blutungsereignissen verabreicht
- Gegenwärtige Therapie: Korrektur zu 5 % des normal Blut-Spiegels Schon 1% hat einen therapeutischen Effekt
- Immunkomplikationen dieser Proteintherapie Anti-FIX-Antikörper ("Inhibitoren")

Die Leber hat eine zentrale Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Metabolismus und ist daher das Zielorgan bei der Behandlung zahlreicher genetisch-bedingter Erkrankungen. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, dass der Gerinnungsfaktor IX, dessen Synthese in der Leber bei dieser Erkrankung gestört ist, in das Blut sezerniert wird und daher seine Synthese, als Folge eines erfolgreichen Gentransfers, durch eine einfache Blutentnahme über die Lebenszeit der Versuchstiere wiederholt analysiert werden kann Das Auftreten von sogenannten "Inhibitoren", neutralisierenden Antikörpern (Anti-FIX), die die gegenwärtig einzig effektive Substitutionstherapie mit human-FIX unwirksam machen, ist eine ernsthafte Komplikation dieser Erkrankung. Die in-utero-Gentherapie sollte zur Toleranz dieses Fremdproteins und damit zur Überwindung dieser Komplikation führen. Und schließlich ist bereits eine relativ geringe Expression des therapeutischen FIX-Proteins ausreichend, um eine schwerwiegende Hämophilie in eine intermediäre oder leichte Erkrankungsform zu überführen. Wir begannen unsere Untersuchungen mit dem hocheffektiven, aber nicht permanenten Adenovirus-Vektorsystem, arbeiteten sowohl mit nicht-hämophilen also auch mit hämophilen Versuchstieren und benutzten durchweg einen Vektor, der den humanen Gerinnungsfaktor (hFIX) kodiert. Das Humanprotein kann immunologisch gut von dem endogenen Mausprotein unterschieden werden, so dass für

Langzeitverläufe des Blutspiegels die in der Tierhaltung wesentlich einfacheren Nicht-Hämophilie-Tiere benutzt werden können.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem hFIX-Adenovirus-Vektor sind in der folgenden Abb. 23 zusammengefasst.



Diese Studie wurde an 3 Tiergruppen durchgeführt, von denen 2 Kontrollgruppen als adulte Tiere wiederholt intravenös entweder Human-Faktor IX (hFIX) oder den hFIX-exprimierenden Adenovirus erhielten. Die dritte Gruppe erhielt diesen Vektor zuerst in utero über die Dottersackvene und danach postnatal durch wiederholte i.v.-Injektion. Auf der linken Seite der Abb. ist das Verhalten von hFIX im Blutspiegel der einzelnen Tiere in diesen Versuchsgruppen dargestellt. Die rechte Seite zeigt das Verhalten der als Reaktion gegen das humane Fremdprotein auftretenden Anti-hFIX-Antikörper. Die Abszisse ist die Zeitachse (Tage nach der ersten Injektion am Tag 0). Die Pfeile unter der Achse markieren wiederholte Injektionen. Die zu verschiedenen Zeitpunkten übereinanderliegenden Karos repräsentieren den hFIX- bzw. Anti-hFIX-Antikörper-Spiegel bei den einzelnen Tieren am jeweiligen Untersuchungstag. Nach wiederholten Gaben des hFIX-Proteins an adulte Mäuse lässt sich bis zur 4. Injektion ein FIX-Blutspiegel nachweisen (Abb.23 oben). Nach der 5. Injektion kann nur noch bei einem Tier hFIX gefunden werden und nach der 6. Injektion ist es bei keinem Tier mehr nachweisbar. Das liegt am deutlich erkennbaren Anstieg der Anti-hFIX-Antikörper (Abb.23, rechte Seite oben), die das injizierte hFIX-Protein eliminieren. Dieses Verhalten spiegelt die nicht selten bei Blutern unter hFIX-Therapie beobachtete Therapie-Resistenz durch "Inhibitor"-Bildung wider. Wird zur Gabe des therapeutischen Proteins

ein hFIX-produzierender Adenovirus-Vektor benutzt, ist schon nach der zweiten Injektion kein hFIX mehr nachweisbar. Dagegen steigt der Antikörpertiter steil an (Abb.23 Mitte). Das ist nicht verwunderlich, da das Adenovirus als starkes Adjuvans die Immunreaktionen zusätzlich anregt. Auch bei den bisherigen klinischen Versuchen zur Gentherapie an erwachsenen Hämophilie-Patienten, haben solche Immunrektionen den Erfolg vereitelt. Wenn dagegen (Abb.23 unten) der gleiche Adenovirus-Vektor schon fetal verabreicht wird, ist zunächst ein guter hFIX-Spiegel nachweisbar, der entsprechend der transienten Natur dieses Gentherapie-Vektors langsam absinkt. Bei wiederholter Injektion nach über 200 Tagen ist wieder ein guter hFIX-Spiegel erreichbar, während ein nur kurzzeitiger und niedriger Antikörperspiegel nachweisbar ist. Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit unserer Hypothese, dass das unreife fetale Immunsystem das hFIX als "eigen" akzeptiert und dadurch die Ausbildung einer Immuntoleranz dieses Fremdproteins bewirkt.

Die durch die Kurzlebigkeit des Adenovirus-Vektors erforderliche wiederholte Dosierung ist natürlich therapeutisch ungünstig und so haben wir im nächsten Schritt das lentivirale Vektorsystem eingesetzt. Durch Integration dieses Vektors in das Genom der Zielzellen wird Persistenz des Vektors und eine Langzeitexpression mit diesem Vektor erreicht.

Analog zu dem schon in Abb. 15 gezeigten ß-Galaktosidase Lentivirus-Vektor, haben wir auch mit diesem hFIX-Lentivirus-Vektor eine klonale Expansion der genmanipulierten, hFIX-produzierenden Hepatozyten nachweisen können.

Abb. 24 zeigt den immunhistochemischen Nachweis des in den Maushepatozyten produzierten hFIX durch Braunfärbung des Zytoplasmas dieser Zellen, die als Zellcluster sich teilender Zellen erkennbar sind.

Abb. 24

LENTIVIRALER GENTRANSFER ZUR FETALEN LEBER

Human-FIXproduzierende Hepatozyten in FIX-KO-Maus

186 Tage nach intravaskulärer Applikation von hFIXexprimierendem Lentivirus-Vektor in utero

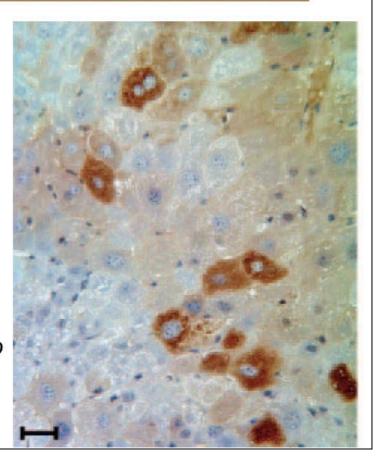
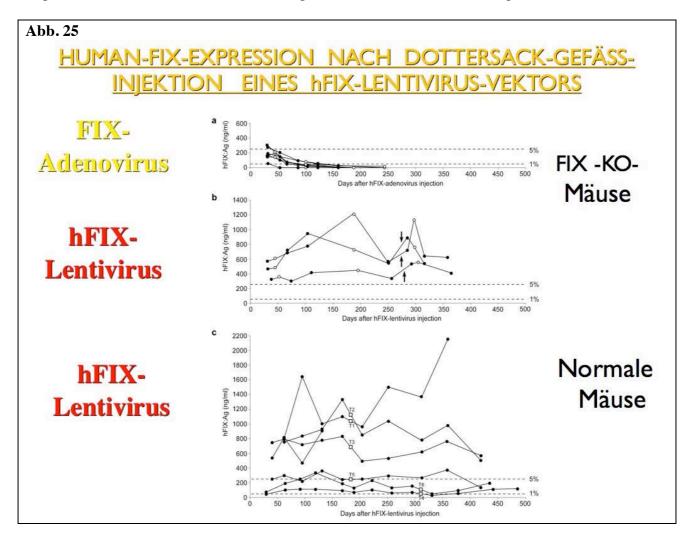


Abb. 25. zeigt die Langzeitstudie nach einmaliger *in-utero*-Injektion dieses Vektors an normalen und hämophilen (FIX-KO) Mäusen. Oben in der Abb. ist, zum Vergleich, das Verhalten des hFIX-Spiegels nach einmaliger hFIX-Adenovirus-Vektor-Applikation *in utero* gezeigt. Wie erwartet kommt es zu einem raschen Abfall des hFIX-Spiegels nach Injektion des hFIX-Adenovirus-Vektors. Im Gegensatz dazu können wir nach Injektion des lentiviralen Vektors bei beiden Versuchstiergruppen lebenslang einen therapeutischen hFIX-Spiegel nachweisen. Gestrichelt eingezeichnet sind die 1%- und 5%-Grenze des normalen hFIX-Spiegels. Das Erreichen des 1%-Wertes überführt eine schwere Hämophilie in eine intermediäre Form und bei 5% in eine milde Erkrankung. Durch Gerinnungstests bei den FIX-KO-Mäusen haben wir nachgewiesen, dass das durch den Gentransfer erzeugte Protein auch physiologisch aktiv ist und bei Erreichen eines Spiegels oberhalb 5% eine normale Gerinnung herbeiführt. Dies ist das bisher überzeugendste Experiment zum Nachweis einer lebenslangen kurativen *in-utero*-Gentherapie.



Welche möglichen Risiken birgt die in-utero-Gentherapie?

Zusammenfassend (Abb.26) haben die hier vorgestellten Experimente gezeigt,

- dass Gentransfer *in utero* eine sehr effektive und permanente Expression eines (therapeutischen) Fremdproteins ermöglicht
- dass klinisch erprobte minimal-invasive Technologien der Human-Fetalmedizin potentiell zur erfolgreichen *in-utero*-Genapplikation beim menschlichen Fetus genutzt werden könnten
- dass durch *in-utero*-Genapplikation ein Gentransfer in Stammzellen und eine klonale Expansion in deren Tochterzellen erfolgt
- dass durch *in utero* Genapplikation eine Toleranz gegen das (therapeutische) Fremdprotein erreicht werden kann und

- dass am Mausmodell erste experimentelle Nachweise für eine lebenslange kurative Gentherapie einer schweren genetischen Erkrankung durch *in-utero*-Genapplikation erbracht wurden.

Abb. 26

SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS EXPERIMENTELLEN MODELLEN

- Effektive in-utero-Vektor-Applikation u. Transgen-Expression
- <u>Technologien der Human-Fetalmedizin</u> ermöglichen effizienten Gentransfer in großen Tiermodellen <u>repräsentativ für menschlichen</u> Fetus
- Stammzell-Transduktion und klonale Expansion gezeigt
- Toleranzinduktion bestätigt
- Erste "proofs of principle" für <u>kurative in-utero-Gentherapie</u> genetischer Erkrankungen des Menschen in Tiermodellen

Vom rein technischen Standpunkt aus gesehen sind also die Voraussetzungen für einen klinischen Einsatz der *in-utero*-Gentherapie mit guten Erfolgsaussichten für ausgewählte Erkrankungen, wie z.B. die Hämophilien, durchaus gegeben. Dass bisher jedoch eine solche Anwendung weder erfolgt noch geplant ist, beruht im Wesentlichen auf der noch erforderlichen experimentellen Abklärung und Bewertung der bekannten und möglichen Risiken dieser potentiellen Therapie. Diese gehen über die bereits bekannten technischen Risiken von in-utero-Interventionen in der etablierten Fetalmedizin hinaus (Abb.27)

Im Vordergrund steht dabei vor allem die Frage, ob der fetale Gentransfer zur Störung der normalen fetalen Entwicklung führen könnte, ob er ein erhöhtes Risiko zur Keimbahntransmission der genetischen Veränderung in sich birgt und ob er Genotoxizität und/oder Onkogenese hervorrufen kann.

Risiko des Keimbahntransfers

Am häufigsten wird in diesem Zusammenhang das Risiko der Keimbahntransmission diskutiert, oft sogar mit der falschen Vorstellung, dass dies ein Ziel der fetalen Gentherapie sei. Hierzu muss

betont werden, dass die fetale somatische Gentherapie, wie die postnatale Gentherapie,

Abb. 27

RISIKEN DER IN-UTERO-GENTHERAPIE

- Bisher keine fetale Gentherapie beim Menschen geplant
- Risiken immer f

 ür Mutter und Fetus
- Risiken der Prozedur: Verletzungen
 - Infektionen
 - vorzeitige Wehen
 - Absterben des Feten
- Potentielle spezifische Risiken
- Maternaler Gentransfer geringes, gut überschaubares Risiko
- Interferenz des transgenen Proteins mit normaler fetaler Entwicklung
- Erhöhtes Risko für Onkogenese oder Keimbahntransmission

ausschließlich der Behandlung des individuellen, erkrankten Patienten, nicht seiner Nachkommen dient! Es geht also bei diesen Untersuchungen darum, auszuschließen, dass ein unbeabsichtigter Gentransfer in die Keimzellen des Patienten erfolgt. Da die Keimzellen zum Zeitpunkt einer inutero-Gentherapie bereits in Hoden bzw. Eierstöcken kompartimentiert sind, ist die Gefahr des unbeabsichtigten hämatogenen oder topischen Gentransfers nicht größer als bei der postnatalen Gentherapie. In Hoden und Eierstöcken von Schafen und Affen sind nach topischer in-utero-Applikation in die Bauchhöhle durch sehr aufwendige Mikrodissektions- und immunhistochemische Analysen vereinzelt genetisch veränderte Keimzellvorläufer nachgewiesen worden 11,12, jedoch ist in gezielt mit dieser Fragestellung durchgeführten Untersuchungen nach fetaler oder postnataler Gentherapie an Nagern und Schafen keine Transmission in nachfolgende Generationen gefunden worden. Im Gegensatz zu den ungezielten und daher nicht nachweisbaren Veränderungen der Keimbahn, die spontan, durch Umweltgifte oder durch medizinische Eingriffe wie Röntgen- bzw. Chemotherapie auftreten, ist der Nachweis der definierten sequenzspezifischen Gentherapiekonstrukte möglich und sollte daher auch bei diesen Untersuchungen durchgeführt werden. Selbst wenn aber eine Transmission in Keimzellen nachgewiesen werden sollte, muss eine Bewertung unter strenger Abschätzung von Nutzen und Risiko der Transmission einer therapeutischen Gensequenz für den behandelten Patienten und nachfolgende Generationen erfolgen. Dabei sollte auch berücksichtigt werden, dass selbst ein Nachweis der therapeutischen Gensequenz in Keimzellen des behandelten Patienten nicht bedeutet, dass alle Keimzellen betroffen sind oder dass auf Nachkommen verzichtet werden muss. Ein solcher Gentransfer in-utero wird voraussichtlich nur einen geringen Prozentsatz der reifen Keimzellen betreffen. Daher ist das Risiko der Weitergabe der therapeutischen Gensequenzen an Nachkommen schon von vornherein sehr gering und kann darüber hinaus noch durch *ex-vivo-*Fertilisation und Präimplantationsdiagnostik, durch Pränataldiagnostik oder durch Schwangerschaftsverhütung verhindert werden.

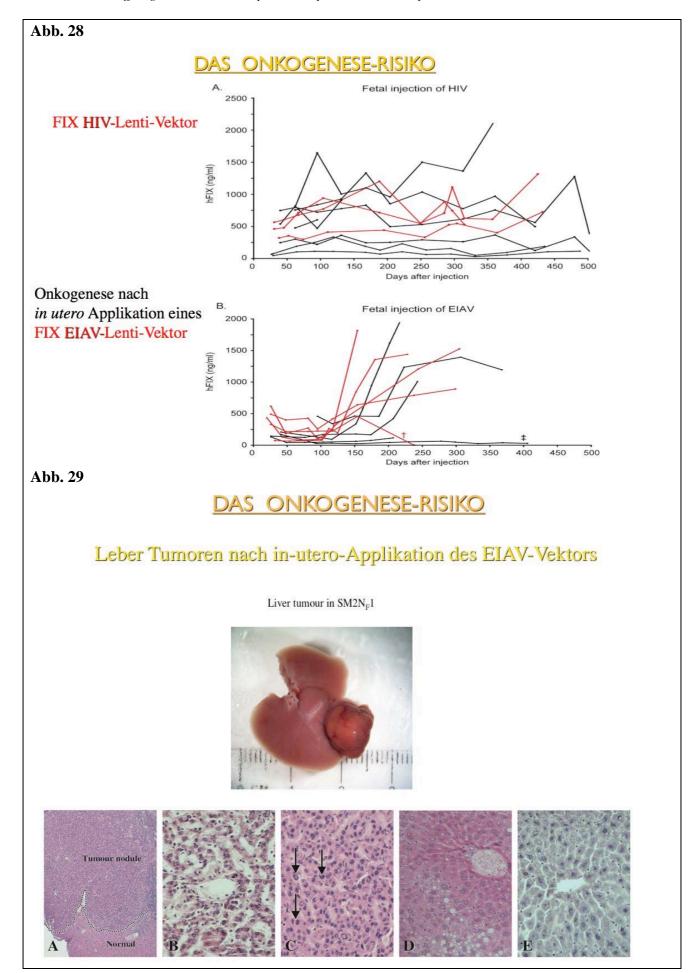
Risiko der Störung der normalen fetalen Entwicklung

Es wird kaum möglich sein generell auszuschließen, dass ein transgenes Genprodukt mit bekannter postnataler Funktion eine unbekannte (schädliche) Wirkung bei *in-utero*-Expression während der sehr dynamischen Prozesse der fetalen Zelldifferenzierung und Organogenese haben könnte. Solche Effekte wären vermutlich für das jeweilige Protein spezifisch und sehr schwer vorauszusagen. Sie könnten vermutlich auch vom fetalen Entwicklungsstadium und der Stärke ihrer Expression abhängen. Am ehesten wären solche Effekte für Proteine auszuschließen, bei denen eine fetale Expression schon natürlicherweise stattfindet, oder deren Zielzelle, Expressionshöhe und - Zeit durch die eine Vektorkonstruktion exakt reguliert werden könnte. In jedem Fall erfordert dieses Problem noch weitere tierexperimentelle Untersuchungen mit dem jeweiligen Protein, obwohl möglicherweise trotzdem nicht alle potentiellen Gefahren für den menschlichen Feten aufgedeckt werden können.

Risiko eine erhöhten Anfälligkeit zur Onkogenese

Dass integrierende Gentherapievektoren zur Tumorentwicklung führen können, ist durch das Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen bei 5 der 21 bisher durch Gentherapie mit Retrovirus-Vektoren von der tödlichen Immundefizienz (X-SCID) geheilten Kindern gezeigt worden. Bei vier von ihnen konnten diese Tumorzellen erfolgreich mit Chemotherapie eliminiert werden. Dieses Risiko gilt primär für integrierende Vektorsysteme. Ihr Onkogenesepotential ergibt sich aus ihrem relativ zufälligen Einbau in das Wirtsgenom mit Bevorzugung aktiver Gene. Sie können dadurch entweder potentiell tumorerzeugende Gene aktivieren oder tumorhemmende Gene inaktivieren. Bekanntlich regulieren diese Gene physiologische Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Viele von ihnen sind besonders in der Fetalperiode aktiv und daher bevorzugte Integrationsorte der Gentransfer-Vektoren. Es ist also denkbar, dass Gentherapie mit integrierenden Vektoren in der Fetalperiode besonders anfällig für die Induktion von Tumoren sein könnte.

Wir wurden auf dieses Risiko für die fetale Gentherapie bei Verwendung eines spezifischen, vom Pferdeanämie-Lentivirus (EIAV) abgeleiteten, hFIX-Vektors aufmerksam: Etwa 100 Tage nach der in-utero-Injektion stieg der Faktor IX-Blutspiegel plötzlich bei fast allen in utero oder neonatal behandelten Tieren dramatisch an (Abb. 28). Bei näherer Untersuchung fanden wir makroskopisch und histologisch Lebertumoren bei diesen Tieren. 13 (Abb. 29). Der Zeitpunkt von 100 Tagen entspricht etwa dem mittleren Lebensalter dieser Mäuse. Tumorentwicklung wurde auch mit einem ß-Galaktosidase exprimierenden EIAV -Vektor beobachtet. Dagegen traten keine Tumoren bei Verwendung des HIV-Vektors, mit dem wir die lebenslange Heilung der Hämophilie-Mäuse erreicht haben (Abb. 22), auf. Offenbar birgt die in-utero-Applikation eines integrierenden Vektors, zumindest im Mausmodell ein Onkogenese-Risiko, das bei Überlegungen zur Anwendung beim Menschen in Rechnung gestellt werden muss. Dass der HIV-Vektor keine Tumorbildung induzierte, ist von prinzipiellem Interesse, da die molekularen Unterschiede zwischen diesen beiden Lentivirus-Vektoren (EIAV und HIV) uns Hinweise auf den Mechanismus der Onkogeneseinduktion und zur Konstruktion sicherer Vektoren geben. Das Problem sicherer Gentherapievektoren wird weltweit sehr intensiv von vielen Gruppen bearbeitet. Hierbei spielen Testsysteme, in denen die Effekte von Vektormodifikationen verfolgt werden können, eine wichtige Rolle. Wir meinen, dass das fetale Maussystem ein sehr gutes und empfindliches in-vivo-Testsystem für derartige Untersuchungen darstellt.



Risiko von Unwirksamkeit oder Schaden

Das aus meiner Sicht wichtigste Risiko einer Anwendung der fetalen Gentherapie beim Menschen ist das des Versagens der Gentherapie oder der Schädigung des behandelten Feten und künftigen Kindes (Abb.30).

Abb. 30

SPEZIFISCHE RISIKEN DER FETALEN GENTHERAPIE

- Risiko von Unwirksamkeit oder Schaden
 - Schwangerschaftsabbruch relativ sichere Option im Umgang mit schwerwiegenden oder letalen genetischen Erkrankungen
 - Diese <u>Option existiert postnatal nicht</u> daher wird jede hoffungsvolle Therapie akzeptiert.
 - Dagegen von in-utero-Gentherapie gefordert
 - die Erkrankung verlässlich zu verhindern
 - zusätzlichen Schaden zu vermeiden
- Risikobewertung in klinischer Einführungsphase
 - Besondere <u>Sorgfalt</u> bezüglich <u>informierter mütterlicher/elterlicher</u>

 <u>Zustimmung</u> nach intensiver Beratung zum <u>Verstehen von Nutzen und</u>

 Risiko
- Notwendigkeit eines

Langzeit-Primatenmodels zur Effizienz- und Risiko-Abschätzung

Solange es für die in Frage kommenden schweren genetisch-bedingten Erkrankungen keine befriedigenden alternativen Therapien gibt, können die voraussehbaren schwerwiegenden Probleme der Betreuung eines schwerstgeschädigten Kindes durch eine Schwangerschaftsunterbrechung aus medizinischer/sozialer Indikation sicher vermieden werden. Das ist ein wesentlicher Unterschied zur postnatalen Gentherapie, die gegenwärtig vor allem ein letzter Versuch zur Behandlung oder zur Lebensverlängerung bei schweren Erkrankungen ist, nachdem alle herkömmlichen therapeutischen Möglichkeiten ausgeschöpft sind. Hier wird also die Erfolgsschwelle wesentlich niedriger angesetzt als bei der *in-utero-*Gentherapie.

Bevor eine klinische Anwendung der fetalen Gentherapie ernsthaft in Erwägung gezogen werden kann, sind daher weitere Untersuchungen zur Einschätzung der dargestellten potentiellen Risiken für die in Erwägung gezogenen Erkrankungen unbedingt erforderlich.

Hierfür wäre auch die Nutzung eines Primatenmodels, das der menschlichen Situation weitgehend nahe kommt und auch eine lebenslange Beobachtung der behandelten Tiere ermöglicht, besonders geeignet. Die Arbeiten eines Teams meiner früheren Mitarbeiter und Kooperationspartner⁷, die an einer Gruppe von 13 Rhesusaffen nach intravenöser *in-utero-*Applikation von neuartigen hFIX-AAV-Vektoren über 1 Jahr einen hFIX-Blutspiegel von etwa 100% des Normalwertes in den behandelten Tieren ohne Nebenwirkungen nachweisen konnten, ist ein hoffnungsvoller Schritt in diese Richtung.

Ausblick

Vorausgesetzt, die erwähnten Risiken können weitgehend objektiviert und vermindert werden, würde eine *in-utero*-Gentherapie aus heutiger Sicht vor allem bei schweren lebensbedrohlichen

monogen-bedingten genetischen Erkrankungen, für die keine kurative postnatale Therapie existiert, indiziert sein. Der genetische Status des Feten sollte durch pränatale DNA-Diagnose gesichert sein und die beabsichtigte Gentherapie, entsprechend unseren gegenwärtigen unvollkommenen Möglichkeiten, keine Feinregulation der Genexpression erfordern.

Abb. 31

KLINISCHE PERSPEKTIVE?

- Mögliche Kandidaten für erste fetale Human-Gentherapie:
 Schwere früh-manifestierende genetische Erkrankungen in Familien, die Schwangerschaftsabbruch ablehnen
- Fortschritte in der Entwicklung der postnatalen, fetalen Gen-/ Zelltherapie u. konventioneller Therapien werden wesentliche Entscheidungsfaktoren
- <u>Effektive therapeutische Ansätze</u> für schwerwiegende genetische Erkrankungen <u>noch in den Anfängen</u>
 Verschiedenheit und Komplexität verlangen <u>krankheitsspezifische</u> <u>Ansätze</u> - durch Arzneimittel-, Gen-, oder Zell-Therapeutika

Keine Wunderdrogen - Niemand kann voraussagen, welcher Ansatz für welcher Erkrankung wirksamer sein wird

Bis dahin:

"anything goes" solange wissenschaftlich solide und ethisch akzeptabel

- die fetale Gentherapie gehört in dieses potentielle Arsenal

Frühmanifestierende Speicherkrankheiten mit neurologischer Beteiligung wie beispielsweise die Mucopolysacharidose Gaucher oder die Sphingomyelose Tay Sachs sind denkbare Erkrankungen, die für eine in-utero-Gentherapie in Frage kommen. Günstig wären Krankheitsbilder, bei denen der Erfolg der Therapie durch biochemische Tests bereits intrauterin verfolgt und bei Misserfolg gegebenenfalls noch eine Schwangerschaftsunterbrechung durchgeführt werden könnte. Wahrscheinlich würden sich in der Einführungsphase vor allem Familien, die einen Schwangerschaftsabbruch ablehnen, aber in der Gentherapie die letzte Hoffnung sehen, ein gesundes Kind zu bekommen, zu einem klinischen in-utero-Gentherapie-Versuch bereitfinden. Diese Situation stellt besonders hohe Anforderungen an die Qualität der Information solcher Familien über den erhofften Nutzen und die möglichen Risiken sowie an die Prüfung ihres Verständnisses dieser Information. Ebenso wichtig ist die Gewährleistung der Freiheit dieser Familien, jederzeit aus einem solchen klinischen Versuch auszuscheiden, auch durch eine Schwangerschaftsunterbrechung innerhalb medizinisch vertretbarer Termine (Abb.31). Vom Erfolg solcher ersten klinischen Versuche wird es abhängen, ob die pränatale Gentherapie eine breitere Anwendung eventuell auch für weniger gravierende genetische Erkrankungen findet. Neben ihrer Einfachheit und Effektivität werden dabei vor allem die Entwicklung und Effektivität anderer postnatal anwendbarer Therapieformen wie neue medikamentöse Verfahren, Zelltherapie oder postnatale Gentherapie eine wesentliche Rolle spielen. Vom Prinzip her wäre eine pränatale

Gentherapie wahrscheinlich auch einfacher als die Embryoselektion nach *in-vitro*-Präimplantationsdiagnostik, für die die Kenntnis der genetischen Belastung der Familie vor der Konzeption bekannt sein muss. Die Entwicklung von krankheitsspezifischen Therapieansätzen für genetische Erkrankungen hat gerade erst begonnen, welche Therapie sich für welche Erkrankung am besten bewährt, ist nicht abzusehen und so sollte die *in-utero*-Gentherapie als Teil unseres potentiellen Behandlungsarsenals erhalten und weiterentwickelt werden.

- Coutelle C, Speer A. Genomics in the German Democratic Republic. Genomics 1990;8:182 Example 1. Genomics 1990;8:182-
- 2. Jung U, Urner U, Grade K, Coutelle C. Acceptability of carrier screening for cystic fibrosis during pregnancy in a German population. Hum Genet 1994;94:19-24.
- 3. Coutelle C, Douar A-M, College WH, Froster U. The challenge of fetal gene therapy. Nature Med 1995;1:864-6.
- 4. David A, Themis M, Waddington S, Gregory L, Buckley S, Nivsarkar M, Cook T, Peebles D, Rodeck CH, Coutelle C. The current status and future direction of fetal gene therapy. Gene Therapy & Molecular Biology 2003;7:181-209.
- 5. Tarantal AF, O'Rourke JP, Case SS, et al. Rhesus monkey model for fetal gene transfer: studies with retroviral- based vector systems. Mol Ther 2001;3:128-38.
- 6. Tarantal AF, Lee CC. Long-term luciferase expression monitored by bioluminescence imaging after adeno-associated virus-mediated fetal gene delivery in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Hum Gene Ther 1020;21:1-6.
- 7. Mattar C, Nathwani AC, Dighe N, Waddington S, McIntosh J, Biwas A, Fisk N, Davidoff AM, David A, Peebles D, Novrouzi A, Käppel C, Schmidt M, Choolani M, Chan J. Late gestation intravascular delivery of selfcomplementary AAV leads to sustained transgene expression with the possibility of vector integration events in the liver. BSGT Oral presentation OR9. Hum Gene Ther 2010:21:496-506.
- 8. Coutelle C, Themis, M, Waddington, SN, Buckley, SM, Gregory, LG, Nivsarkar, MS, David AL, Peebles D., Weisz B, Rodeck C. Gene therapy progress and prospects: fetal gene therapy--first proofs of concept--some adverse effects. Gene Ther 2005;12:1601-7.
- 9. Waddington S, Nivsarka M, Buckley S, Lawrence L, Cook T, Allaf F, Coutelle C, Themis M. Long-term postnatal β-galactodsidase expression in transduced hepatocytes of immunocompetent mice after *in utero* delivery of an EAIV derived lentiviral vector via the yolk sac vessels. Gene Ther 2003;10:1234-40.
- 10. Waddington S, Nivsarkar, M., Mistry, A, Buckley, S MK, Al-Allaf, F, Bigger, B, Holder, M, Kemball-Cook, G,. Mosley, KL, Brittan M, Ali R, Gregory L, Cook H T, Thrasher A, Tuddenham EGD, Themis M, Coutelle, C. Permanent phenotypic correction of Haemophilia B in immunocompetent mice by prenatal gene therapy. Blood 2004;104: 2714-21.
- 11. Porada CD, Park, PJ, Tellez J, Ozturk F, Glimp HA. Almeida-Porada G, Zanjani ED. Male Germ-Line Cells Are at Risk Following Direct-Injection Retroviral-Mediated Gene Transfer in Utero. Mol Ther 2005;12:754-62.
- 12. Lee CC, Jimenez DF, Kohn DB, Tarantal AF. Fetal gene transfer using lentiviral vectors and the potential for germ cell transduction in rhesus monkeys (Macaca mulatta). Hum Gene Ther 2005;16:417-25.
- 13. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, von Kalle C, Wang Y, Al-Allaf F, Gregory L, Nivsarkar M, Themis M, Holder M, Buckley SMK, Dighe N, Ruthe A, Mistry A, Bigger B, Rahim A, Nguyen TH, Trono D, Thrasher AJ, Coutelle C. Oncogenesis following delivery of a non-primate lentiviral gene therapy vector to fetal mice. Mol Ther 2005;12:763-71.