

Gentherapie in der Molekulargenetik mit verschiedenen Klonierungsvektoren

Gentherapie ist eine Technik zum Einbringen des genetischen Materials eines Gens in einen Patienten, dem dieses Gen aufgrund einer Mutation fehlt. Es gibt verschiedene Arten von Viren, die als Vektor für die Gentherapie beim Menschen verwendet werden, darunter Retrovirus, Adinovirus, Lentiviren, Pockenviren und Herpesviren. Sowohl gesunde als auch Krebszellen können ein Ziel sein. Beispiel für das Targeting gesunder Zellen. Eine Möglichkeit besteht darin, ein fehlendes oder verändertes Gen durch ein „normales“ Gen zu ersetzen. Beispiel für das Targeting von Krebszellen. Wissenschaftler können Krebszellen mit Genen angreifen, die zur Zerstörung der Zellen verwendet werden können. Bei dieser Technik werden Krebszellen in sogenannte „Suizidgene“ eingeführt. Die Gentherapie in Keimbahnzellen hat das Potenzial, nicht nur das Individuum, sondern auch seine Kinder zu beeinträchtigen. Alle genetischen Veränderungen in den Fortpflanzungszellen oder Veränderungen am Embryo vor dem Stadium der Differenzierung würden alle zukünftigen Nachkommen dieser Person betreffen. Dies ist eine wichtige Unterscheidung, die sich auf wichtige ethische Fragen auswirkt. Keimbahntherapie (wie Spermien, Eizellen und deren Stammzellvorläufer.

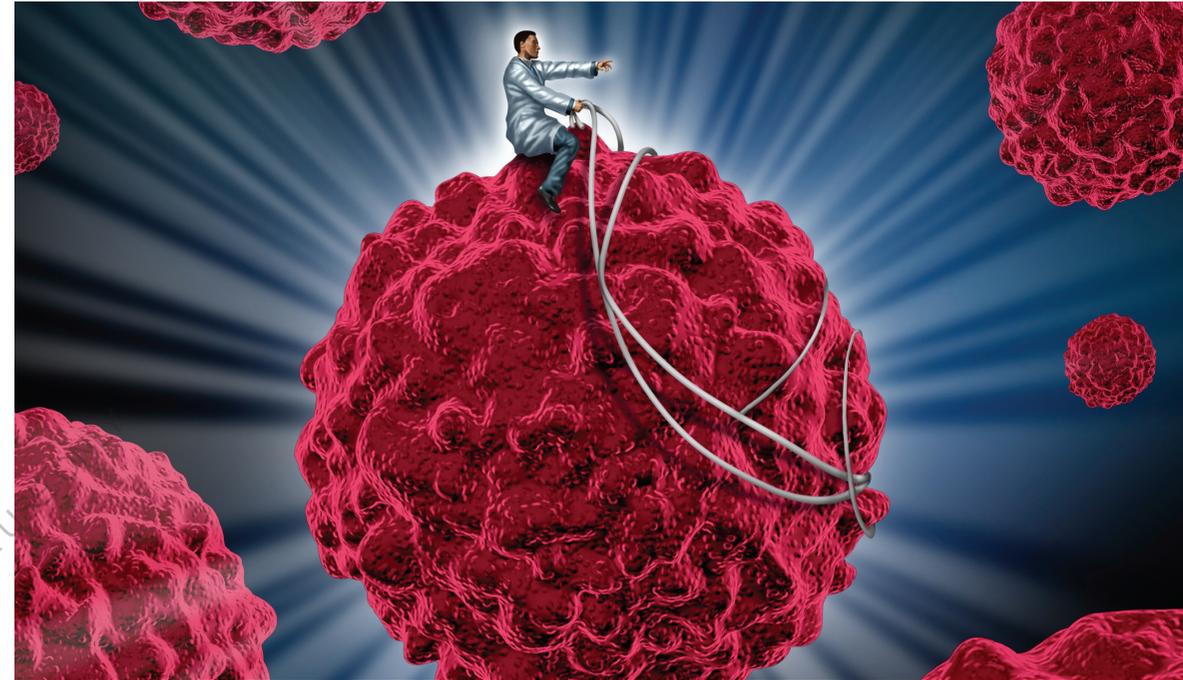


Sie ist ein Ph.D. in Biotechnologie, mit Mikrobiologie, Gentechnik, Molekulargenetik und Protein-Engineering, Forscher, Schöpfer, Erfinder und Autor, Lehrer am University College der Al-Turath University College, einem Bachelor-Abschluss in Mikrobiologie und einem Master-Abschluss in Molekularbiologie in Mikrobiologie von Al-Mustan.



- VERLAG -
Unser Wissen

Nebras Rada Mohammed



Nebras Rada Mohammed

Gentherapie in der Molekulargenetik mit verschiedenen Klonierungsvektoren

Gentherapie mit medizinischen Anwendungen beim Menschen

Nebras Rada Mohammed

**Gentherapie in der Molekulargenetik mit verschiedenen
Klonierungsvektoren**

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

Nebras Rada Mohammed

Gentherapie in der Molekulargenetik mit verschiedenen Klonierungsvektoren

**Gentherapie mit medizinischen Anwendungen
beim Menschen**

FOR AUTHOR USE ONLY

ScienciaScripts

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

This book is a translation from the original published under ISBN 978-620-5-50924-1.

Publisher:

Scientia Scripts

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L Publishing group
Str. Armeneasca 28/1, office 1, Chisinau-2012, Republic of Moldova, Europe

Printed at: see last page

ISBN: 978-620-5-34646-4

Copyright © Nebras Rada Mohammed

Copyright © 2022 Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L
Publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

**Gentherapie in der Molekulargenetik mit
verschiedenen Klonierungsvektoren bei
Menschen mit chronischen Krankheiten
und Krebs**

Untertitel

**Gentherapie mit medizinischen
Anwendungen beim Menschen**

Unter

Nebras Rada Mohammed

Al-Turath Universität Hochschule

Abteilung Biomedizinische Technik

Irak

Inhaltsübersicht

Kapitel 1	8
Kapitel 2	14
Kapitel 3	32
Kapitel 4	58
Kapitel 5	85
Kapitel 6	91
Kapitel 7	129

FOR AUTHOR USE ONLY

Über den Autor



Nebras Rada Mohammed

Sie ist eine Ph.D. in Biotechnologie mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Gentechnik, Molekulargenetik und Proteintechnik, Forscherin, Schöpferin, Erfinderin und Autorin, Lehrerin an der Hochschule der Universität Al-Turath, Bachelor-Abschluss in Mikrobiologie und Master-Abschluss in Molekularbiologie an der Universität Al-Mustansiriya, Schiedsrichterin, internationale Residentin und Beraterin in medizinischen Laboratorien, Expertin in medizinischen Laboratorien und Trägerin des Titels eines wissenschaftlichen Projekts, ein Schiedsrichter, ein angesehener Verleger, ein silberner Unterstützer wissenschaftlicher Plattformen, ein Vorsitzender eines Komitees in einer wissenschaftlichen Gesellschaft, der Auszeichnungen von internationalem geistigem Eigentum, den Best Arab Woman Award 2020, auch den Best Community Personality Award, den Best Research Award 2019, auch den Best Research Award 2020 und einen

American Award For the invention of 2020 von der amerikanischen GUIDY the World Investment Commission in America erhält.

FOR AUTHOR USE ONLY

Vorwort

Die Gentherapie ist eine Technik zur Einführung des genetischen Materials eines Gens in einen Patienten, dem dieses Gen aufgrund einer Mutation fehlt.

Vektoren: Mit Hilfe von Vektoren wird das "normale" Gen in die Zellen des Patienten eingebracht. Es gibt verschiedene Arten von Viren, die als Vektoren für die Gentherapie beim Menschen verwendet werden, darunter Retroviren, Adinoviren, Lentiviren, Pockenviren und Herpesviren.

Sowohl gesunde als auch Krebszellen können ein Ziel sein. Gesunde Zellen als Ziel. Eine Möglichkeit besteht darin, ein fehlendes oder verändertes Gen durch ein "normales" zu ersetzen. Beispiel: Krebszellen. Wissenschaftler können Krebszellen gezielt mit Genen versehen, die zur Zerstörung der Zellen eingesetzt werden können. Bei dieser Technik werden den Krebszellen so genannte "Selbstmordgene" zugeführt.

Eine Gentherapie in Keimbahnzellen kann sich nicht nur auf die Person selbst, sondern auch auf deren Kinder auswirken. Jede genetische Veränderung in den Keimzellen oder jede Veränderung am Embryo vor dem Stadium der Differenzierung würde sich auf alle künftigen Nachkommen

dieser Person auswirken. Dies ist ein entscheidender Unterschied, der wichtige ethische Fragen berührt.

Keimbahntherapie (z. B. Spermien, Eizellen und deren Stammzellvorläufer). Die Keimbahntherapie beim Menschen ist nach wie vor höchst umstritten. Damit das eingeführte Gen normal an die Nachkommen weitergegeben werden kann, muss es nicht nur in die Zelle eingeführt, sondern auch durch genetische Rekombination in die Chromosomen eingebaut werden.

Krebs-Gentherapie mit Tumorsuppressorgen, Gentherapie in Kombination mit Strahlentherapie, so dass sie Lungenkrebs bei 19 verschiedenen Patienten behandeln können. Intratumorale Nadelinjektionen von Ad-p53 an den Tagen 1, 18 und 32 der Behandlung.

Ex-vivo-Manipulationstechniken, die auf die in Kultur gezüchteten Zellen übertragen werden, wobei die transformierten Zellen ausgewählt, vermehrt und dann in den Patienten eingebracht werden. Vermeidet die Abstoßung durch das Immunsystem Gewebe wie hämatopoetische Zellen und Hautzellen, die aus dem Körper entfernt werden können.

1. Elektroporation

2. Liposomen
3. Kalziumphosphat
4. Goldkugeln (abgefeuert in einer mit Helium gefüllten Pistole)
5. Retro-Transposons (springende Gene - Frühzeit)
6. Künstliche menschliche Chromosomen.

FOR AUTHOR USE ONLY

Kapitel 1

Gentherapie

Die Gentherapie ist eine Technik zur Einführung des genetischen Materials eines Gens in einen Patienten, der an einem Gendefekt leidet, weil eine Mutation im Gen auftritt.

Die Gentherapie ist eine Technik zur Einführung des genetischen Materials eines Gens in einen Patienten, dem dieses Gen aufgrund einer Mutation fehlt.

Vektoren: Das "normale" Gen wird mit Hilfe von Vektoren in die Zellen des Patienten eingebracht.

Die häufigsten Vektoren, die in der Gentherapie verwendet werden, sind Virusvektoren

Warum Viren?

Im Laufe der Evolution haben sich Viren so entwickelt, dass sie die Zellen mit großer Spezifität infizieren. Viren sind in der Regel sehr effizient bei der Transfektion ihrer eigenen DNA in das Genom der Wirtszelle. Dies ermöglicht ihnen die Produktion neuer Viruspartikel in der Zeit der Zellsynthese.

Arten von Viren

1-Retrovirus

2-Adinovirus

3-Lentiviren

4-Pockenviren

5- Herpesviren

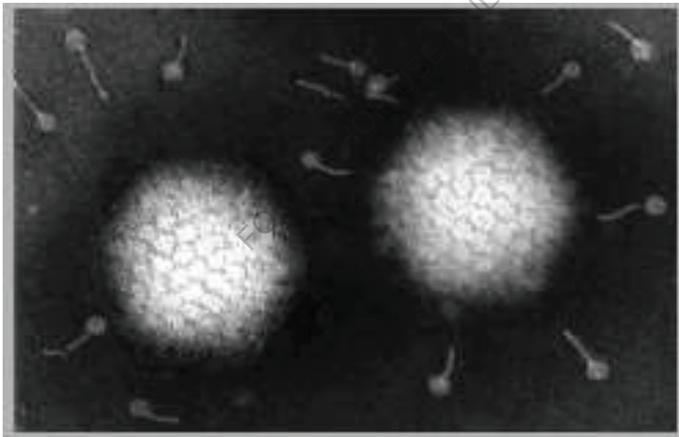


Abbildung (1): Adenovirus

Adenovirus

Doppelsträngiges DNA-Genom, 36 kb. Eintritt über CAR-Rezeptor und Integrin-Korezeptor. "Darmlos"; Helfer-abhängig; Minimale Ad.

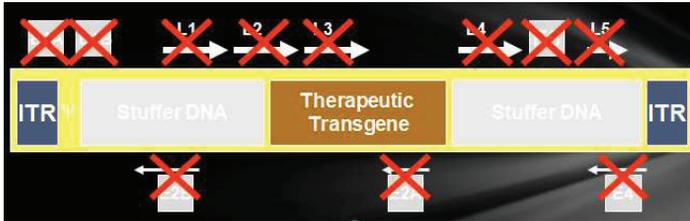


Abbildung (2): Adenoviraler Vektor der neuesten Generation.

Welcher Virus soll verwendet werden?

Abhängig von

- Wie gut sie die Gene auf die Zellen übertragen.
- Welche Zellen sie erkennen und infizieren können.
- Ob sie die DNA der Zelle dauerhaft oder vorübergehend verändern.

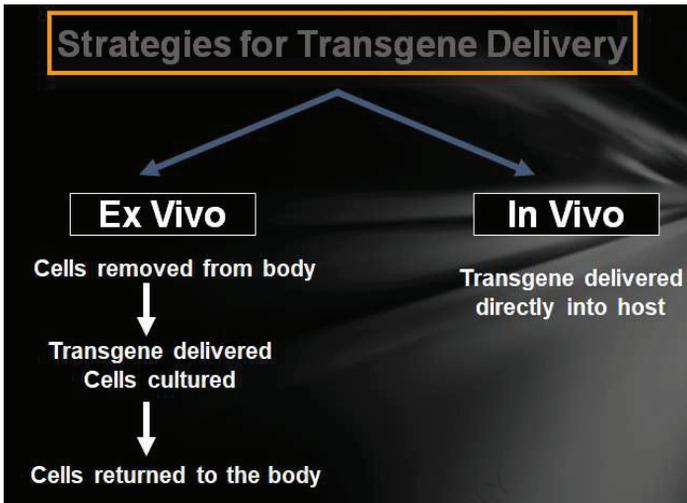


Abbildung (3): Strategien für die Übertragung von Transgenen.

Welche Zellen sind die Zielzellen?

Sowohl gesunde als auch krebsartige Zellen können ein Ziel

Ex von Targeting Gesunde Zellen

- Eine Möglichkeit besteht darin, ein fehlendes oder verändertes Gen durch ein "normales" Gen zu ersetzen.

Ex der gezielten Bekämpfung von Krebszellen

- Wissenschaftler können Krebszellen gezielt mit Genen versehen, die zur Zerstörung der Zellen eingesetzt werden können. Bei dieser Technik werden den Krebszellen so genannte "Selbstmordgene" zugeführt.

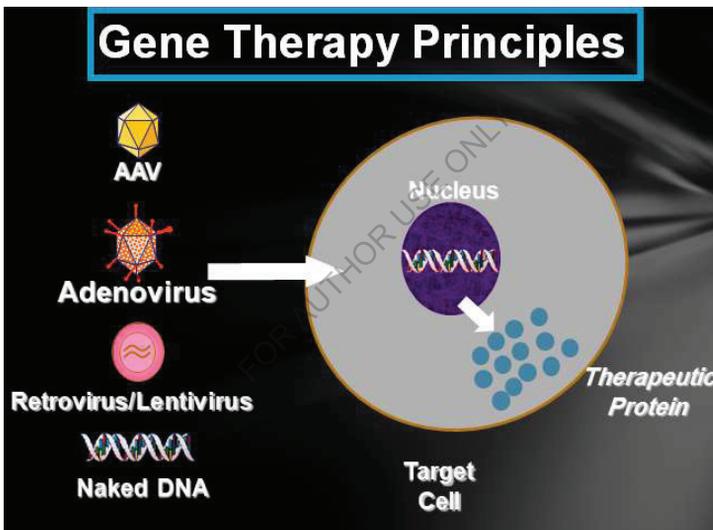


Abbildung (4): Grundsätze der Gentherapie.

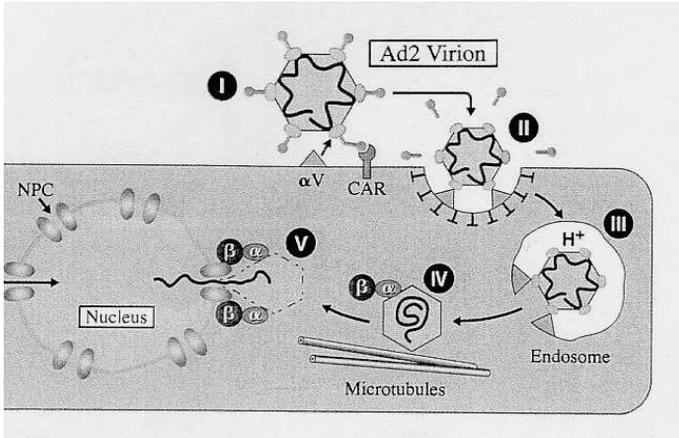


Abbildung (5): Eintritt des Adenovirus in die Zelle.

FOR AUTHOR USE ONLY

Kapitel 2

Tumor-Antigene

ist eine antigene Substanz, die in Tumorzellen produziert wird und eine Immunreaktion im Wirt auslöst. Tumorantigene sind nützliche Tumormarker bei der Identifizierung von Tumorzellen mit diagnostischen Tests und können in der Krebstherapie eingesetzt werden, um die Immunreaktion des Wirts gegen die so genannten Tumorantigene zu verstärken, indem virale Strategien durch Übertragung von Tumorantigenen die genetische Information eines Proteins in voller Länge liefern.

Tumorantigene lassen sich in zwei Hauptkategorien einteilen:

Die erste Kategorie sind die von viralen Genomen kodierte Antigene, die attraktive Ziele für einen immuntherapeutischen Angriff darstellen. Die Zellen, die auf diese Antigene reagieren können, sollten nicht durch zentrale toleranzinduzierende Mechanismen aus dem Repertoire entfernt worden sein, so dass die Beeinträchtigung durch

andere Faktoren (wie periphere Toleranz oder Escape-Mechanismen) theoretisch minimal ist. Der Erfolg der EBV-Therapie bei Transplantationspatienten und der HPV-Therapie bei Patienten mit Gebärmutterhalskrebs zeigt, dass diese Art der Reaktion unter idealen Bedingungen tatsächlich wirksam sein kann.

Bei der zweiten Kategorie von Antigenen handelt es sich um Selbstantigene, die durch genetische Veränderungen verändert und durch Überexpression sichtbar gemacht werden, wenn Tumore während des Prozesses der malignen Transformation multiple Mutationen akkumulieren und Behandlungsziele darstellen. Eine klinische Wirkung wurde mit pockenviralen Vektoren, die MUC1 tragen, beobachtet.

Klassifizierung von Tumorantigenen

Ursprünglich wurden Tumorantigene anhand ihres Expressionsmusters grob in zwei Kategorien eingeteilt:

- Tumor-spezifische Antigene (TSA), die nur auf Tumorzellen und nicht auf anderen Zellen vorhanden sind.

- Tumor-assoziierte Antigene (TAA), die auf einigen Tumorzellen und auch auf einigen normalen Zellen vorhanden sind.

Diese Klassifizierung ist jedoch unvollkommen, da sich herausstellte, dass viele Antigene, von denen man annahm, sie seien tumorspezifisch, auch auf einigen normalen Zellen exprimiert werden. Die moderne Klassifizierung von Tumorantigenen basiert auf ihrer molekularen Struktur und ihrem Ursprung.

Ersetzen defekter Gene (p53, BRCA1, RB, p16). Zu den Genen, die bei Krebs mutiert oder gestrichen sind, gehören die Krebsanfälligkeitsgene p53 und BRCA1. p53 und BRCA1 scheinen Krebszellen zu hemmen, denen Mutationen in diesen Genen fehlen, so dass so genannte Genkorrekturstrategien ein größeres Potenzial haben könnten als zunächst angenommen. p16, auch MTS1 (multiple tumor suppressive gene 1) genannt, ist bekanntlich ein wichtiges Tumorsuppressor-Gen, insbesondere bei nicht kleinzelligem Lungenkrebs. Über 900 Patienten wurden bereits mit Gentransferprodukten behandelt.

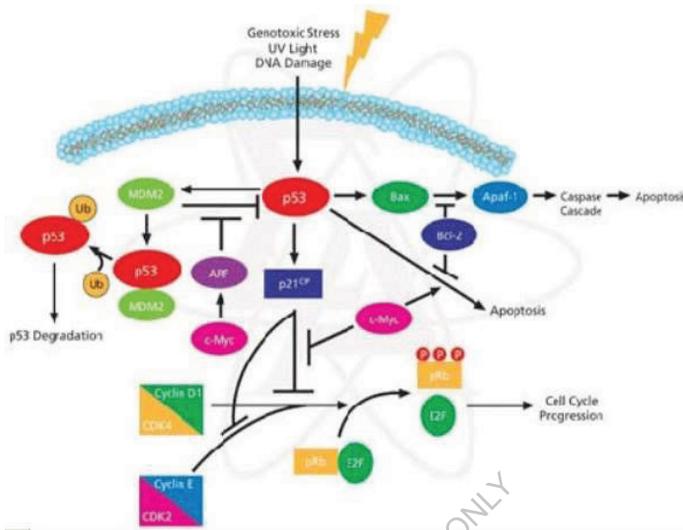


Abbildung (6): p53-Weg.

Was Gene bewirken können

Gene, die auf Chromosomen getragen werden, sind die grundlegenden physischen und funktionellen Einheiten der Vererbung. Gene sind spezifische Sequenzen von Basen, die Anweisungen für die Herstellung von Proteinen kodieren. Es sind die Proteine, die die meisten Lebensfunktionen ausführen und sogar den Großteil der zellulären Strukturen ausmachen.

Warum genetische Störungen

Wenn Gene so verändert sind, dass die kodierten Proteine ihre normalen Funktionen nicht mehr erfüllen können, kann es zu genetischen Störungen kommen.

Jeder von uns trägt einige defekte Gene in sich, einige offensichtlich und viele nicht offensichtlich.

- Jeder von uns trägt etwa ein halbes Dutzend defekter Gene in sich.
- Wir sind uns dessen glücklicherweise nicht bewusst, es sei denn, wir oder einer unserer nahen Verwandten gehören zu den vielen Millionen, die an einer genetischen Krankheit leiden.

Etwa jeder zehnte Mensch hat oder wird zu einem späteren Zeitpunkt eine genetische Erbkrankheit entwickeln, und es ist bekannt, dass etwa 2 800 spezifische Erkrankungen durch Defekte (Mutationen) in nur einem der Gene des Patienten verursacht werden.

Wir erben von den Eltern

- Die meisten von uns leiden nicht unter den schädlichen Auswirkungen ihrer defekten Gene, da wir von fast allen Genen zwei Kopien tragen, eine von unserer Mutter und die andere von unserem Vater.
- Die einzigen Ausnahmen von dieser Regel sind die Gene auf den männlichen Geschlechtschromosomen.

Männer haben ein X- und ein Y-Chromosom, ersteres von der Mutter, letzteres vom Vater, so dass jede Zelle nur eine Kopie der Gene auf diesen Chromosomen besitzt.

Vererbungsrecht

- In der Mehrzahl der Fälle reicht ein normales Gen aus, um alle Krankheitssymptome zu vermeiden.
- Wenn das potenziell schädliche Gen rezessiv ist, wird sein normales Gegenstück alle Aufgaben übernehmen, die beiden zugewiesen sind.
- Nur wenn wir von unseren Eltern zwei Kopien desselben rezessiven Gens erben, entsteht eine Krankheit.

Was ist Gentherapie? Warum wird sie eingesetzt?

Gentherapie = Einführung normaler Gene in Zellen, die defekte Gene enthalten, um ein fehlendes Proteinprodukt wiederherzustellen

GT wird verwendet, um einen mangelhaften Phänotyp zu korrigieren, so dass ausreichende Mengen eines normalen Genprodukts synthetisiert werden → , um eine genetische Störung zu verbessern.

Gentherapie

Ist eine Behandlung oder Heilung von Krankheiten, die durch defekte Gene verursacht werden. Dabei werden genügend betroffene Zellen mit einer normal funktionierenden Kopie des Gens ausgestattet, um die normale Funktion wiederherzustellen.

Um eine gentherapeutische Behandlung zu planen und durchzuführen, muss ein Forscher:

1. Identifizieren Sie die Gene, die für die Störung verantwortlich sind.
2. Erstellen Sie Kopien des normalen Gens.

3. Fügen Sie die Kopien in Vektoren ein.

4. Die betroffenen Zellen mit den Vektoren "infizieren".

Aktivieren Sie das Gen, damit Transkription und Translation stattfinden können.

Welche Zellen sind betroffen?

Bei der somatischen Gentherapie wird das Genom des Empfängers verändert, aber die Veränderung wird nicht an die nächste Generation weitergegeben.

Bei der Keimbahn-Gentherapie werden die Geschlechtszellen mit dem Ziel verändert, diese Veränderungen an ihre Nachkommen weiterzugeben.

Dies wird jedoch nicht aktiv erforscht, zumindest nicht von Menschen, obwohl viele Diskussionen über ihren Wert und ihre Zweckmäßigkeit geführt werden.

Wie wird die Gentherapie durchgeführt?

Bei der Keimbahn-Gentherapie wird ein Gen dauerhaft in Spermien oder Eizellen übertragen. Künftige Generationen würden "geheilt". Bei der Gentherapie mit somatischen

Zellen (Körperzellen) werden im Idealfall nur Gene auf die betroffenen Zellen übertragen.

Somatische Zellen sind nicht reproduktiv, konservativer und sicherer, da sie nur die Zielzellen des Patienten betreffen und nicht an künftige Generationen weitergegeben werden.

Arten der Gentherapie

Therapie mit somatischen Zellen (die meisten Zellen des Körpers). Alle bisherigen Gentherapien beim Menschen waren auf somatische Zellen gerichtet.

Wie wird die Gentherapie durchgeführt?

- Modifizierung somatischer Zellen indem gewünschte Gensequenzen in das Genom übertragen werden.
- Somatische Zellen erforderlich um sicherzustellen, dass die eingefügten Gene nicht auf die nächste Generation übertragen werden.

Auswirkungen von somatischen Zellen

Sie sind kurzlebig, da die Zellen der meisten Gewebe schließlich absterben und durch neue Zellen ersetzt werden. Um die therapeutische Wirkung aufrechtzuerhalten, sind wiederholte Behandlungen über die gesamte Lebensspanne des Menschen erforderlich.

Somatische Gentherapie (zwei Kategorien)

1- In vivo

Wo Gene in noch im Körper befindlichen Zellen verändert werden. Rekombinationsbasierte Ansätze in vivo sind besonders ungewöhnlich, da die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination bei den meisten DNA-Konstrukten sehr gering ist.

2- Ex vivo

Hierbei werden Zellen außerhalb des Körpers verändert und dann wieder in den Körper transplantiert. In-vivo-Techniken Dies geschieht bei Geweben, deren einzelne Zellen nicht in ausreichender Zahl in vitro kultiviert werden können (z. B. Gehirnzellen) und/oder wenn die Reimplantation der kultivierten Zellen in den Patienten nicht effizient ist. In Ermangelung anderer Selektionsmethoden werden Liposomen und bestimmte virale Vektoren zu diesem Zweck eingesetzt.

In der Regel werden virale Vektoren verwendet

- Virus: Der Träger des gewünschten Gens wird in der Regel "verkrüppelt", um seine Fähigkeit, Krankheiten zu verursachen, zu deaktivieren.
- Virale Methoden haben sich bisher als die effizientesten erwiesen.
- Viele virale Vektoren können das gewünschte Gen stabil in das Genom der Zielzelle integrieren.

Ex-vivo-Manipulationstechniken, die auf die in Kultur gezüchteten Zellen übertragen werden, wobei die transformierten Zellen ausgewählt, vermehrt und dann in den Patienten eingebracht werden. Vermeidet die Abstoßung durch das Immunsystem Gewebe wie hämatopoetische Zellen und Hautzellen, die aus dem Körper entfernt werden können.

7. Elektroporation
8. Liposomen
9. Kalziumphosphat

10. Goldkugeln (abgefeuert in einer mit Helium gefüllten Pistole)
11. Retro-Transposons (springende Gene - Frühzeit)
12. Künstliche menschliche Chromosomen.

Tabelle (1): Unterschied zwischen in vivo und ex vivo Genverabreichungssystemen.

In vivo	Ex vivo
Less invasive	More invasive
Technically simple	Technically complex
Vectors introduced directly	No vectors introduced directly
Safety check not possible	Safety check possible
Decreased control over target cells Close control possible	Close control possible

Zielorte für die Gentherapie

Therapeutische Gene müssen an bestimmte Zielorte für eine bestimmte Art von Krankheit gebracht werden.

Tabelle (2): Zielzellen für den Gentransfer.

Disease	Target Cells
Cancer	Tumor cells, antigen presenting cells (APCs), blood progenitor cells, T cells, fibroblasts, muscle cells
Inherited monogenic disease	Lung epithelial cells, macrophages, T cells, blood progenitor cells, hepatocytes, muscle cells
Infectious disease	T cells, blood progenitor cells, antigen presenting cells (APCs), muscle cells
Cardiovascular disease	Endothelial cells, muscle cells
Rheumatoid arthritis	Sinovial lining cells
Cubital tunnel Syndrome	Nerve cells

Zielorte für die Gentherapie

Therapeutische Gene müssen an bestimmte Zielorte für eine bestimmte Art von Krankheit gebracht werden.

Tabelle (3): Zielzellen für den Gentransfer.

Disease	Target Cells
Cancer	Tumor cells, antigen presenting cells (APCs), blood progenitor cells, T cells, fibroblasts, muscle cells
Inherited monogenic disease	Lung epithelial cells, macrophages, T cells, blood progenitor cells, <u>hepatocytes</u> , muscle cells
Infectious disease	T cells, blood progenitor cells, antigen presenting cells (APCs), muscle cells
Cardiovascular disease	Endothelial cells, muscle cells
Rheumatoid <u>arthritis</u>	<u>Sinovial lining cells</u>
Cubital tunnel Syndrome	Nerve cells

Beschränkungen der Gentherapie

1- Lieferung von Genen

- Begrenzter Tropismus der viralen Vektoren
- Abhängigkeit vom Zellzyklus bei einigen viralen Vektoren (d. h. Mitose erforderlich)

2- Dauer der Genaktivität

- Die nicht-integrierende Abgabe ist vorübergehend (transiente Expression)
- Die integrierte Lieferung wird stabil sein

Sicherheit der Patienten

- Überempfindlichkeit des Immunsystems (Überempfindlichkeitsreaktionen gegen virale Vektorkomponenten oder gegen in behandelten Zellen exprimierte Transgene)
- Integration wird nicht kontrolliert → Onkogene können am Insertionspunkt beteiligt sein → Krebs?

Keimbahn-Gentherapie

- Eine Gentherapie in Keimbahnzellen kann sich nicht nur auf die Person selbst, sondern auch auf deren Kinder auswirken.
- Jede genetische Veränderung in den Keimzellen oder jede Veränderung am Embryo vor dem Stadium der Differenzierung würde sich auf alle künftigen

Nachkommen dieser Person auswirken. Dies ist ein entscheidender Unterschied, der wichtige ethische Fragen berührt.

Keimbahntherapie (z. B. Spermien, Eizellen und deren Stammzellvorläufer). Die Keimbahntherapie beim Menschen ist nach wie vor höchst umstritten. Damit das eingeführte Gen normal an die Nachkommen weitergegeben werden kann, muss es nicht nur in die Zelle eingeführt, sondern auch durch genetische Rekombination in die Chromosomen eingebaut werden.

Ein neues Chromosom hinzufügen

- Experimente mit der Einführung des Chromosoms 47 .th
- Es gibt ein 46th Chromosom, einen großen Vektor, der in der Lage ist, den genetischen Code zu tragen, der hoffentlich vom Immunsystem nicht angegriffen wird.



Abbildung (7): Neues Chromosom.

Anwendungen

1. Heilung genetisch bedingter Krankheiten
2. Korrektur von Krebsgenen
3. Veranlassung von Krebszellen zur Herstellung von Toxinen, damit sie sich selbst abtöten
4. Blockierung viraler Gene (z. B. HIV)
5. Herstellung von Stammzellen aus somatischen Zellen

Die Zukunft

- Gentherapie an Geschlechtszellen von Trägern
- Gentherapie an befruchteten Eizellen

Wie funktioniert die Gentherapie?

Bei den meisten Gentherapiestudien wird ein "normales" Gen in das Genom eingefügt, um ein "abnormales", krankheitsverursachendes Gen zu ersetzen.

FOR AUTHOR USE ONLY

Kapitel 3

Vektor

Ein Trägermolekül, das verwendet wird, um das therapeutische Gen zu den Zielzellen des Patienten zu bringen. (der häufigste Vektor ist ein Virus). Die Vektoren werden genetisch so verändert, dass sie normale menschliche DNA tragen. Die neue DNA erzeugt dann ein funktionsfähiges Proteinprodukt und versetzt die Zielzelle in einen normalen Zustand.

Auswahl an Vektoren

Virale Vektoren:

- Vetrovirus
- Adenovirus
- Adeno-assoziiertes Virus
- Herpes Simplex Virus

Nicht-virale Vektoren

- Liposom
- DNA-Polymer-Konjugate
- Nackte DNA

Das ideale Vektorsystem hätte die folgenden Eigenschaften:

- 1- Eine angemessene Tragfähigkeit;
- 2- Sie müssen für das Immunsystem unauffindbar sein;
- 3- Sie sind nicht entzündlich;
- 4 - Sicher für Patienten mit vorbestehender Lungenentzündung;
- 5- Eine ausreichende Wirksamkeit zur Korrektur der Mukoviszidose zu haben
Phänotyp.
- 6- Eine lange Wirkungsdauer und/oder die Fähigkeit zur sicheren Wiederverabreichung

Wie man es repariert



- Es wird ein Virus gefunden, das sich vermehrt, indem es seine Gene in das Genom der Wirtszelle einfügt. Dieses Virus hat drei Gene A, B und C.
- Gen A kodiert ein Protein, das es dem Virus ermöglicht, sich in das Genom des Wirts einzuschleusen.
- Die Gene B und C verursachen die Krankheit, die mit diesem Virus in Verbindung gebracht wird.
- Ersetzen Sie B und C durch ein nützliches Gen. So könnte das veränderte Virus Ihr "gutes Gen" in das Genom der Wirtszelle einführen, ohne eine Krankheit zu verursachen.
- Wir verwenden also den modifizierten Virus, um das "kaputte Fenster" zu reparieren.

Wie wird das gemacht?

Viraler Vektor, der ein gesundes Gen trägt

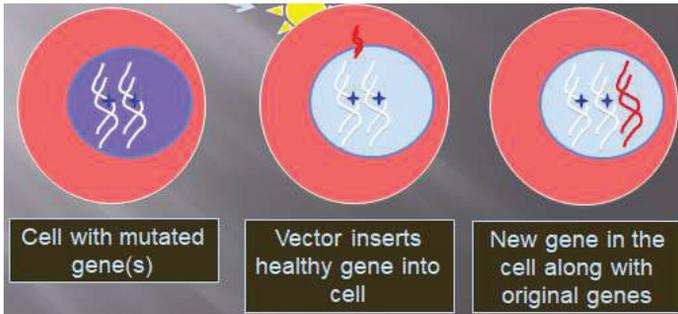


Abbildung (7): Viraler Vektor mit mutiertem Gen.

Aus dem therapeutischen Gen werden funktionelle Proteine gebildet, die die Zelle wieder in einen normalen Zustand versetzen.

FOR AUTHOR USE ONLY

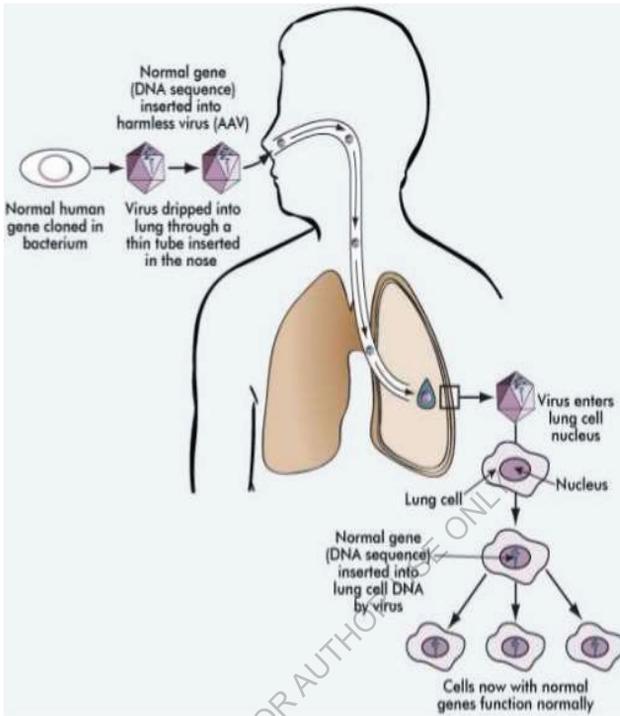


Abbildung (8): Genterapie mit einer normalen Gensequenz (DNA), die in ein harmloses Virus (AAV) eingefügt wurde.

Warum Viren

Viren werden verwendet, weil sie eine Möglichkeit entwickelt haben, ihre Gene einzukapseln und in menschliche Zellen einzubringen. Zielzellen wie die Leber- oder Lungenzellen des Patienten werden mit dem viralen Vektor infiziert, der sein genetisches Material, das das therapeutische menschliche Gen enthält, in die Zielzelle einschleust.

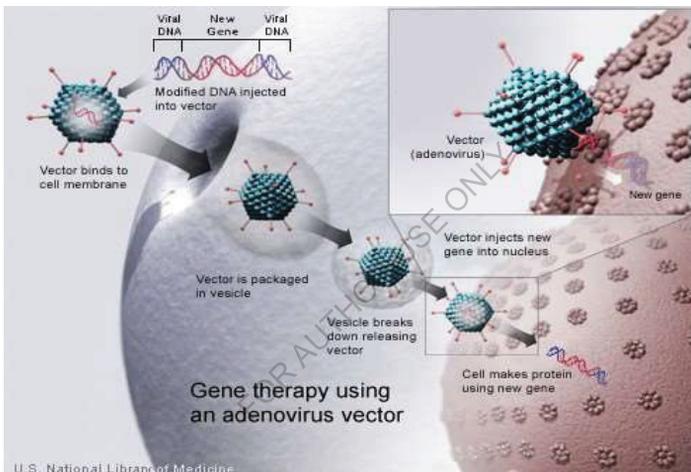


Abbildung (9): Gentherapie mit einem Adenovirus-Vektor.

Gentherapie mit einem Adenovirus-Vektor. Ein neues Gen wird in einen Adenovirus-Vektor eingefügt, mit dem die veränderte DNA in eine menschliche Zelle eingebracht wird.

Wenn die Behandlung erfolgreich ist, bildet das neue Gen ein funktionelles Protein.

Viren als Vektoren

- Sie vermehren sich, indem sie ihre DNA in eine Wirtszelle einfügen.
- Bei der Gentherapie können auf diese Weise Gene eingefügt werden, die für ein gewünschtes Protein kodieren, um die gewünschte Eigenschaft zu erzeugen.
- Vier verschiedene Typen
 - Adenovirus
 - Adeno-assoziiertes Virus (AAV)
 - Retrovirus
 - Herpes Simplex Virus (HSV).

Erfolge in der Gentherapie

Obwohl noch keine Gentherapien von der FDA zum Verkauf zugelassen wurden, sind einige Krankheiten experimentell erfolgreich behandelt worden:

- Melanom (Hautkrebs)
- Schwere kombinierte Immundefekte
- Erblisch bedingte Blindheit
- Sichelzellenanämie

Problem

Viren mit Replikationsdefekten beeinträchtigen die normale Fähigkeit des Virus, Gene im Körper zu verbreiten

- Auf Diffusion und Verbreitung angewiesen
- Beeinträchtigt durch kleine interzelluläre Räume für den Transport

Da sie durch virenbindende Liganden auf der Zelloberfläche eingeschränkt werden, kann → nicht weit vordringen. In den letzten 12 Jahren wurden weltweit mehr als 5000 Patienten behandelt.

Nicht virale Genübertragung

- **Direkte Einführung:**

Einbringen von therapeutischer DNA in die Zielzellen. Dieser Ansatz ist nur begrenzt anwendbar, da er nur bei bestimmten Geweben eingesetzt werden kann und große Mengen an DNA erfordert.

- **Liposom:**

Herstellung einer künstlichen Lipidkugel mit einem wässrigen Kern. Diese trägt die therapeutische DNA und ist in der Lage, die DNA durch die Membran der Zielzelle zu schleusen.

- Chemische Verknüpfung :

Chemische Verknüpfung der DNA mit einem Molekül, das an spezielle Zellrezeptoren bindet. Sobald die therapeutischen DNA-Konstrukte an diese Rezeptoren gebunden sind, werden sie von der Zellmembran umschlossen und in das Innere der Zielzelle eingeschleust.

- 47. (künstliches menschliches) Chromosom:

Sie würden autonom neben der Norm 46 existieren, ohne deren Funktionsweise zu beeinträchtigen oder Mutationen zu verursachen.

Es wäre ein großer Vektor, der in der Lage wäre, große Mengen genetischen Codes zu transportieren, und aufgrund

seiner Konstruktion und Autonomie würde er von den Immunsystemen des Körpers nicht angegriffen werden.

Wie ist der aktuelle Stand der Gentherapieforschung?

- Die Food and Drug Administration (FDA) hat bisher noch kein menschliches Gentherapieprodukt zum Verkauf zugelassen.
- Die derzeitige Gentherapie ist experimentell und hat sich in klinischen Versuchen nicht als sehr erfolgreich erwiesen. Seit Beginn der ersten klinischen Gentherapie-Studie im Jahr 1990 wurden nur geringe Fortschritte erzielt.
- Im Januar 2003 stoppte die FDA vorübergehend alle Gentherapieversuche mit retroviralen Vektoren in Blutstammzellen.

Wissenschaftler der National Institutes of Health (Bethesda, MD) haben zwei Patienten mit metastasierendem Melanom erfolgreich mit Killer-T-Zellen behandelt, die genetisch auf den Angriff auf die Krebszellen ausgerichtet sind. Diese Studie ist der erste Nachweis, dass die Gentherapie bei der Behandlung von Krebs wirksam sein kann.

RNA-Interferenz oder Gen-Silencing könnte ein neuer Weg zur Behandlung der Huntington-Krankheit sein. Kurze Stücke doppelsträngiger RNA (kurze, interferierende RNAs oder siRNAs) werden von Zellen verwendet, um RNA einer bestimmten Sequenz abzubauen. Wenn eine siRNA so gestaltet ist, dass sie mit der RNA übereinstimmt, die von einem fehlerhaften Gen kopiert wurde, wird das abnormale Proteinprodukt dieses Gens nicht produziert.

Ein Forscherteam der University of California, Los Angeles, bringt mit Hilfe von Liposomen, die mit einem Polymer namens Polyethylenglykol (PEG) beschichtet sind, Gene ins Gehirn.

Die Übertragung von Genen in das Gehirn ist ein bedeutender Erfolg, da virale Vektoren zu groß sind, um die "Blut-Hirn-Schranke" zu überwinden. Diese Methode hat das Potenzial, die Parkinson-Krankheit zu behandeln. Welche Faktoren haben die Gentherapie davon abgehalten, eine wirksame Behandlung für genetische Krankheiten zu werden?

Kurzlebigkeit der Gentherapie:

Bevor eine Gentherapie zu einer dauerhaften Heilung einer Krankheit führen kann, muss die in die Zielzellen eingebrachte therapeutische DNA funktionsfähig bleiben und die Zellen, die die therapeutische DNA enthalten, müssen langlebig und stabil sein.

Probleme

Die Integration der therapeutischen DNA in das Genom und die schnelle Teilung vieler Zellen verhindern, dass die Gentherapie einen langfristigen Nutzen erzielt. Die Patienten müssen sich mehreren Runden der Gentherapie unterziehen.

Welche Faktoren haben verhindert, dass sich die Gentherapie zu einer wirksamen Behandlung genetisch bedingter Krankheiten entwickelt?

- Immunreaktion: Immer wenn ein Fremdkörper in menschliches Gewebe eindringt, ist das Immunsystem darauf ausgelegt, den Eindringling zu bekämpfen.
- Das Risiko einer Stimulierung des Immunsystems in einer Weise, die die Wirksamkeit der Gentherapie verringert, ist immer ein potenzielles Risiko.

Außerdem erschwert die verstärkte Reaktion des Immunsystems auf Eindringlinge, die es schon einmal gesehen hat, die Wiederholung der Gentherapie bei Patienten.

Welche Faktoren haben verhindert, dass sich die Gentherapie zu einer wirksamen Behandlung genetisch bedingter Krankheiten entwickelt?

- Probleme mit viralen Vektoren - Viren sind zwar in den meisten Gentherapiestudien das Mittel der Wahl, bringen aber eine Reihe potenzieller Probleme mit sich: Toxizität, Immun- und Entzündungsreaktionen sowie Fragen der Genkontrolle und des Targetings.
- Außerdem besteht immer die Befürchtung, dass der virale Vektor, wenn er einmal im Patienten ist, seine Fähigkeit, Krankheiten zu verursachen, wiedererlangen könnte.

Welche Faktoren haben verhindert, dass sich die Gentherapie zu einer wirksamen Behandlung genetisch bedingter Krankheiten entwickelt?

Multigene Störungen - Erkrankungen oder Störungen, die durch Mutationen in einem einzigen Gen entstehen, sind die besten Kandidaten für eine Gentherapie. Leider werden einige der am häufigsten auftretenden Krankheiten wie Herzkrankheiten, Bluthochdruck, Alzheimer, Arthritis und Diabetes durch die kombinierten Auswirkungen von Veränderungen in vielen Genen verursacht. Multigene oder multifaktorielle Erkrankungen wie diese sind besonders schwer mit Gentherapie wirksam zu behandeln.

Zum Verständnis:

- Die Wissenschaftler wissen wenig über die Funktion der Tausenden von Genen. Ein Therapieversuch ohne dieses Wissen würde nur wenige Gene einer bestimmten Krankheit ansprechen
- z. B. Sichelzellenanämie

Sichelzellenanämie

- Verursacht durch einen Fehler im Gen, das unseren Körper darüber informiert, wie er Hämoglobin herstellen soll

- Prävalent bei Afroamerikanern
- Wie tödlich der Fehler auch sein mag, die Überlebensrate derjenigen, die in der Region an Malaria erkrankt sind, hat sich dadurch erhöht.
- Die meisten genetischen Störungen betreffen mehr als ein Gen, nur wenige genetische Krankheiten betreffen nur ein Gen.
- Bei diesen multigenetischen Störungen spielt auch die Umwelt eine Rolle, z. B. Ernährung, Bewegung, Rauchen usw.
- Die hohen Kosten, die mit der Entwicklung dieser Technologie verbunden sind, und die Vorschriften, die bei Experimenten zu beachten sind, stellen große Hürden für Experimentatoren in diesem Bereich dar.

- Der erste Gentherapieversuch am Menschen begann 1990 mit einer Ex-vivo-Strategie, bei der Patientenzellen im Labor gezüchtet und mit Vektoren inkubiert wurden.
- Rücktransplantation in den Patienten

- Es wurde versucht, 2 genetische Störungen zu behandeln, darunter Kinder mit Immunschwäche und Menschen mit hohem Serumcholesterinspiegel.

Ziel der Gentherapie

- Ein normales Gen kann an einer unspezifischen Stelle im Genom eingefügt werden, um ein nicht funktionierendes Gen zu ersetzen. Dieser Ansatz ist der häufigste.
- Ein abnormales Gen könnte durch homologe Rekombination gegen ein normales Gen ausgetauscht werden.
- Das abnormale Gen könnte durch eine selektive Rückmutation repariert werden, die dem Gen seine normale Funktion zurückgibt.
- Die Regulierung (das Ausmaß, in dem ein Gen ein- oder ausgeschaltet wird) eines bestimmten Gens könnte verändert werden.

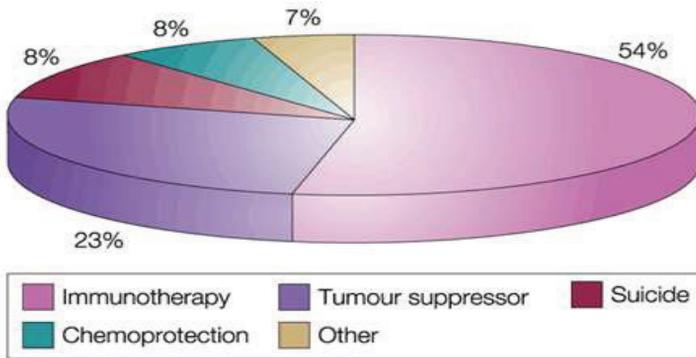


Abbildung (10): Direkte genetische Veränderung von Zellen bei Patienten.

Gentherapie-Ziele

- 1- Keimbahn-Gentherapie
- 2- Gentherapie mit somatischen Zellen
- 3- Genvermehrung
- 4- Genaustausch

Spezifische Hemmung der Genexpression
Gezielter Zelltod

- 1- Gentherapie
- 2- Antisense-Therapie (Unterdrückung der Genexpression)
- 3- Gen-Augmentation (Ergänzung defekter Gene)
- 4- Antisense-Therapie.

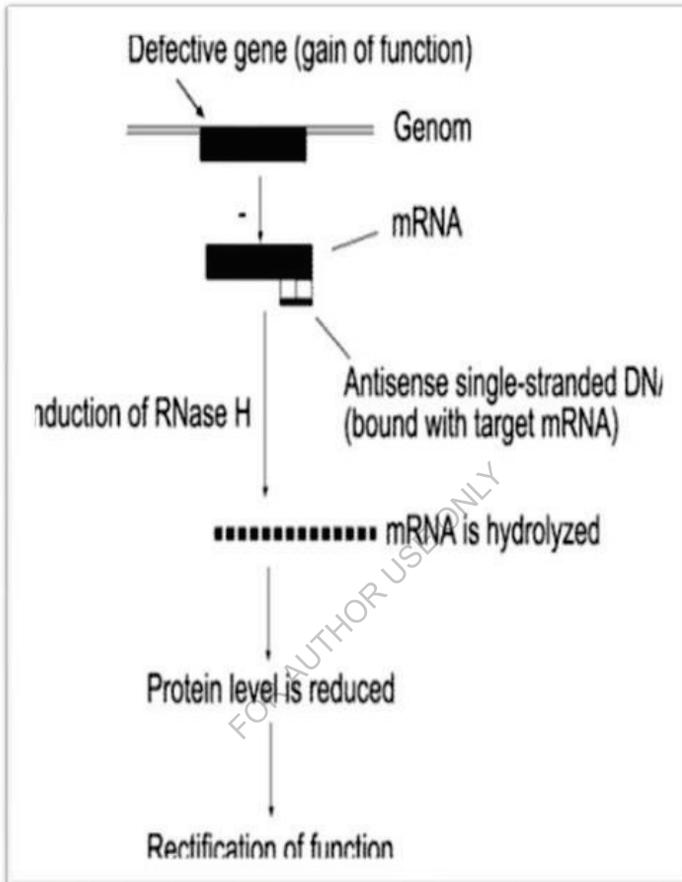


Abbildung (11): Wiederherstellung der Funktion eines defekten Gens.

Kompensiert genetische Mutationen, die zerstörerische Proteine produzieren.

Die wichtigsten Strategien sind

1) Kurze Abschnitte synthetischer DNA, die auf die mRNA-Transkripte anormaler Proteine abzielen und deren Übersetzung verhindern

OR kleine RNA-Moleküle (siRNA), die zum Abbau von abweichenden RNA-Transkripten verwendet werden

2) Ein Gen für ein Protein (intrazellulärer Antikörper) bereitstellen, das die Aktivität des mutierten Proteins blockieren kann

3) Entwicklung von DNA/RNA-Hybriden, die die Reparatur des mutierten Gens steuern könnten

Genvermehrung

Bei den meisten Therapien wird einem ausgewählten Zelltyp einfach ein nützliches Gen hinzugefügt, um die fehlende oder fehlerhafte Version zu ersetzen. Nützlich bei der Behandlung von Mutationen mit Funktionsverlust, z. B. bei Tumorgenen.

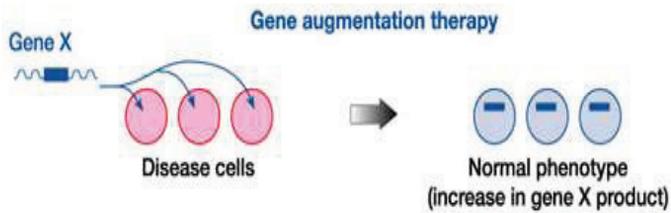


Abbildung (12): Gen-Augmentations-Therapie.

Direkter Ansatz

Veranlassung von Krebszellen zur Herstellung eines Proteins, das die Zelle abtötet.

Indirekter Ansatz

Stimulierung einer Immunreaktion gegen bestimmte Zellen oder Beseitigung der Blutversorgung.

Genaustausch

Bei dieser Strategie wird die mutierte Kopie in situ durch eine korrekt funktionierende Kopie ersetzt. Nützlich bei Funktionsgewinnmutationen wie Onkogenen.

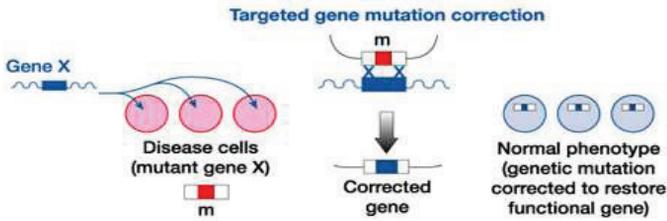


Abbildung (13): Gezielte Korrektur von Genmutationen.

Drei Herausforderungen in der Gentherapie

- 1) Das Gen verpacken
- 2) Schützen Sie das Gen
- 3) gezielte Zuführung zum Zellkern und Freisetzung in aktiver Form

Vektoren

Trojanische Pferde", die das Gen in die Zelle schmuggeln. Trägermoleküle, die speziell entwickelt wurden, um in Zellen einzudringen und therapeutische Gene zu deponieren.

Vektoren können viral oder nicht-viral sein

Adenovirale Vektoren

- 1- Nicht in das Genom einfügen
- 2- Vorübergehend
- 3- Mangelnde Spezifität
- 4- Starke Immunreaktion

FOR AUTHOR USE ONLY

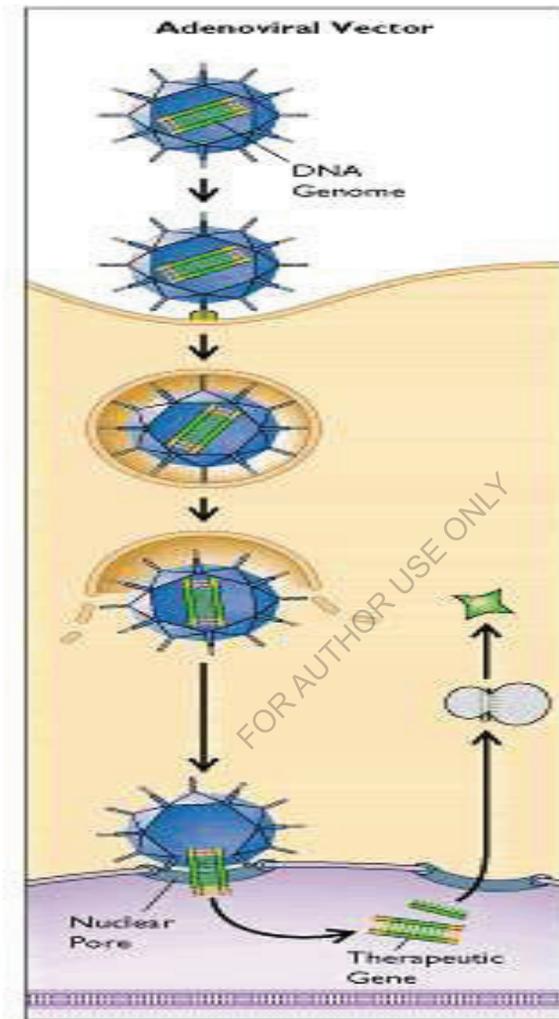


Abbildung (14): Adenovirus-assoziierte virale Vektoren.

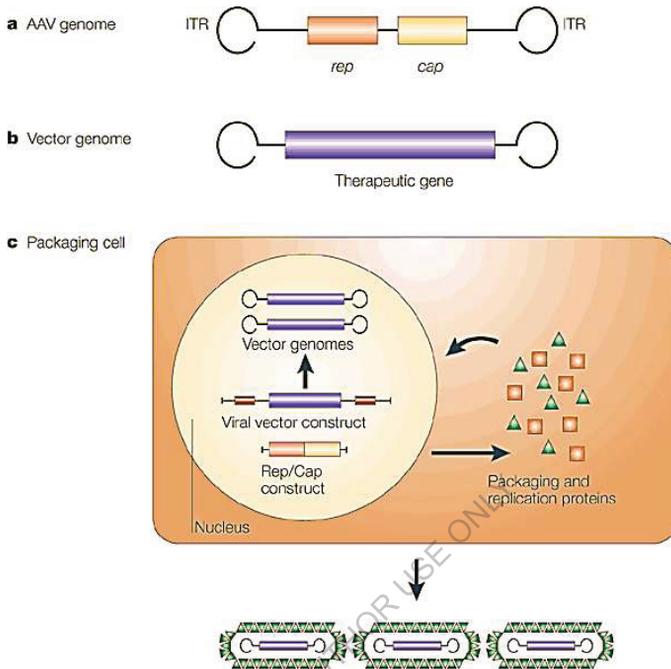


Abbildung (15): In das Genom integriert, aber von geringer Größe.

Methoden der Vektorabgabe

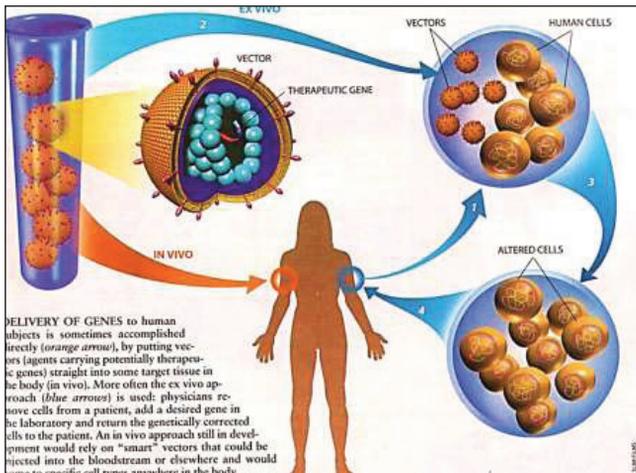


Abbildung (15): Methoden der Vektorverabreichung.

Strategie für virale Vektoren

Replikations- und Virulenzgene können durch therapeutische Gene ersetzt werden

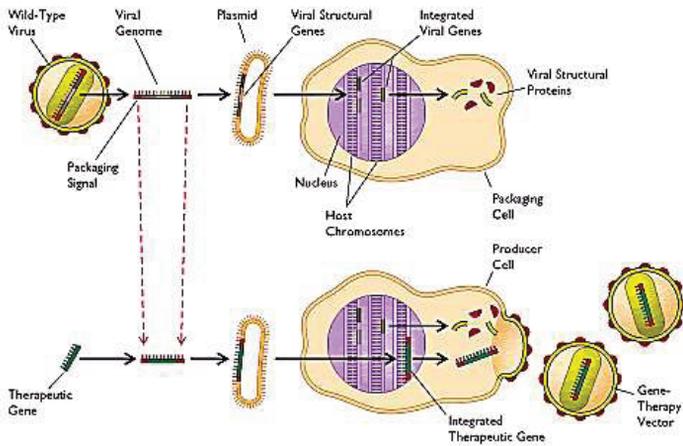


Abbildung (16): Therapeutisches Gen durch Gentherapievektor mit Wildtyp-Virus.

Kapitel 4

Retroviren

Retroviren einschließlich Lentivirus-, HIV- und MMLV-basierter Vektoren.

- Einzelsträngiges RNA-Genom
- Lipidmembran umhüllt
- Wirtsspektrum durch Hüllproteine bestimmt

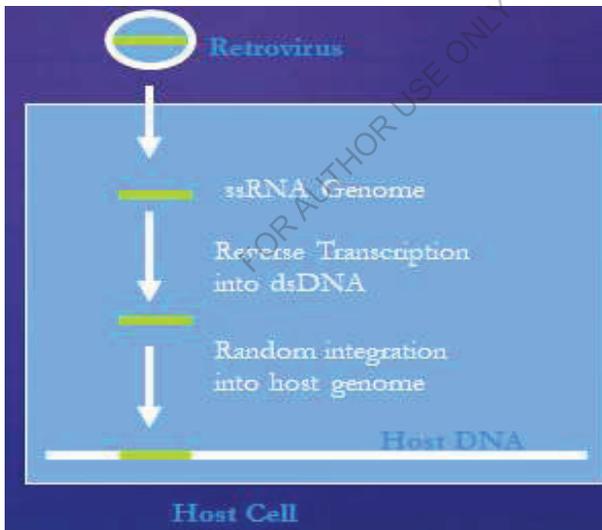


Abbildung (17): Retrovirus mit reverser Transkription durch zufällige Integration in das Wirtsgenom.

Das Genom der Retroviren



Abbildung (18): Das retrovirale Genom.

Long Terminal Repeat (LTR):

Erforderlich für die Integration in das Wirtsgenom

Ψ (Psi):

Ψ Verpackungssignal

Gag:

Verpackt virales Genom in virale Partikel

pol:

Virale Polymerase, die für die virale Replikation erforderlich ist

env:

Virale Hüllproteine, die für das Eindringen in Wirtszellen notwendig sind, bestimmen die Reichweite des Wirts

Retrovirale Vektoren

- Retrovirale Vektoren basieren auf dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV), das sowohl Maus- als auch menschliche Zellen infizieren kann.
- Die viralen Gene, *gag*, *pol* und *env*, werden durch das gewünschte Transgen ersetzt und auf Plasmiden in der Verpackungszelllinie exprimiert.
- Da den nicht-essentiellen Genen die Verpackungssequenz fehlt, werden sie nicht in das Virionpartikel aufgenommen.
- Um eine Rekombination zu verhindern, die zu replikationsfähigen Retroviren führt, werden alle Regionen mit Homologie zum Vektorrückgrat entfernt.

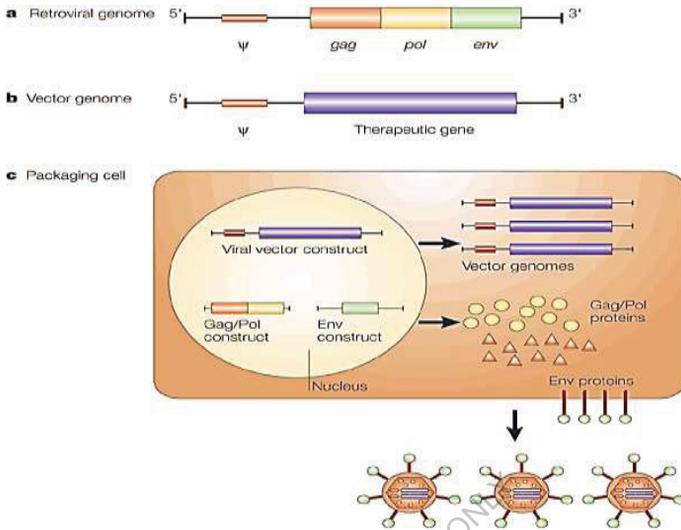


Abbildung (19): Retrovirale Vektoren.

Retrovirale Vektoren

Spezielle Vektoren werden durch Deletion oder Veränderung der nativen Sequenz in retroviralen und lentiviralen Vektoren konstruiert, um die Bildung replikationsfähiger Retroviren (RCR) zu verhindern, die in der Regel durch homologe Rekombination entstehen.

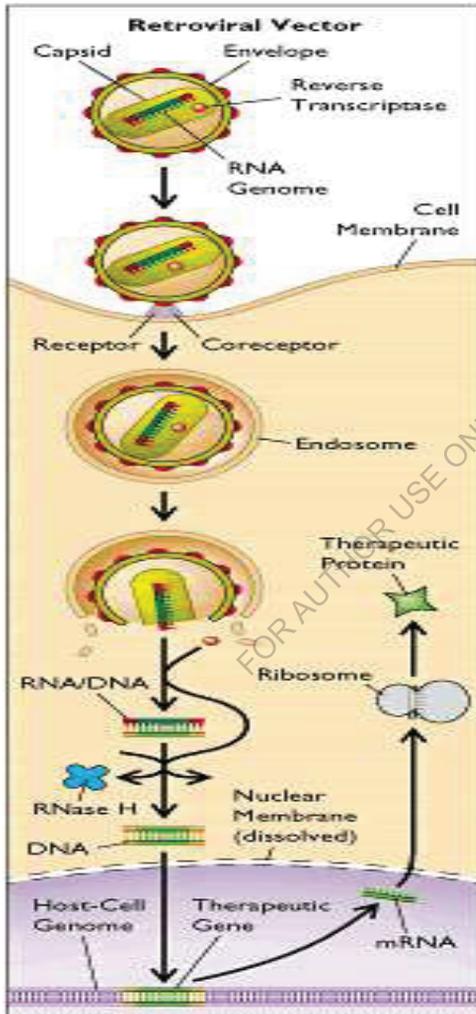


Abbildung (20): Weg des retroviralen Vektors mit dem therapeutischen Gen in das Genom der Wirtszelle.

Retrovirale Vektoren

Vorteile

- 1) langfristiger Ausdruck
- 2) geringe Toxizität
- 3) hohe Kapazität
- 4) geringe Anti-Vektor-Immunität, die eine wiederholte Verabreichung ermöglicht

Probleme

Mangelnde

Zellspezifität:

Promiskuitiv: Einschleusen von Genen in verschiedene Zelltypen, was zu einer geringeren Zieleffizienz und unerwünschten physiologischen Auswirkungen führt

Zufälliges Spleißen in die Wirts-DNA, was zu einer normalen Genunterbrechung und/oder einer Veränderung der Genfunktion führt.

Verpackung retroviraler Vektoren

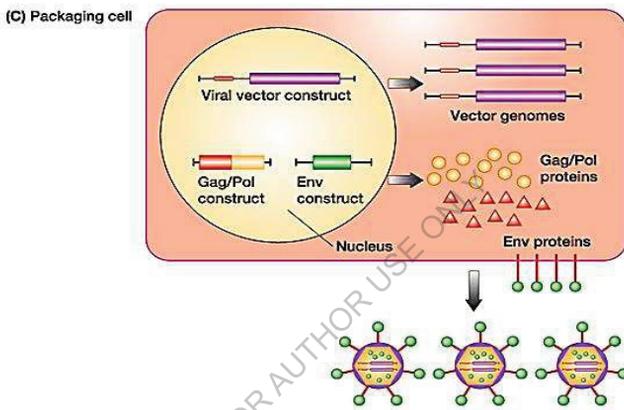


Abbildung (21): Teil 2 von 2 Molekulargenetik des Menschen.

Gag-, pol- und env-Gene auf räumlich getrennten Fragmenten ohne Ψ -Sequenz. Rekombinante virale Proteine sind infektiös, aber replikationschwach.

Gentherapie bei X-SCID-Patienten

Seltene Erkrankung, die durch das Fehlen oder die Verringerung des Immunsystems verursacht wird ("Bubble-Baby-Syndrom"). XSCID-Patienten (Baby in der Blase) können keine T-Lymphozyten bilden, und ihre B-Lymphozyten bilden keine wichtigen Antikörper zur Bekämpfung von Infektionen. Ohne T- und B-Lymphozyten entwickeln die Patienten im Säuglingsalter schwere Infektionen und können sterben, wenn sie nicht eine Knochenmarktransplantation erhalten.

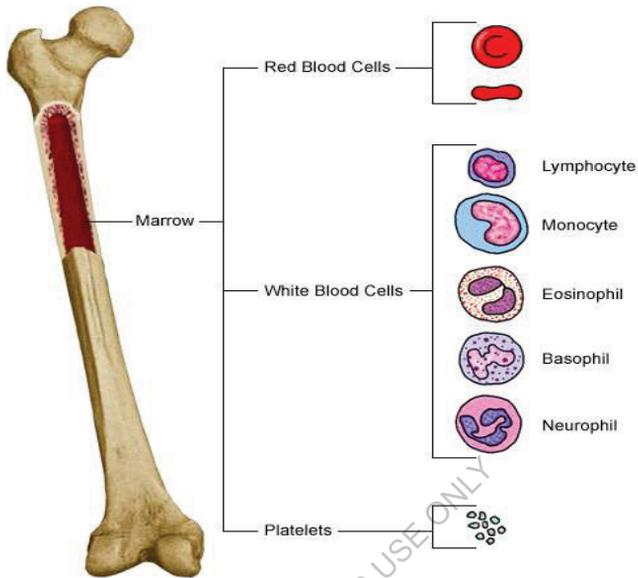


Abbildung (21): Schwere kombinierte Immunschwäche (SCID)

X-SCID, besser bekannt als die "Baby in der Blase"-Krankheit, wird durch Mutationen im IL2RG-Gen verursacht. Das Gen kodiert für die Gamma-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors. Das vom IL2RG-Gen gebildete Protein ist ein Rezeptor für chemische Signale.

Die chemischen Signale steuern das Wachstum und die Aktivierung von Zellen des Immunsystems. Das Gen wird jetzt als "gemeinsame Gamma-Kette" bezeichnet, weil das Protein in Rezeptoren für mehrere verschiedene Arten von Signalen eingebaut wird.

Das IL2RG-Gen befindet sich auf dem langen (q) Arm von Chromosom X an Position 13.1. Das Gen hat eine Länge von ca. 4,2kb und besteht aus sieben Introns und acht Exons. Die Exons 5 und 7 weisen Mutations-Hotspots auf. X-SCID ist die häufigste Form von SCID und macht schätzungsweise 46 % bis 70 % aller SCID-Fälle aus.

Gentherapie durch Injektion retro-viral transduzierter autologer CD34+ hämatopoetischer Stammzellen (HSCs).

Insertionsmutagenese in der Nähe des Promotors des Proto-Onkogens LMO2.

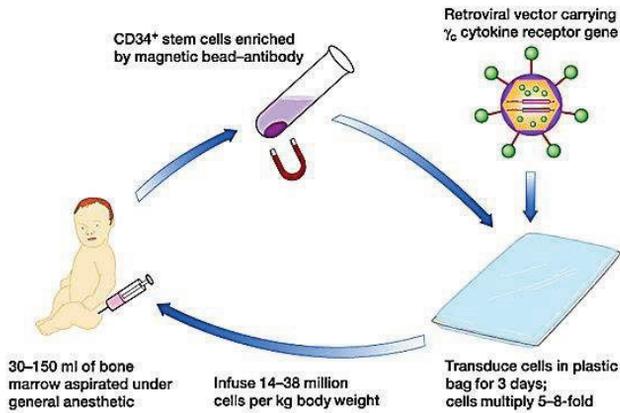


Figure 21-11 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

Abbildung (22): 2/11 X-SCID-Patienten entwickelten Leukämie.

Replikationsdefiziente virale Vektoren

Gentechnisch verändert, damit sich die Virusinfektion nicht ausbreiten kann

Die virale DNA enthält nicht die viralen Gene, die zur Herstellung weiterer Viren benötigt werden.

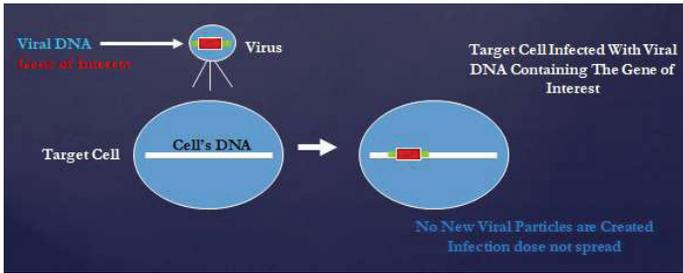


Abbildung (23): Zielzelle, die mit viraler DNA infiziert ist, die das betreffende Gen enthält.

Rettung von Viren mit Replikationsdefiziten

Superinfektion mit Wildviren.

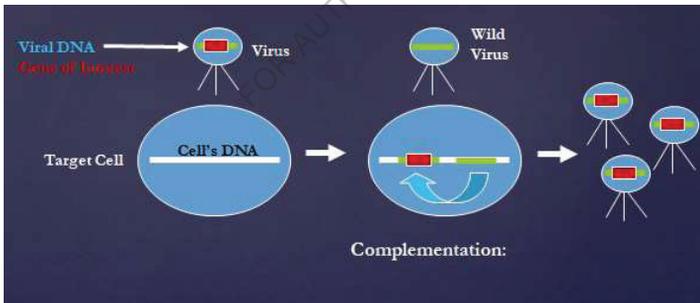


Abbildung (25): Superinfektion mit Wildviren.

Das Genom des Wildvirus liefert die fehlenden Proteine, die der virale Vektor zur Replikation benötigt. Die superinfizierte Zelle funktioniert ähnlich wie eine Verpackungslinie.

Das Genom des Wildvirus wird nach dem Zufallsprinzip mit dem viralen Vektor rekombiniert, wodurch genügend genetisches Material für die Replikation des viralen Vektors entsteht.

Das resultierende gerettete Virus kann Teile des ursprünglichen Insertionsgens enthalten. Das virale Genom ist aufgrund der zufälligen Rekombination nicht vorhersehbar. Das Virus kann eine veränderte Virulenz aufweisen.

Entwicklung von inkompetenten Lentivirusvektoren (3. Generation) für die Replikation

Der virale Vektor wird so weit wie möglich "entkernt", um Platz für das eingefügte Gen zu schaffen und das virale Genom in cis- und trans- wirkende Regionen aufzuteilen

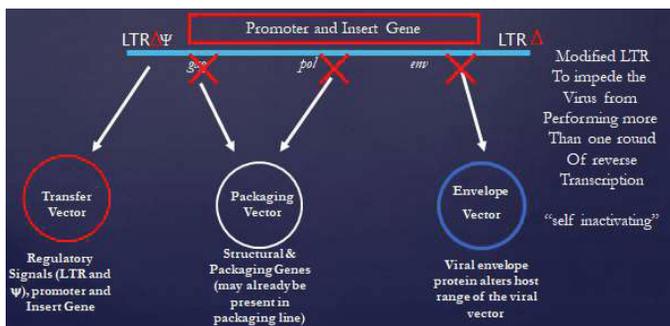


Abbildung (26): Entwurf von replikationsinkompetenten Lentiviralen Vektoren (3. Generation).

Verpackung rekombinanter lentiviraler Partikel

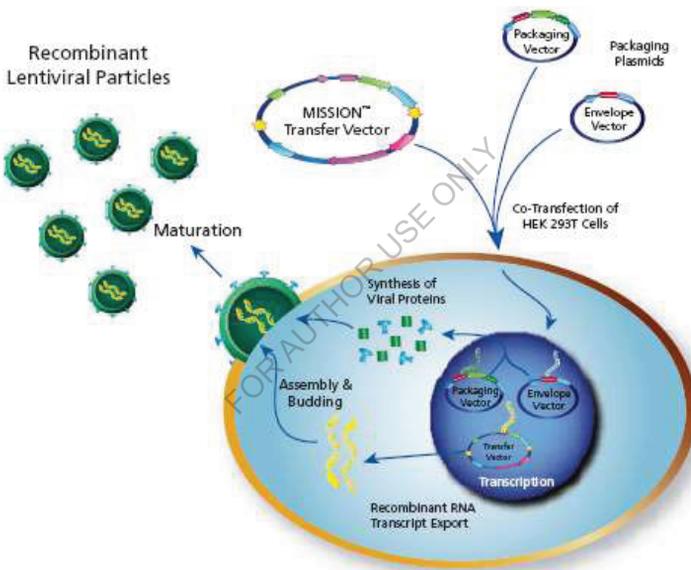


Abbildung (27): Verpackung rekombinanter lentiviraler Partikel.

Die drei Plasmide, die die viralen Genomkomponenten enthalten, werden in die Verpackungslinie transfiziert, um die

infektiösen Viruspartikel zu erzeugen. Da mehrere Plasmide verwendet werden, sind mehrere Rekombinationsereignisse erforderlich, um ein replikationsfähiges Virus zu erzeugen.

Mit Retroviren assoziierte Risiken durch Insertionsmutagenese

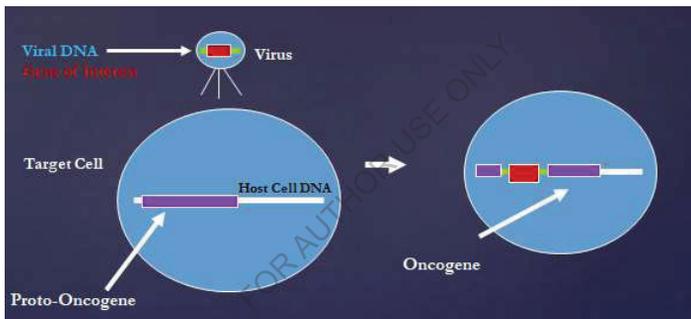


Abbildung (28): Mit Retroviren assoziierte Risiken durch Insertionsmutagenese

Die zufällige Integration des viralen Genoms kann die endogenen Wirtsgene stören. Dies ist besonders besorgniserregend, ist die Störung von Proto-Onkogenen, die zu einem erhöhten Krebsrisiko führen kann.

Risiken im Zusammenhang mit retroviralen Vektoren der Virustransduktion

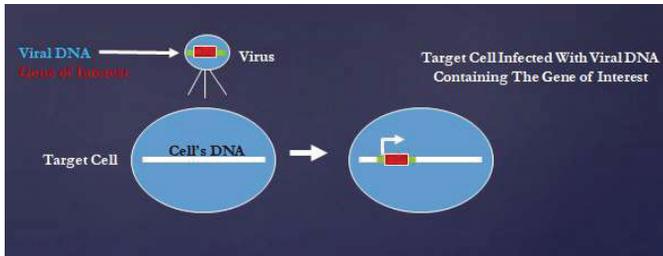


Abbildung (29): Risiken im Zusammenhang mit retroviralen Vektoren: Virale Transduktion.

Mit dem viralen Vektor infizierte Personen können das Insertionsgen an der Infektionsstelle exprimieren.

Grenzen der retroviralen Vektoren

- Eine kritische Einschränkung der retroviralen Vektoren besteht darin, dass sie nicht in der Lage sind, sich nicht teilende Zellen zu infizieren, wie z. B. diejenigen, aus denen Muskel-, Gehirn-, Lungen- und Lebergewebe besteht.

- Die Zellen des Zielgewebes werden entnommen, in vitro gezüchtet und mit dem rekombinanten Vektor infiziert. Die Zielzellen, die das Fremdprotein produzieren, werden dann in das Tier zurückverpflanzt (Ex-vivo-Gentherapie).
- Es gibt Probleme, wenn die Ausdrucksfähigkeit eingeschränkt ist, und es ist schwierig, eine längere Ausdrucksfähigkeit zu erreichen.
- Die Expression wird durch entzündungsfördernde Interferone, die auf virale LTRs einwirken, reduziert, da die retrovirale DNA integriert wird und die viralen LTR-Promotoren inaktiviert werden.
- Möglichkeit der zufälligen Integration von Vektor-DNA in das Wirtschromosom.

Merkmale des retroviralen Vektors

Vorteile

- Integration: permanenter Ausdruck
- Pseudo-typisiertes Virus

Benachteiligungen

- Nur sich teilende Zellen infizieren

- Insertionsmutagenese (Tumorbildung)
- Aktivierung von Onkogenen
- Tumorsuppressor-Gene hemmen

Lentivirale Vektoren

- Gehören zur Familie der Retroviren, können aber sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen infizieren.
- Sie sind komplizierter als Retroviren und enthalten sechs zusätzliche Proteine: tat, rev, vpr, vpu, nef und vif.
- Das humane Immundefizienzvirus (HIV) wurde deaktiviert und als Vektor für die In-vivo-Genübertragung entwickelt.
- Geringe zelluläre Immunreaktion, daher gute Möglichkeit der In-vivo-Genverabreichung mit anhaltender Expression über sechs Monate.
- Keine starke Antikörperreaktion.

Wahrscheinliche Symptome von im Labor erworbenen Infektionen mit Retro-/Lentivirus-Vektoren

- Fieber / grippeähnliche Symptome

- Mögliche Entzündung des infizierten Gewebes
- Die zufällige Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom kann zu Insertionsmutagenese und Onkogenese führen.
- Expression von Insertionsgenen in infiziertem Gewebe (Onkogene, Entzündungsmediatoren und Toxine sind von besonderer Bedeutung)

Herpesvirus-Vektoren

- HSV-1 ist eine milde Krankheit
- Lineare dsDNA
- 50 kb Fremd-DNA können untergebracht werden (150 kb für die neue Generation von Vektoren)
- Neurotropes Virus
- Hochdeletiertes defektes Virus (die Hälfte der 80 Herpesgene kann deletiert werden) + Verpackungszelllinien mit mutierten Stämmen.

Der erste Fall

- Die erste Gentherapie wurde am 14. Septemberth, 1990 durchgeführt.

- Ashanti DeSilva wurde wegen SCID behandelt

Schwere kombinierte Immundefizienz

- Die Ärzte entfernten ihre weißen Blutkörperchen, fügten das fehlende Gen in die weißen Blutkörperchen ein und setzten sie dann wieder in ihren Blutkreislauf ein.
- Dadurch wurde ihr Immunsystem gestärkt.
- Hat nur einige Monate lang funktioniert

Ein Fall von Leukämie bei einem SCID-Kind, das mit einem retroviralen Vektor behandelt wurde

- Insgesamt recht erfolgreich, über 1000 Menschen erhielten eine retrovirale Gentherapie
- Ein französisches Baby wird mit retroviralen Vektoren behandelt vor 3 Jahren
- In diesem Sommer entwickelte sich eine leukämieähnliche Krankheit.
- Neun andere Kinder, die zur gleichen Zeit behandelt wurden, zeigen keine Anzeichen von Leukämie
- Aber die Nebenwirkung ist noch kein so großes Risiko, dass die genetischen Experimente für Kinder mit einer oft tödlichen Immunkrankheit eingestellt werden sollten

- Menschen, die eine retrovirale Gentherapie erhalten, sollten vor dem Risiko gewarnt werden, an Leukämie zu erkranken

Erfolgreiche einjährige Gentherapie-Studie zur Behandlung der Parkinson-Krankheit

- Neurologic, ein Biotech-Unternehmen, gab bekannt, dass es seine wegweisende Phase-I-Studie zur Gentherapie der Parkinson-Krankheit mit AAV-Vektoren erfolgreich abgeschlossen hat.
- Es handelte sich um eine Studie mit 12 Patienten, von denen jeweils vier zu einer der drei Dosis-Eskalations-Kohorten gehörten. Alle Eingriffe wurden unter lokaler Anästhesie durchgeführt, und alle 12 Patienten wurden innerhalb von 48 Stunden nach dem Eingriff aus dem Krankenhaus entlassen und 12 Monate lang beobachtet. Die primären Ziele des Studiendesigns, Sicherheit und Verträglichkeit, wurden erfolgreich erreicht. Es wurden keine unerwünschten Ereignisse im Zusammenhang mit der Behandlung gemeldet.

Tabelle (5): Vektoren auf der Basis von RNA-Viren

Vectors Based on RNA Viruses			
Features	Retroviral	Lentiviral	Alphaviral
Maximum Insert size	7-7.5 kb	7-7.5 kb	5 kb
Concentrations viral particles/ml	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁹
Route of gene delivery	Ex vivo	Ex/In vivo	In vivo
Integration	Yes	Yes	No
Duration of expression in vivo	Shorter than theorized	Long	Short
Stability	Good	Not tested	Good
Ease of Preparation scale up	Pilot scale up up to 20-50 liters	Not known	Not known
Immunological problems	Few	Few	Unknown
Pre-existing host immunity	Unlikely	Unlikely, except in AIDS patients	No
Safety problems	Insertional mutagenesis?	Insertional mutagenesis?	Few

Tabelle (6): Vektoren auf der Basis von DNA-Viren

Vectors Based on DNA and on DNA Viruses

Features	Adenoviruses	Adeno-associated viruses	Herpesviruses	Vaccinia virus	Naked DNA /Lipid DNA
Maximum Insert size	7.5 kb	4.5kb	~30kb	>25 kb	Unlimited size
Concentrations viral particles/ml	>10 ¹⁰	>10 ¹²	>10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁹	No limitation
Route of gene delivery	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo
Integration	No	Yes/No	No	No	very poor
Duration of expression in vivo	Short	Long	Short/ Long in CNS?	Short	Short
Stability	Good	Good	Unknown	Good	Very good
Ease of Preparation scale up	Easy to scale up	Difficult to purify, difficult to scale up	Not yet tried	Vaccine production facilities exist	Easy to scale up
Immunological problems	Extensive	Not known	Not known	Extensive	None
Pre-existing host immunity	Yes	Yes	Yes	Diminishing as unvaccinated population grows	No
Safety	Inflammatory response, toxicity	Inflammatory response, toxicity	Neurovirulence? Insertional mutagenesis	Disseminated vaccinia in immunocompromised hosts	None?

Tabelle (7): Klinische Versuche mit Gentherapie für monogene Krankheiten in den Vereinigten Staaten im Jahr 2000.

Clinical Trials of Gene Therapy for Monogenic Diseases in the United States in 2000

Disease	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Results
Gaucher disease	GC ^c	Retrovirus	3	9	One trial shows long term elevation of GC expression, other trials primarily Phase I
OTC deficiency	OTC	Adenovirus	1	14	Trial suspended after one fatality (see text)
ADA-SCID	ADA + NeoR	Retrovirus	1	6	Ongoing since 1990
Cystic Fibrosis	CFTR	Adenovirus	9	83	Some correction of defect in 30% of patients, but inflammation at clinical doses, and reduction in therapeutics with repeated injection.
		AAV	4	36	Some correction of defect, Phase II study started
		Cationic Lipids	4	25	30% to 50% of patients showed improvement
Chronic granulomatous	p17 phox/ gp91 phox	Retrovirus	3	9	Phase I/II, study closed in 1998
Familial hypercholesterolemia	LDLR	Retrovirus	1	5	Phase I, closed in 1994

Tabelle (8): Andere klinische Versuche zur Gentherapie in den Vereinigten Staaten im Jahr 2000.

Other Clinical Trials of Gene Therapy in the United States in 2000

Disease	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Results
Chronic Diseases					
Rheumatoid arthritis	IRAP	Retrovirus	1	7	?
Artery disease and restenosis	VEGF	Naked DNA	2	29	?
Infectious Diseases					
AIDS	HIV-IT(V)	Retrovirus	3	298	Most gene trials for HIV are in Phase I, with a few in phase II. Few results reported.
	CD4-Zeta TcR	Retrovirus	3	54	
	Anti-HIV ribozyme	Retrovirus	2	12	
	TK + HyR	Retrovirus	2	14	
	Antisense to TAR	Retrovirus	3	17	

Tabelle (9): Klinische Versuche mit Gentransfer zur Krebstherapie in den Vereinigten Staaten im Jahr 2000.

Clinical Trials of Gene Transfers for Cancer Therapy in the United States in 2000

Location	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Phase
Brain cancers					
Neuroblastoma	IFN γ	Retrovirus	1	4	I
	IL-2	Retrovirus	1	12	I
	IL-2	Adenovirus	1	6	I
Central nervous system tumor	TK	Adenovirus	2	22	I
Pediatric tumor	TK	Retroviral producing cells	1	2	I
Adult brain tumor	TK	Retroviral producing cells	1	15	I
Ovarian cancer					
	HSV-TK	Adenovirus	1	10	I
	TK	Retroviral producing cells	3	42	I
	BRCA-1	Retrovirus	1	40	I/II
	p53	Adenovirus	1	16	I
Small cell lung cancer					
	IL-2 + NeoR	Lipofection	1	8	I
	Anti-sense to k-ras	Retrovirus	1	9	I
	p53	Adenovirus	2	59	I/II
Prostate cancer					
	GM-CSF	Retrovirus	1	8	I/II
	PSA	Poxvirus	1	3	I
	HSV-TK	Adenovirus	1	18	I
Breast cancer					
	BRCA-1	Retrovirus	1	21	I
	E1A	Lipofection	1	16	I
	MDR-1+ NeoR	Retrovirus	4	39	I
	CD80	Lipofection	1	15	I
	CEA	Poxvirus	4	53	I
	CEA	RNA transfer	1	30	I

Korrektur eines Gendefekts durch Übertragung einer funktionsfähigen normalen Kopie des Gens in Zellen

- In den 1980er Jahren war es dank der Fortschritte in der Molekularbiologie bereits möglich, menschliche Gene zu sequenzieren und zu klonen. Auf der Suche nach einer Methode zur einfachen Herstellung von Proteinen, wie z. B. dem Protein, das Diabetikern fehlt, untersuchten

Wissenschaftler die Einführung menschlicher Gene in bakterielle DNA. Die veränderten Bakterien produzieren dann das entsprechende Protein, das geerntet und Menschen injiziert werden kann, die es nicht selbst herstellen können.

- Die Wissenschaftler gingen den logischen Schritt und versuchten, Gene direkt in menschliche Zellen einzubringen, wobei sie sich auf Krankheiten konzentrierten, die durch Defekte einzelner Gene verursacht werden, wie zystische Fibrose, Hämophilie, Muskeldystrophie und Sichelzellenanämie, Erkrankungen des Sehnervs, Wundheilung und Regeneration sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen.
- Dies war jedoch viel schwieriger als die Veränderung einfacher Bakterien, vor allem wegen der Probleme, die mit dem Transport großer DNA-Abschnitte und deren Anbringung an der richtigen Stelle des Genoms verbunden sind.

Wie können Gene in bestimmte Zellen, Gewebe und ganze Tiere eingebracht werden (Methoden der Einbringung)?

Methoden der Genübertragung

Virale Vektoren:

- 1- Adenovirus
- 2- Retrovirus
- 3- Lentivirus
- 4- Adeno-assoziiertes Virus (AAV)
- 5- Herpes-simplex-Virus (HSV)

Nicht-virale Vektorbasis

- Nackte DNA (Plasmid-DNA): Injektion oder Genpistole
- Liposomen (kationische Lipide): Mischung mit Genen
 - 1- Ex-vivo
 - 2- In vivo

Kapitel 5

Virale Vektoren in der Gentherapie

Gentherapie, das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen zum Zweck der Veränderung des Verlaufs von Krankheiten oder Beschwerden.

Verwaltung

- 1- Ex-vivo-Zellen werden entnommen, genetisch verändert und dem Patienten zurücktransplantiert.
- 2- Direkter In-vivo-Transfer von genetischem Material in den Patienten.

Viren sind obligat intrazelluläre, nicht lebende Parasiten, deren Größe zwischen 20 und 300 nm im Durchmesser liegt. Sie bestehen entweder aus einem RNA- oder einem ein- oder doppelsträngigen DNA-Kern, der von einer schützenden Proteinhülle und bei komplexeren Typen zusätzlich von einer Lipidhülle umgeben ist. Ihre Hauptfunktion besteht darin, ihr Genom in die Wirtszelle einzuschleusen.

Viren greifen ihre Wirte an und schleusen ihr genetisches Material als Teil ihres Replikationszyklus in die Wirtszelle ein. Dieses genetische Material enthält grundlegende

"Anweisungen", wie weitere Kopien dieser Viren zu produzieren sind, indem es die normale körpereigene Produktionsmaschinerie entführt, um den Bedürfnissen des Virus zu dienen. Die Wirtszelle führt diese Anweisungen aus und produziert weitere Kopien des Virus, was dazu führt, dass immer mehr Zellen infiziert werden. Einige Virustypen bauen ihre Gene sogar physisch in das Genom des Wirts ein.

Auf diese Weise werden die Gene des Virus in die Gene der Wirtszelle integriert, und zwar für die gesamte Lebensdauer der Zelle. Solche Viren könnten als Vehikel genutzt werden, um "gute" Gene in eine menschliche Zelle zu bringen.

Zunächst würde ein Wissenschaftler die Gene aus dem Virus entfernen, die Krankheiten verursachen. Dann würden sie diese Gene durch Gene ersetzen, die die gewünschte Wirkung kodieren (zum Beispiel die Insulinproduktion bei Diabetikern). Dieses Verfahren muss so durchgeführt werden, dass die Gene, die es dem Virus ermöglichen, sein Genom in das Genom seines Wirts einzubauen, intakt bleiben.

Warum viral verwenden

- Viren sind obligate intrazelluläre Parasiten
- Sehr effizient bei der Übertragung viraler DNA in Wirtszellen
- Spezifische Zielzellen: abhängig von den viralen Bindungsproteinen (Kapsid oder Glykoproteine)
- Genaustausch: nicht essentielle Gene des Virus werden entfernt und exogene Gene eingefügt

Viren als Vektoren

Jedes Virus kann potenziell zur Expression von Fremdgenen verwendet werden. Verschiedene Viren sind für unterschiedliche Verwendungszwecke besser geeignet. Die Integration kann wichtig sein, wie z. B. bei vielen Gentherapieanwendungen. Größere Viren können mehr und größere Fremdgene exprimieren, sind aber schwieriger zu manipulieren. Die Cis-wirkenden Promotoren für die Genomreplikation und -verpackung müssen verstanden werden. Klinische Gentherapieversuche stützen sich auf Retroviren oder Adenoviren, um das gewünschte Gen zu übertragen.

Andere Viren, die als Vektoren verwendet werden, sind Adeno-assoziierte Viren, Lentiviren, Pockenviren, Alphaviren und Herpesviren.

Diese Viren unterscheiden sich darin, wie gut sie Gene auf die Zellen übertragen, die sie erkennen und infizieren können, und ob sie die DNA der Zelle dauerhaft oder vorübergehend verändern

Risikofaktoren

Viren können in der Regel mehr als einen Zelltyp infizieren. Wenn also virale Vektoren verwendet werden, um Gene in den Körper zu tragen, können sie sowohl gesunde Zellen als auch Krebszellen infizieren. Eine weitere Gefahr besteht darin, dass das neue Gen an der falschen Stelle in die DNA eingefügt wird, was zu schädlichen Mutationen der DNA oder sogar zu Krebs führen kann. Dies ist bei klinischen Versuchen mit Patienten mit X-chromosomaler schwerer kombinierter Immunschwäche (X-SCID) geschehen, bei denen hämatopoetische Stammzellen mit einem korrigierenden Transgen unter Verwendung eines Retrovirus transduziert wurden, was bei 4 von 20 Patienten zur Entwicklung einer T-Zell-Leukämie führte.

Andere Bedenken betreffen die Möglichkeit, dass übertragene Gene überexprimiert werden und so viel des fehlenden Proteins produzieren, dass es schädlich ist; dass der virale Vektor eine Immunreaktion hervorrufen könnte; und dass das Virus vom Patienten auf andere Personen oder in die Umwelt übertragen werden könnte.

Allerdings ist diese grundlegende Art der Geneinführung derzeit sehr vielversprechend, und Ärzte und Wissenschaftler arbeiten hart daran, mögliche Probleme zu beheben, die bestehen könnten. Sie verwenden Tierversuche und andere Vorsichtsmaßnahmen, um diese Risiken zu erkennen und zu vermeiden, bevor klinische Versuche am Menschen durchgeführt werden.

Mögliche Verwendungszwecke von viralen Vektoren

Gentherapie zum Ersatz eines fehlenden oder unzureichenden Gens. Heilung von Krankheiten durch Expression eines Reagens, das z. B. Krebszellen abtötet. Immunisierung durch Expression eines Antigens eines Krankheitserregers. Expression von Genen in kultivierten Zellen für wissenschaftliche Studien.

Der ideale Vektor für den Gentransfer

- Hohe Viruskonzentration, so dass viele Zellen infiziert oder transduziert werden können
- Bequemlichkeit und Reproduzierbarkeit der Produktion
- Fähigkeit, sich teilende und sich nicht teilende Zellen zu transduzieren
- Fähigkeit zur Integration an einer ortsspezifischen Stelle im Wirtschromosom oder zur erfolgreichen Erhaltung als stabiles Episom
- Eine Transkriptionseinheit, die auf Manipulationen an ihren regulatorischen Elementen reagieren kann
- Fähigkeit, den gewünschten Zelltyp anzusprechen
- Keine Bestandteile, die eine Immunreaktion hervorrufen

Kapitel 6

Einführung von Genen in Tiere

Tabelle (10): Methoden und wesentliche Einschränkungen des Insertionsgens.

Methoden	Wesentliche Beschränkungen
Kalziumphosphat	
DEAE Dextran	
Wirkungsgrad	Niedrig
Kationische Lipide, Liposome	
Direkte DNA-Injektionen	Niedriger Wirkungsgrad
Elektroporation	
Vorübergehende Expression	

Tabelle (11): Virale Vektoren mit wesentlichen Einschränkungen

Virale Vektoren	Wesentliche Beschränkungen
Papova (SV40,	Größe, Hostbereich

Polyoma)	
Papillom (BPV)	Größe, Integration, Transformation
Adeno assoziiert (AAV)	Größe, Produktion
Adeno	Größe, Antigenität, episomale DNA, Toxizität
Herpes/Vaccinia	Pathogen, zytotoxisch, lytisch
Retroviren	Unfähigkeit, post-mitotische Zellen zu infizieren
Lentiviren	Sicherheit, Integration

Genetische Krankheiten

- 1- Zystische Fibrose
- 2- Blutkrankheiten
- 3- Muskeldystrophie
- 4- Diabetes

Erworbene Krankheiten

- 1- Krebs
- 2- Kardiovaskulär
- 3- Neurologische Störungen
- 4- Infektionskrankheiten (AIDS)

Tabelle (12): Zielzellen mit Krankheiten, weil Defekt und Inzidenz.

Disease	Defect	Incidence	Target Cells
Severe combined immunodeficiency (SCID)	Adenosine deaminase (ADA) in 25% of SCID patients	Rare	Bone-marrow cells or T lymphocytes
Hemophilia	A	Factor VII deficiency	1:10,000 males
	B	Factor IX deficiency	1:30,000 males
Familial hypercholesterolemia	Deficiency of low-density lipoprotein (LDL) receptor	1:1 million	Liver
Cystic fibrosis	Faulty transport of salt in lung epithelium	1:3000 Caucasians	Airways in the lungs
Hemoglobinopathies thalassemias	(Structural) defects in the α or β globin gene	1:600 in certain ethnic groups	
Gaucher's disease	Defect in the enzyme glucocerebrosidase	1:500 in Ashkenazi Jews	Bone marrow cells, macrophages
α_1 antitrypsin deficiency inherited emphysema	Lack of α_1 antitrypsin	1:3500	Lung or liver cells
Duchenne muscular dystrophy	Lack of dystrophin	1:3000 males	Muscle cells

Tabelle (13): Vektoren auf der Basis von RNA-Viren.

Vectors Based on RNA Viruses

Features	Retroviral	Lentiviral	Alphaviral
Maximum Insert size	7-7.5 kb	7-7.5 kb	5 kb
Concentrations viral particles/ml	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁹
Route of gene delivery	Ex vivo	Ex/In vivo	In vivo
Integration	Yes	Yes	No
Duration of expression in vivo	Shorter than theorized	Long	Short
Stability	Good	Not tested	Good
Ease of Preparation scale up	Pilot scale up up to 20-50 liters	Not known	Not known
Immunological problems	Few	Few	Unknown
Pre-existing host immunity	Unlikely	Unlikely, except in AIDS patients	No
Safety problems	Insertional mutagenesis?	Insertional mutagenesis?	Few

Abbildung (14): Vektoren auf der Basis von DNA und DNA-Viren.

Vectors Based on DNA and on DNA Viruses

Features	Adenoviruses	Adeno-associated viruses	Herpesviruses	Vaccinia virus	Naked DNA /Lipid DNA
Maximum Insert size	7.5 kb	4.5kb	~30kb	>25 kb	Unlimited size
Concentrations viral particles/ml	>10 ¹⁰	>10 ¹²	>10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁹	No limitation
Route of gene delivery	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo
Integration	No	Yes/No	No	No	very poor
Duration of expression in vivo	Short	Long	Short/ Long in CNS?	Short	Short
Stability	Good	Good	Unknown	Good	Very good
Ease of Preparation scale up	Easy to scale up	Difficult to purify, difficult to scale up	Not yet tried	Vaccine production facilities exist	Easy to scale up
Immunological problems	Extensive	Not known	Not known	Extensive	None
Pre-existing host immunity	Yes	Yes	Yes	Diminishing as unvaccinated population grows	No
Safety	Inflammatory response, toxicity	Inflammatory response, toxicity	Neurovirulence? Insertional mutagenesis	Disseminated vaccinia in immunocompromised hosts	None?

Rekombinanter Vaccinia-Virus-Expressionsvektor

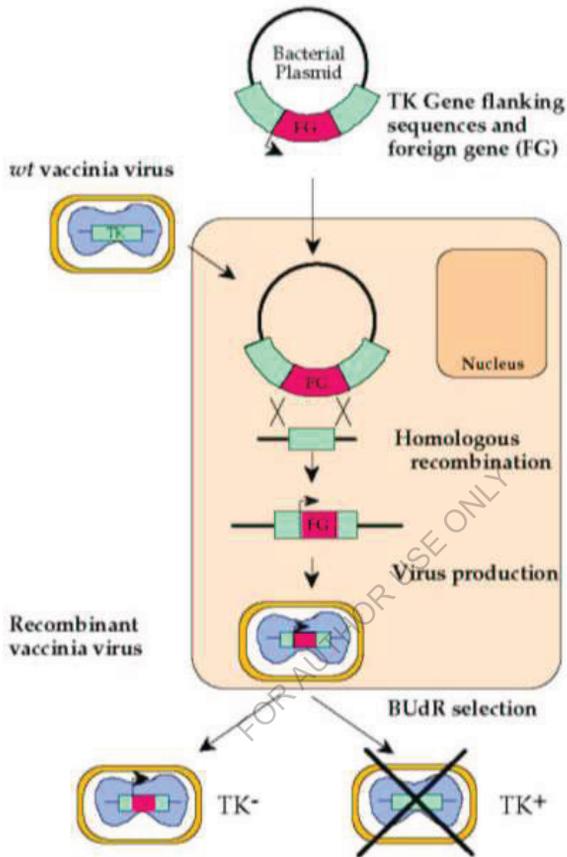


Abbildung (30): Rekombinanter Vaccinia-Virus-Expressionsvektor

Konstruktion eines infektiösen Impfstoffvirus, das das HA-Gen des Influenzavirus exprimiert.

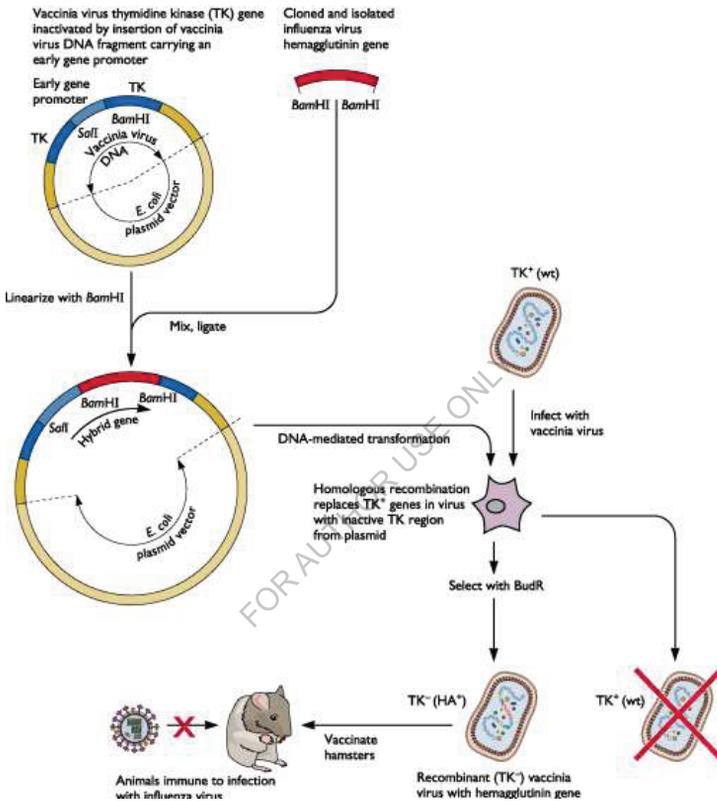


Abbildung (31): Konstruktion eines infektiösen Impfstoffvirus, das das HA-Gen des Influenzavirus exprimiert.

Struktur der Adenovirus-Partikel

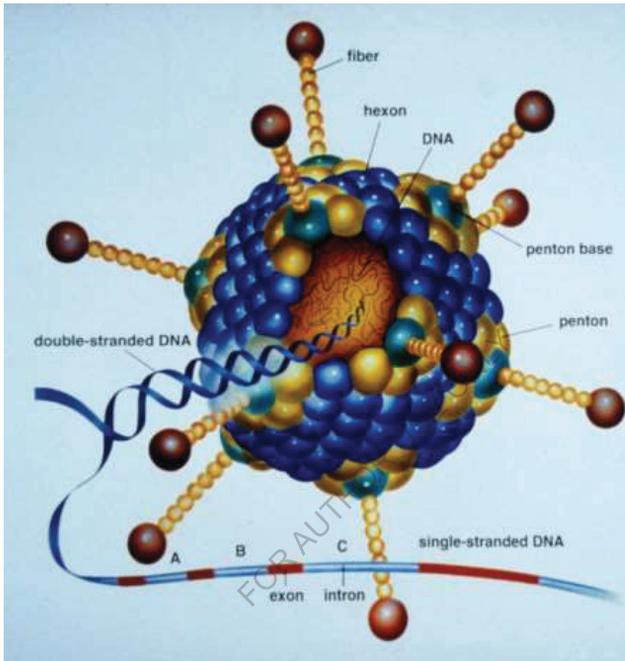


Abbildung (32): Struktur der Adenovirus-Partikel

- Nicht umhüllte Partikel
- Enthält lineare doppelsträngige DNA

- Integriert sich nicht in das Wirtsgenom
- Repliziert sich als episomales Element im Zellkern

Adenovirale Vektoren:

Doppelstrangige DNA-Viren, verursachen in der Regel gutartige Atemwegserkrankungen; die Serotypen 2 und 5 werden als Vektoren verwendet. Kann sich teilende und sich nicht teilende Zellen infizieren, kann in hohen Titern produziert werden. Replikationsdefiziente Adenovirus-Vektoren können durch Austausch des E1- oder E3-Gens, das für die Replikation unerlässlich ist, hergestellt werden. Die rekombinanten Vektoren werden dann in Zellen repliziert, die die Produkte des E1- oder E3-Gens exprimieren, und können in sehr hohen Konzentrationen hergestellt werden. Zellen, die mit rekombinanten Adenoviren infiziert sind, können das therapeutische Gen exprimieren, aber da wesentliche Gene für die Replikation entfernt wurden, kann sich der Vektor nicht replizieren.

Generation of a Non-replicating Adenovirus Expression Vector

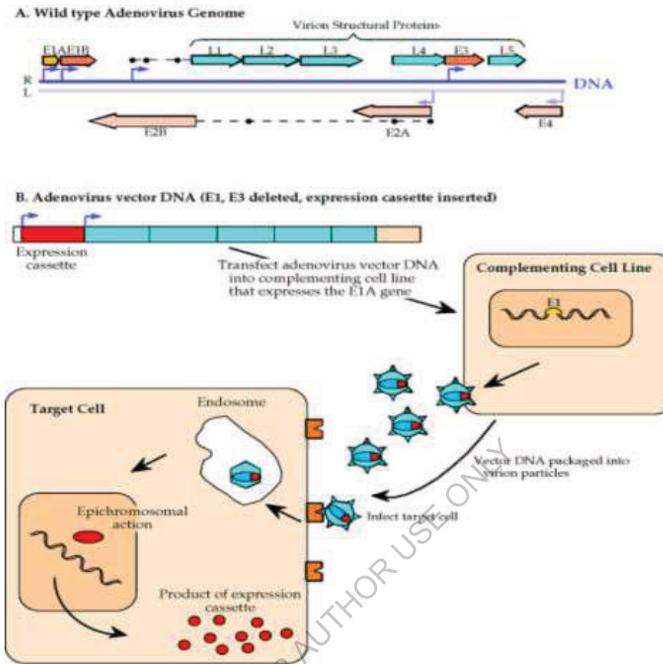


Abbildung (33): Adenovirale Vektoren.

Adenovirale Vektoren - Beschränkungen

Adenovirale Vektoren können Zellen *in vivo* infizieren und bewirken, dass sie hohe Mengen des Transgens exprimieren. Die Expression hält jedoch nur für kurze Zeit an (5-10 Tage nach der Infektion).

- Die Immunreaktion ist der Grund für die kurzfristige Ausprägung.

- Die Immunreaktion ist stark, da sie sowohl die zelltötende "zelluläre" Reaktion als auch die Antikörper produzierende "humorale" Reaktion auslöst.

- Die humorale Reaktion führt zur Bildung von Antikörpern gegen die Adenovirusproteine und verhindert jede weitere Infektion, wenn eine zweite Injektion des rekombinanten Adenovirus verabreicht wird.

Adenovirale Vektoren:

Vorteile:

- 1- Höherer Titer
- 2- Effiziente Transduktion von sich nicht teilenden Zellen in vitro und in vivo.

Benachteiligungen:

- 1- Toxizität
- 2- Immunologische Reaktion
- 3- Vorherige Exposition

Adeno-assoziierte virale Vektoren:

- AAV ist ein einfaches, nicht-pathogenes, einzelsträngiges DNA-Virus, das zur Replikation auf ein Helfervirus (in der Regel ein Adenovirus) angewiesen ist.
- Es hat zwei Gene (cap und rep), die zwischen invertierten terminalen Wiederholungen liegen, die den Anfang und das Ende des Virus definieren und die Verpackungssequenz enthalten.
- Das cap-Gen kodiert virale Kapsidproteine, und das rep-Genprodukt ist an der viralen Replikation und Integration beteiligt.
- Es kann eine Vielzahl von Zelltypen infizieren, und in Anwesenheit des rep-Genprodukts kann sich die virale DNA bevorzugt in das menschliche Chromosom 19 integrieren.

AAV-Vektoren

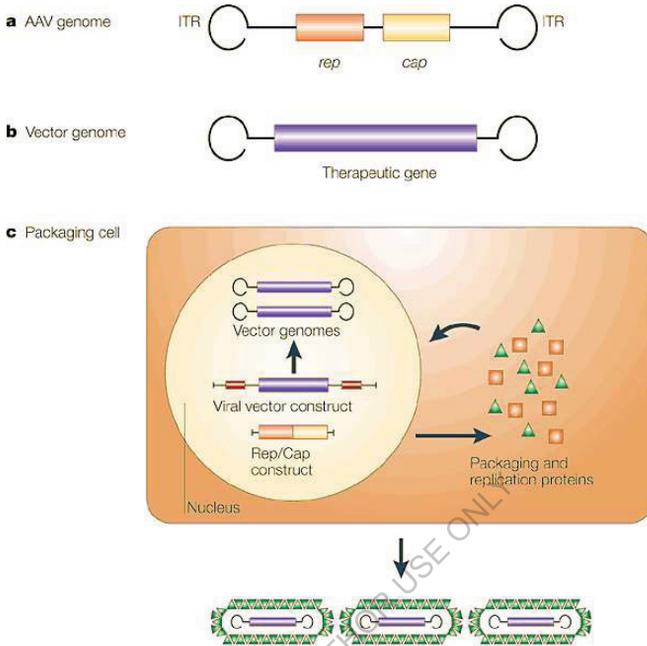


Abbildung (33): AAV-Vektoren

Um einen AAV-Vektor herzustellen, werden die rep- und cap-Gene durch ein Transgen ersetzt.

- Die Gesamtlänge des Inserts darf 4,7 kb, also die Länge des Wildtyp-Genoms, nicht überschreiten.

- Die Herstellung des rekombinanten Vektors erfordert, dass rep und cap zusammen mit den Genprodukten des Helper-Virus in trans bereitgestellt werden.

- Die derzeitige Methode besteht in der Cotransfektion zweier Plasmide, eines für den Vektor und eines für rep und cap, in mit Adenovirus infizierte Zellen.

- Diese Methode ist umständlich, wenig ergiebig und anfällig für Kontaminationen mit Adenovirus und Wildtyp-AAV.

- Das Interesse an AAV-Vektoren ist darauf zurückzuführen, dass sie in das Wirtsgenom integriert werden und eine verlängerte Genexpression ermöglichen

Adeno-assoziierte Virus-Vektoren:

Vorteile:

- Alle viralen Gene entfernt
- Sicher
- Transduktion von sich nicht teilenden Zellen
- Stabile Expression

Benachteiligungen:

- Kleines Genom begrenzt Größe der Fremd-DNA
- Arbeitsintensive Produktion

- Status des Genoms nicht vollständig geklärt

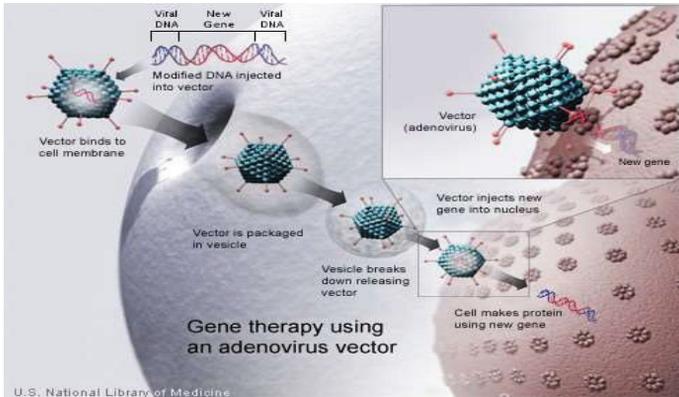


Abbildung (34): Vorteile von Adeno-assoziierten Virus-Vektoren.

Ein neues Gen wird in einen Adenovirus-Vektor eingefügt, mit dem die veränderte DNA in eine menschliche Zelle eingebracht wird. Wenn die Behandlung erfolgreich ist, bildet das neue Gen ein funktionelles Protein.

Zystische Fibrose

- Mukoviszidose wurde erstmals in den späten 1930er Jahren als Krankheit beschrieben.
- 1988 wurde die erste Mutation für Mukoviszidose auf dem 7. Chromosom des menschlichen Genoms entdeckt.
- Die Forschung hat inzwischen über 1000 verschiedene Mutationen gefunden, die Mukoviszidose verursachen können.

Mukoviszidose ist eine autosomal rezessive Krankheit und die häufigste. Mukoviszidose ist aus vier Hauptgründen ein idealer Kandidat für eine Gentherapie:

- 1- Es handelt sich um einen einzelnen Gendefekt;
- 2- Es handelt sich um einen rezessiven Zustand, wobei Hetero-Zygoten phänotypisch sind. Normalerweise normal (was darauf hindeutet, dass die Auswirkungen der Gendosierung nicht entscheidend sind).
- 3- Die Hauptpathologie befindet sich in der Lunge, die für die Behandlung zugänglich ist.
- 4- Es handelt sich um eine fortschreitende Krankheit mit einem praktisch normalen Phänotyp bei der Geburt, die ein therapeutisches Fenster bietet.

1993 verwendeter Vektor: Adenovirus

- Bei den ersten klinischen Versuchen zur Gentherapie der zystischen Fibrose wurde ein Adenovirus-Vektor verwendet, um das CFTR-Gen (cystic fibrosis transmembrane regulator) in voller Länge in die Zellen zu bringen. Angemessene Dosen von Adenovirus-Vektor 1995 Liposom.
- Die Versuche mit dem liposomenvermittelten CFTR-Gentransfer begannen im Jahr 1995.
- Nichtvirale Vektoren haben das Potenzial, einige der kritischen Probleme zu vermeiden, die bei viralen Vektoren beobachtet wurden, wie z. B. die Immunantwort, die begrenzte Verpackungskapazität und die zufällige Integration.
- Liposomen sind zwar leicht wirksam, aber ihre Wirkung ist nicht von Dauer. Damit dieser Ansatz funktioniert, müssen die Forscher herausfinden, wie man die Verabreichung verbessern, die Wirkung dauerhafter machen und die unerwünschten Nebenwirkungen verringern kann.

Bisher wurden nur kationische Systeme auf Liposomenbasis in klinischen Studien bei zystischer Fibrose getestet.

1998 Adeno-assoziiertes Virus

- Versuche mit adeno-assoziierten Viren zur Übertragung des CFTR-Gens begannen 1998.
- Da es sicher ist, verspricht das Adeno-assoziierte Virus - wie wir bereits vorhergesagt haben - eine gute Möglichkeit zu sein, das CFTR-Gen in die Atemwegszellen der Patienten einzubringen.
- Die Forscher müssen jedoch mehr darüber erfahren, wie das Virus die Zellen infiziert, um es zu einer wirksamen Verabreichungsmethode zu machen.

die meisten Erfahrungen mit der Bereitstellung von Vektoren

- Die meisten Erfahrungen mit der Verabreichung von Vektoren in die Lunge beruhen auf der Instillation großer Mengen vektorhaltiger Flüssigkeit in die Lunge über die Nase.
- Allerdings:
 - I. Diese Art der Verabreichung ist wegen der Aspirationsgefahr mit Sicherheitsproblemen verbunden.

Darüber hinaus führt die Instillation großer Flüssigkeitsvolumina zu einer erhöhten alveolären Exposition infolge des Massenflusses in das Lungenparenchym. Diese Exposition ist unerwünscht, denn sie kann

Orale Inhalation von aerosolisierten Vektoren

Die Aerosolisierung einer Flüssigkeit erfolgt jedoch in der Regel mit Hilfe eines Verneblers, und die meisten Vernebler sind so konzipiert, dass sie kleine Partikel erzeugen. Dies liegt daran, dass die meisten Vernebler für die Verabreichung von Medikamenten zur Behandlung von Asthmapatienten entwickelt wurden, und bei Asthma sind die Zielregionen der Lunge oft die peripheren Atemwege. Kleine Partikel verbessern die Verabreichung an die peripheren Atemwege und den alveolären Bereich der Lunge, aber auch dies ist für die Verabreichung von Genvektoren unerwünscht, da die Möglichkeit besteht, sie zu induzieren.

- Eine Möglichkeit, die alveoläre Ablagerung zu vermeiden, besteht darin, ein Aerosol zu erzeugen, das hauptsächlich aus großen Tröpfchen besteht.

- Die Verabreichung des Vektors mittels einer Sprühvorrichtung, die in ein Bronchoskop eingeführt wird, kann einen weiteren Vorteil gegenüber der Verneblung haben.
- Die Forschung deutet darauf hin, dass die Vernebelung des Vektors ein Mittel sein könnte, das auf die größeren, zentralen Atemwege abzielt und die Ablagerung in den kleineren Atemwegen und im Alveolarbereich vermeidet, was bei Verneblern, die kleine Aerosolpartikel erzeugen, wahrscheinlicher ist.
- Die Ergebnisse der Studien mit der Sprühtechnologie deuten darauf hin, dass eine effiziente und gezielte Verabreichung von aerosolisierten Genvektoren in die Lunge in Zukunft möglich sein könnte.

Aktuelle Behandlung

Die moderne Behandlung umfasst heute

- Die Einnahme von Verdauungsenzymen, Nahrungsergänzungsmitteln,
- Perkussion und Haltungsdrainage der Lunge, verbesserte Antibiotika
- Einatmen von medikamentenhaltigen Aerosolen.

Das am meisten beachtete Gentherapeutikum in der Entwicklung ist ein inhalatives Medikament

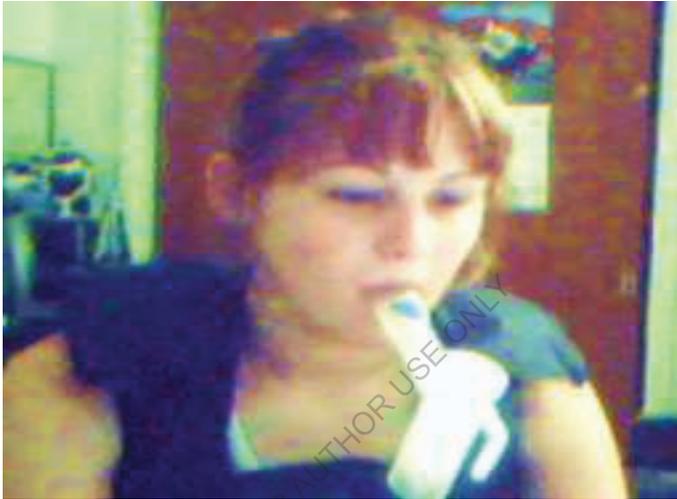


Abbildung (34): Behandlung der zystischen Fibrose mit einem Vernebler und der ThAIRapy-Weste.

Eine typische Atmungsbehandlung bei Mukoviszidose, bei der ein Vernebler und die ThAIRapy-Weste verwendet werden.

Herausforderungen

- Das Ziel, eine wirksame Gentherapie für die Mukoviszidose-Lungenerkrankung zu entwickeln, hat zur Erreichung mehrerer Meilensteine auf dem Gebiet der Gentherapie geführt. Dazu gehören:
- Die ersten veröffentlichten In-vivo-Gen-transfers mit Adenovirus (Ad) und mit rekombinantem Adeno-assoziiertem Virus (rAAV).
- Die ersten klinischen Versuche der Phase I mit jedem dieser Vektorsysteme.
- Die Wahl des Vektors, die Art der Verabreichung an die Atemwege, die Translokation der genetischen Information und die Expression von normalisiertem CFTR in ausreichender Menge, um den CF-Phänotyp in der Lunge von CF-Patienten zu korrigieren, sind nach wie vor Hürden bei der Entwicklung der Gentherapie für CF.
- Einige Versuche der Gentherapie waren zunächst erfolgreich, führten aber nicht zu akzeptablen Langzeitergebnissen.

Lungenkrebs

Lungenkrebs ist weltweit die häufigste Krebsart, sowohl was die Prävalenz als auch die Mortalität betrifft. Rauchen ist ein Risikofaktor, der in hohem Maße mit dieser Krebsart in Verbindung gebracht wird (85-90 %), und die Belastung durch Tabakrauch in der Umwelt kann bei Nichtrauchern Krebs verursachen.

Bestimmte Stoffe wie Arsen, Asbest, Chrom, Nickel und Vinylchlorid, die in der Arbeitsumgebung vorkommen, erhöhen das Risiko und können ebenfalls Krebs verursachen.

Klassifizierung

Die 2 Haupttypen von Lungenkrebs sind:

- 1- Der kleinzellige Lungenkrebs macht 20 % aller dieser Krebsarten aus. Die Zellen vermehren sich schnell und können in wichtige Organe wie Lymphknoten, Knochen, Gehirn, Nebennieren und Leber metastasieren. Der Primärtumor entsteht in der Regel in der Nähe der Bronchien und breitet sich bis ins Zentrum der Lunge aus.

Die Hauptursache für diese Art von Krebs ist das Rauchen.

2- Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom :

macht fast 80 % aller Lungenkrebsfälle aus. Er breitet sich langsamer aus als der kleinzellige Typ.

Die 3 Subtypen sind:

1- Plattenepithel- oder Epidermoidkarzinom (30 %).

2- Adenokarzinom (40 %).

3- Undifferenziertes Karzinom mit großen Zellen (10 %).

Einige Krebsarten beginnen in den Bronchiolen und entwickeln sich von dort aus über mehrere Jahre hinweg weiter.

Die genetische Behandlung von Lungenkrebs ist schwierig, da es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt. Daher wurden verschiedene Alternativen zur Stimulierung des Immunsystems vorgeschlagen, darunter der Transfer von Selbstmordzellen, die Inaktivierung von Onkogenen, Gensatz, Tumorunterdrücker und der Transfer von pro-apoptotischen Genen.

Ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Krebsbekämpfungsstrategien ist die *Telomerase*, eine reverse

Ribonukleoprotein-Transkriptase, die die menschlichen Telomere durch eine terminale Transferase-Aktivität verlängert. Telomerase ist in der überwiegenden Mehrheit der menschlichen Tumoren hoch aktiv, wie seit 1994 bekannt ist. Ihre wesentlichen Gene sind hTR und hTER.

Übertragung von Genen bei Lungenkrebs

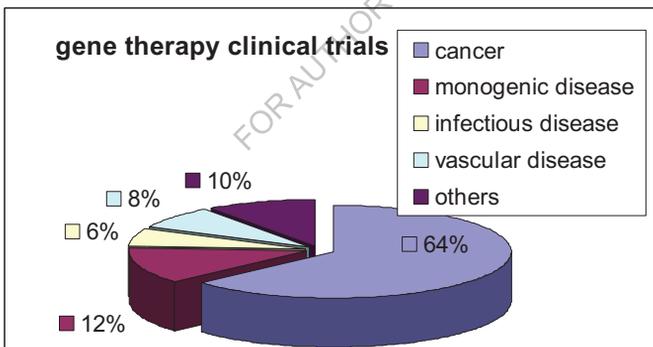
Aerosol Technoque

Die meisten Arzneimittel und DNA-Komplexe werden auf herkömmliche Weise verabreicht: oral oder intravenös. Die Biodistribution von Arzneimitteln über diese Strategien ist uneinheitlich und die Menge, die in der Lunge abgelagert wird, ist gering. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei diesen Systemen ist die Toxizität, die nach der Injektion beobachtet wird. Die Fähigkeit, Transgene in der Lunge selektiv zu exprimieren, kann die Entwicklung von Gentherapien für eine Vielzahl von Krankheiten des Menschen.

Darüber hinaus hemmen Liposomen, die mit 9-Nitrocamptotecin (9NC-DLPC) formuliert sind, einem Inhibitor der Topoisomerase 1, das Wachstum von subkutan

induzierten Tumoren wie die Metastasierung von Lungenkrebs im Mausmodell, wobei eine synergistische Wirkung durch die Kombination der Verabreichung von Gen p53 und PEI beobachtet wurde. In einer anderen Studie wurde eine Überexpression von WT1 in 12/15 Zelllinien von Lungenkrebs festgestellt. Das Protein WT1 ist ein attraktives Ziel für die Immuntherapie.

Gentherapie bei Krebs



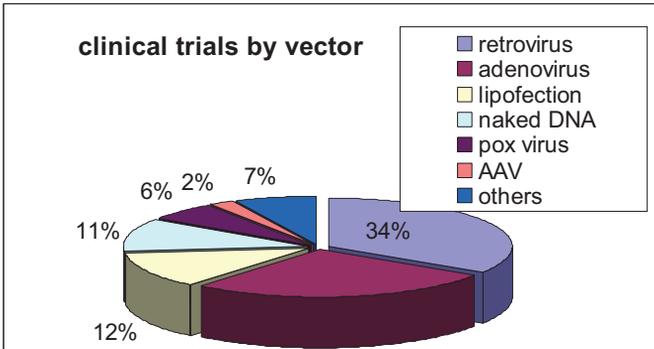


Abbildung (35): Klinische Pfade nach Vektoren.

Neuere Krebstherapien durch Gentherapie:

1- Stimulierung des Immunsystems

In Tiermodellen wurde die Rückbildung von Tumoren durch die Verabreichung von Zytokinen wie den Interleukinen (IL) -2, 4, 6, 7, 12, dem Stimulationsfaktor für Kolonien granulozytärer Makrophagen (GM-CSF), dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α), dem Interferon α (IFN- α) und dem IFN- γ nachgewiesen, jedoch ist die Anwendung beim Menschen aufgrund der Toxizität begrenzt.

Die auf Zytokinen basierenden Strategien können zur

Entwicklung von Tumorzellimpfstoffen führen, in die genetisch veränderte Fibroblasten oder Tumorzellen eingebaut werden, die Zytokine absondern

2- Übertragung von Killergenen

Diese Art der Gentherapie basiert auf der Übertragung eines Gens, das in der Lage ist, eine ungiftige Verbindung in einen toxischen Metaboliten umzuwandeln, der bei Verabreichung des entsprechenden Prodrugs Tumorzellen selektiv abtötet.

Die beiden am häufigsten für diese Art der Therapie verwendeten Gene sind: *Thymidin-Kinase des Herpes-Simplex-Virus HSV-tk und das Gen der Cytosin-Deaminase. Cytosin-Deaminase wandelt 5-Fluorocytosin in einen Antimetaboliten um: zytotoxisches 5-Fluoracyl. HSV-tk wandelt Gancyclovir in einen toxischen Trifosfat-Metaboliten um.

Eine adenovirale Transduktion in nicht-kleinen Krebszellen mit HSV-tk, gefolgt von der Verabreichung von Gancyclovir, tötet selektiv die Tumorzellen.

3- Hemmung von Onkogenen

Diese Art der Therapie basiert auf der Identifizierung und Hemmung der Gene, die für die Karzinogenese entscheidend

sind. Die Onkogene der ras-Familie gehören zu den häufigsten Onkogenen, die bei Lungenkrebs aktiviert werden, und sind daher Ziele für diese Art von Therapie. In präklinischen Studien wird durch ein Plasmid mit einer Antisense-Sequenz mit k-ras die mRNA selektiv durch Mutation blockiert, und das Tumorwachstum wird sowohl in vivo als auch in vitro in Mausmodellen reduziert.

4- Gene Unterdrücker von Tumoren

Eine andere Gentherapiestrategie, die im Gegensatz zu den Onkogenen auf der Arbeit mit Tumorsuppressoren beruht, ist die mit den beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens, die durch die Induktion von Tumorwachstum eliminiert oder inaktiviert werden sollen. Theoretisch kann der Ersatz von nur einer Kopie des Tumorsuppressorgens in Zellen mit einem homozygoten Funktionsverlust die Möglichkeiten des normalen Wachstums und der zellulären Vermehrung wiederherstellen.

Eines der am häufigsten mutierten Gene (50-70 % der Fälle)

ist p53, das durch Überexpression von Mdm-2 inaktiviert werden kann.

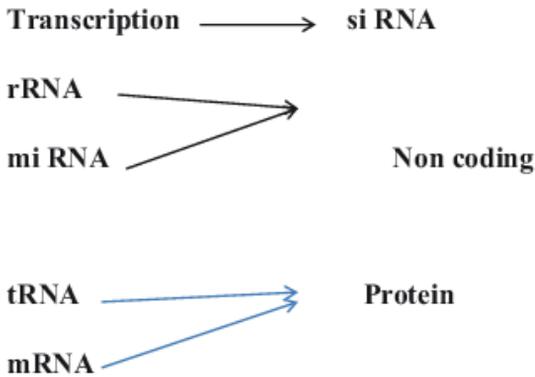
5- Übertragung von pro-apoptischen Genen
Zellen mit mehreren genetischen Veränderungen werden normalerweise durch Apoptose eliminiert. Um zu überleben, sind sie auf die Überexpression von antiapoptischen Molekülen wie bcl-2, bcl-xL oder survivin angewiesen. Die Herunterregulierung dieser Proteine kann die apoptotische Schwelle der Zellen herabsetzen.

Die 2 wichtigsten apoptotischen Signalübertragungswege sind:

- 1-Der mitochondriale Weg
- 2-Der Todesrezeptor-Weg.

Zellen mit kondensiertem und fragmentiertem Chromatin zeigen Apoptose.

Produkt der Gene



Spezifische Hemmung der Genexpression

Unterdrückung spezifischer Gene, z. B. aktivierter Onkogene, durch den Einsatz von Molekülen, die RNA-Transkripte abbauen.

Die Strategien umfassen

- 1- Antisense-Therapie durch siRNA (small interfering RNA) Ribozyme.

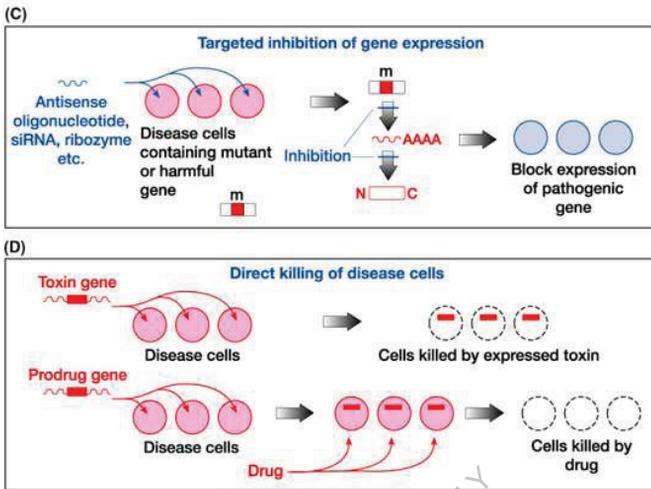


Figure 21-4 part 2 of 3 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

Abbildung (36): Direkte Abtötung von Krankheitszellen.

Antisense-Therapie Kurze Abschnitte synthetischer ssDNA, die auf die mRNA-Transkripte anormaler Proteine abzielen und deren Translation verhindern.

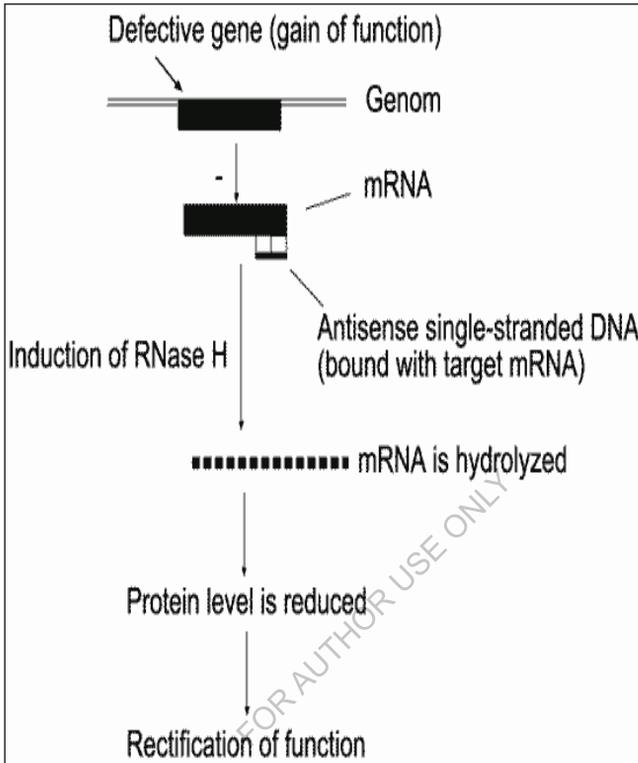


Abbildung (37): Genterapie bei Krebs

2- siRNA-Therapie

Kleine interferierende RNAs, kurze Abschnitte (21-23nt) von synthetischer dsRNA. Hat 3'-Überhänge von 2 nt. Wird in

den RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut. Die Ziel-mRNA wird in der Mitte gespalten.

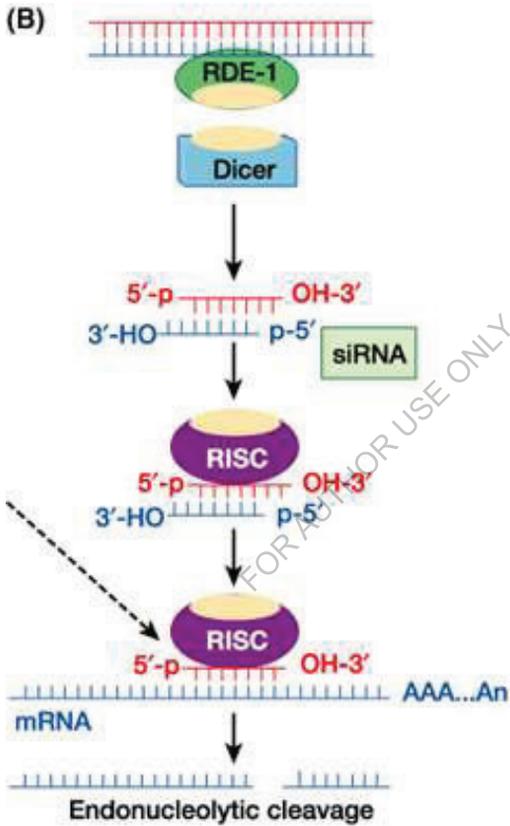


Abbildung (38): siRNA-Therapie.

Gezielter Zelltod

Gewebespezifische Toxizität als Folge der Gentherapie.
Nützlich in der Krebstherapie.

Direkter Ansatz

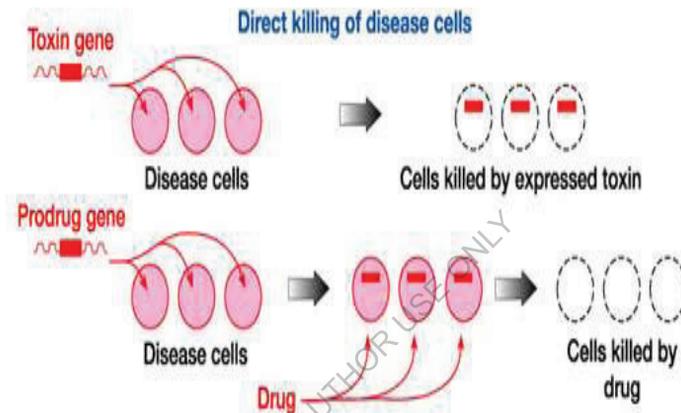


Abbildung (39): Direkter Ansatz für den Tod von Zielzellen.

Gezielter Zelltod

Indirekter Ansatz

Stimulierung einer Immunreaktion gegen bestimmte Zellen
oder Beseitigung der Blutversorgung.

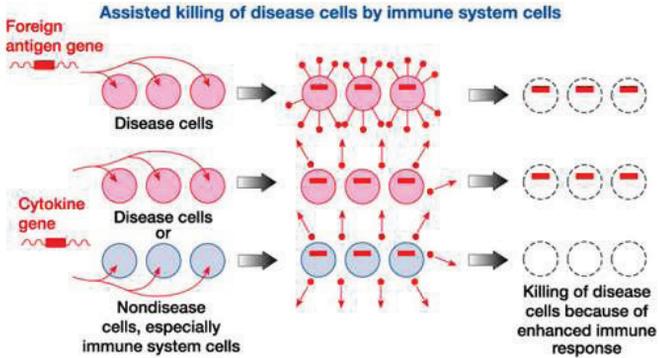


Abbildung (40): Unterstützte Abtötung von Krankheitszellen durch Zellen des Immunsystems.

Bereitstellung von Tumorsuppressorgenen

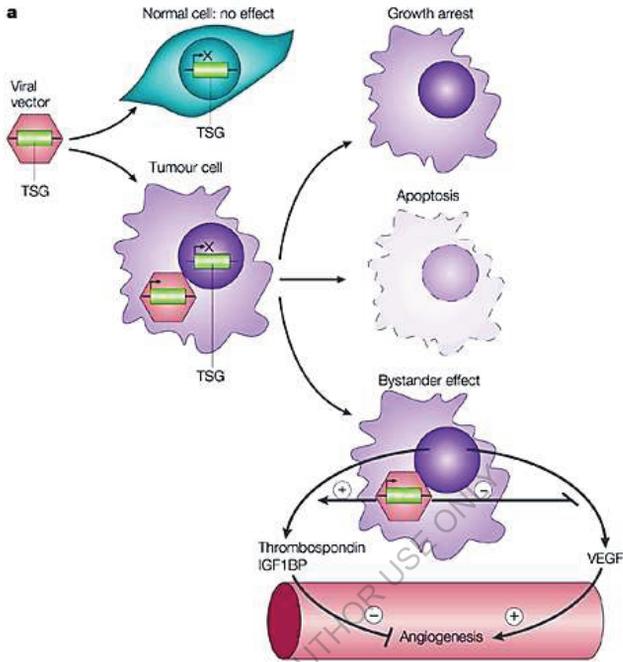


Abbildung (41): Verabreichung eines Tumorsuppressorgens

Verabreichung von Wirkstoffen, die die Expression von Onkogenen blockieren

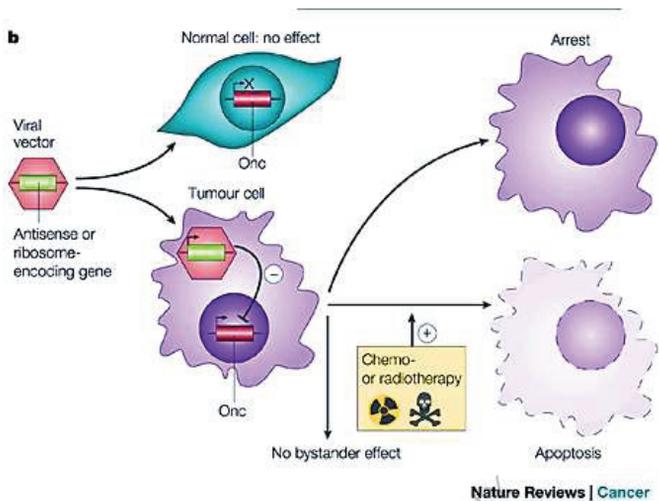


Abbildung (42): Verabreichung von Wirkstoffen, die die Expression von Onkogenen blockieren.

Kapitel 7

Gentherapieanwendungen für die Krebsbehandlung

1- Verschiedene Gentherapiestrategien wurden zur Behandlung von Krebs eingesetzt, z. B:

- Pro-Drogen aktivierende Selbstmord-Gentherapie.
- Anti-angiogene Gentherapie.
- Onkolytische Virotherapie .
- Gentherapie-basierte Immunmodulation.
- Korrektur/Kompensation von Gendefekten.
- Genetische Manipulation von Apoptose- und Tumorinvasionswegen.
- Antisense.
- RNAi-Strategien.

Zu den Krebsarten, auf die die Gentherapie abzielt, gehören Gehirn-, Lungen-, Brust-, Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Dickdarm-, Prostata-, Blasen-, Kopf-, Hals-, Haut-, Eierstock- und Nierenkrebs.

- Derzeit sind zwei Krebs-Gentherapieprodukte auf dem Markt zugelassen, beide in China.

- Darüber hinaus hat die Stimulierung des Immunsystems des Wirts durch gentherapeutische Ansätze großes Interesse geweckt, da die meisten viralen und nichtviralen Vektoren und Methoden, die bei der Gentherapie von Krebs eingesetzt werden, in klinischen Versuchen erprobt wurden.

Lungenkrebs ist eine der aggressivsten und tödlichsten Neoplasien. Heute ist es möglich, eine frühe Diagnose zu stellen. Mit diesen neuen Instrumenten kann das Leben des Patienten vielleicht verlängert und die Behandlungskosten gesenkt werden.

Über 900 Patienten wurden mit Gentransferprodukten behandelt, die defekte Gene (p53, BRCA1, RB, p16), ein wichtiges Tumorsuppressorgen, insbesondere bei nicht kleinzelligem Lungenkrebs, ersetzen.

Große Probleme, die Wissenschaftler bewältigen müssen:

- Es gibt viele Gründe, die das geringe klinische Ansprechen auf Einzelwirkstoff-Impfstrategien erklären, darunter:

die geringe Antigenität von Tumorzellen . *

- Die Entwicklung von Toleranz durch Herabregulierung von MHC.
- Kostimulierend.
- Signaltransduktion.
und andere Moleküle, die für die Erzeugung starker Immunreaktionen wichtig sind.

Große Probleme, die Wissenschaftler bewältigen müssen:

- Suche nach effizienteren Wegen, um die Gene in das Erbgut des Patienten zu bringen.
- Entwicklung von Vektoren, die sich speziell auf die Zielzellen konzentrieren können.
- Sicherstellen, dass die Vektoren erfolgreich die gewünschte

Genen in jede dieser Zielzellen.

- Gene an einen bestimmten Ort in der DNA des Patienten bringen.
- Sicherstellen, dass die transplantierten Gene durch die normalen physiologischen Signale des Körpers genau kontrolliert werden.

Große Probleme, die Wissenschaftler bewältigen müssen:

Übertragung von Genen

- Für die Verabreichung von Genen bei der Behandlung von Krebs sind viele Systeme verwendet worden, z. B. Adenoviren und verwandte Viren, Pockenviren, Herpes simplex, die jedoch alle eine Immunreaktion gegen den Vektor hervorrufen können, so dass verschiedene Stämme oder verschiedene Verabreichungswege verwendet werden müssen.

Krebs-Gentherapie mit Tumorsuppressor-Genen

Gentherapie zur Behandlung von Lungenkrebs

In dieser klinischen Studie setzten die Wissenschaftler Gentherapie in Kombination mit Strahlentherapie ein, um Lungenkrebs bei 19 verschiedenen Patienten zu behandeln.

Intratumorale Nadelinjektionen von Ad-p53 an den Tagen 1, 18 und 32 der Behandlung.

- Tumore ≥ 4 cm wurden mit 10 ml injiziert

- Tumore ' 4 cm wurden mit 3 ml injiziert

Strahlentherapie

Die Erfolge der Strahlentherapie sind

17/19 Patienten haben die gesamte Therapie überstanden

vollständiges Ansprechen bei 2 Patienten (11%)

partiellies Ansprechen bei 4 Patienten (21%)

stabile Erkrankung bei 1 Patient (5%)

fortschreitende Erkrankung bei 11 Patienten (57%)

FOR AUTHOR USE ONLY

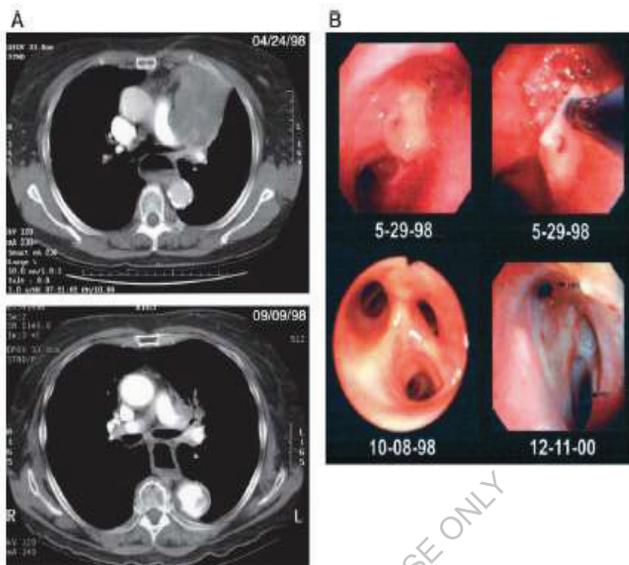


Abbildung (43): Strahlentherapie

Die Patienten zeigten, dass der Krebs in schlimmere Stadien fortschritt Warum?

Große Probleme, die die Wissenschaftler überwinden müssen

Suche nach effizienteren Wegen, um die Gene in das Erbgut der Patienten zu bringen. Entwicklung von Vektoren, die sich speziell auf die Zielzellen konzentrieren können. Sicherstellen, dass die Vektoren die gewünschten Gene erfolgreich in jede dieser Zielzellen einbringen.

Gene an einer präzisen Stelle in der DNA des Patienten anbringen. Sicherstellen, dass die transplantierten Gene genau von den normalen physiologischen Signalen des Körpers gesteuert werden.

FOR AUTHOR USE ONLY

Referenzen

- 1- Langfristige Nachsorge nach der Verabreichung von menschlichen Gentherapieprodukten; Leitlinien für die Industrie, Januar 2020.
- 2- Kaji, Eugene H. (7. Februar 2001). "Gen- und Stammzelltherapien". JAMA. **285** (5): 545–550. doi:10.1001/jama.285.5.545. ISSN 0098-7484. PMID 11176856.
- 3- Ermak G (2015). Emerging Medical Technologies. World Scientific. ISBN 978-981-4675-81-9.
- 4- Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. (August 1990). "Gentransfer in den Menschen Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom unter Verwendung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, die durch retrovirale Gentransduktion modifiziert wurden". The New England Journal of Medicine. **323** (9): 570–578. doi:10.1056/NEJM199008303230904. PMID 2381442.
- 5- Weltweite Datenbank für klinische Gentherapie-Studien Archiviert am 31. Juli 2020 auf der Wayback Machine. The Journal of Gene Medicine. Wiley (Juni 2016)
- 6- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. (Mai 2008). "Sicherheit

- und Wirksamkeit des Gentransfers bei Leberscher kongenitaler Amaurose". *The New England Journal of Medicine*. **358** (21): 2240-2248. doi:10.1056/NEJMoa0802315. PMC 2829748. PMID 18441370.
- 7- MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, Clark KR, Durrant DJ, Cremers FP, Black GC, Lotery AJ, Downes SM, Webster AR, Seabra MC (März 2014). "Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial". *Lancet*. **383** (9923): 1129-1137. doi:10.1016/S0140-6736(13)62117-0. PMC 4171740. PMID 24439297.
- 8- Bak RO, Gomez-Ospina N, Porteus MH (August 2018). "Gene Editing on Center Stage". *Trends in Genetics*. **34** (8): 600611. doi:10.1016/j.tig.2018.05.004. PMID 29908711. S2CID 49269023.
- 9- Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. (November 2016). "CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells". *Nature*. **539** (7629): 384-389. Bibcode:2016Natur.539..384D. doi:10.1038/nature20134. PMC 5898607. PMID 27820943.

- 10-** Gupta RM, Musunuru K (Oktober 2014). "Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9". *The Journal of Clinical Investigation*. **124** (10): 4154-61. doi:10.1172/JCI72992. PMC 4191047. PMID 25271723.
- 11-** Sanches-da-Silva GN, Medeiros LF, Lima FM (21 August 2019). "Der mögliche Einsatz des CasCRISPR-Cas-Systems für die HIV-1-Gentherapie". *International Journal of Genomics*. **2019**: 8458263. doi:10.1155/2019/8458263. PMC 6721108. PMID 31531340.
- 12-** Patent: US7824869B2
- 13-** Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH (April 2006). "Ektopische Expression eines mikrobiellen Rhodopsins stellt die visuellen Reaktionen in Mäusen mit Photorezeptor-Degeneration wieder her". *Neuron*. **50** (1): 23–33. doi:10.1016/j.neuron.2006.02.026. PMC 1459045. PMID 16600853.
- 14-** Zimmer C (16. September 2013). "DNA Double Take". *The New York Times*. Archiviert vom Original am 2. Januar 2022.
- 15-** U.S. Congress, Office of Technology Assessment (Dezember 1984). *Menschliche Gentherapie - Ein*

Hintergrundpapier. DIANE Publishing. ISBN 978-1-4289-2371-3.

- 16-** Sun M (Oktober 1982). "Martin Cline verliert Berufung gegen NIH-Zuschuss". *Wissenschaft*. **218** (4567):37. Bibcode:1982Sci...218...37S. doi:10.1126/science.7123214. PMID 7123214.
- 17-** Ibrahim M (14. Juli 2021). "Gentherapie stellt fehlendes Dopamin bei Kindern mit seltener Gehirnkrankheit wieder her". *Wissenschaft*. Abgerufen am 18. Juli 2021.
- 18-** "Gentherapieversuch deutet auf ein größeres Zeitfenster zur Änderung des Verlaufs einer seltenen Krankheit hin". *Stat*. 12. Juli 2021. Abgerufen am 18. Juli 2021.
- 19-** Flotte, Terence R.; Cataltepe, Oguz; Puri, Ajit; Batista, Ana Rita; Moser, Richard; McKenna-Yasek, Diane; Douthright, Catherine; Gernoux, Gwladys; Blackwood, Meghan; Mueller, Christian; Tai, Phillip W. L. (10 Februar 2022). "AAV-Gentherapie für die Tay-Sachs-Krankheit". *Nature Medicine*. **28** (2): 251–259. doi:10.1038/s41591-021-01664-4. ISSN 1078-8956. PMID 35145305. S2CID 246748772.
- 20-** Sena-Esteves, Miguel (14. Februar 2022). "Erste Gentherapie für Tay-Sachs-Krankheit erfolgreich an zwei

- Kinder verabreicht". The Conversation. Abgerufen am 7. März 2022.
- 21-** "Eltern initiieren bahnbrechende Gentherapie für Kinder mit Tay-Sachs-Krankheit". The Independent. 18. Februar 2022. Abgerufen am 7. März 2022.
- 22-** "Upstaza: Entscheidung der EG steht noch aus". Europäische Arzneimittelbehörde. 19. Mai 2022. Abgerufen am 22. Mai 2022.
- 23-** "PTC Therapeutics erhält ein positives CHMP-Gutachten für Upstaza zur Behandlung von AADC-Mangel". PTC Therapeutics (Pressemitteilung). 20. Mai 2022. Abgerufen am 22. Mai 2022.
- 24-** Chowdary, Pratima; Shapiro, Susan; Makris, Mike; Evans, Gillian; Boyce, Sara; Talks, Kate; Dolan, Gerard; Reiss, Ulrike; Phillips, Mark; Riddell, Anne; Peralta, Maria R. (21. Juli 2022). "Phase 1-2-Studie der AAVS3-Gentherapie bei Patienten mit Hämophilie B". New England Journal of Medicine. **387** (3): 237–247. doi:10.1056/NEJMoa2119913. ISSN 0028-4793. PMID 35857660. S2CID 250697905.
- 25-** "Neuartige Gentherapie könnte Blutungsrisiko für Hämophilie-Patienten verringern". ScienceDaily. Abgerufen am 3. August 2022.

- 26- "Transformations-Therapie heilt Hämophilie B". BBC News. 21 July 2022. Abgerufen am 3. August 2022.
- 27- Mukherjee S. Mukherjee S. Das Gen: eine intime Geschichte. Nova York: Scribner; 2016. Gentherapien: Posthumane Gentherapie.415 Kap. 34.
- 28- 2. Friedmann T. Eine kurze Geschichte der Gentherapie. Nat Genet. 1992;2(2):93-98. Rezension.
- 29- 3. Misra S. Gentherapie beim Menschen: ein kurzer Überblick über die genetische Revolution. J Assoc Physicians India. 2013;61(2):127-133. Rezension.
- 30- 4. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene Editing von CCR5 in autologen CD4-T-Zellen von HIV-infizierten Personen. N Engl J Med. 2014;370(10):901-910.
- 31- 5. Linden R. Gentherapie: was sie ist, was sie nicht ist und was sie sein wird. Estud Av. 2010;24(70):31-69.
- 32- 6. Ginter EK. Gentherapie von Erbkrankheiten. Vopr Med Khim. 2000;46(3):265-278. Rezension. Russisch.
- 33- 7. Mathews QL, Curiel DT. Gentherapie: Veränderungen der menschlichen Keimbahn - Bewertung der wissenschaftlichen, sozioethischen und religiösen Fragen. South Med J. 2007;100(1):98-100.

34- 8. Bank A. Humane Genterapie mit somatischen Zellen. Bioessays. 1996;18(12):999–1007. Rezension.

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**More
Books!**



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.morebooks.shop

Kaufen Sie Ihre Bücher schnell und unkompliziert online – auf einer der am schnellsten wachsenden Buchhandelsplattformen weltweit! Dank Print-On-Demand umwelt- und ressourcenschonend produziert.

Bücher schneller online kaufen
www.morebooks.shop

KS OmniScriptum Publishing
Brivibas gatve 197
LV-1039 Riga, Latvia
Telefax: +371 686 20455

info@omniscryptum.com
www.omniscryptum.com

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY