

3. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

3.1 Zusammenfassung

Welche Eigenschaften kennzeichnen einen optimierten retroviralen Vektor für den Einsatz in der Gentherapie im hämatopoetischen System?

Er sollte (I) hohe, vom Transgen unabhängige Genexpression in hämatopoetischen Zellen vermitteln, sowohl im monocistronischen als auch im bicistronischen Kontext. Dies ist Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Stammzellselektion und somit Stammzellexpansion, denkt man an den Einsatz eines (II) Resistenzgens (MDR1) oder (III) Oberflächenmarkers (Δ LNCFR) für die Koexpression mit anderen Resistenzgenen (wie Alkyltransferase oder Aldehyddehydrogenase) oder therapeutischen Genen. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist zudem die (IV) Vektorsicherheit von großer Bedeutung: Diese kann auf mehreren Ebenen verbessert werden: zum einen auf der Ebene des Vektorrückgrates, indem die Entstehung replikationskompetenter Retroviren oder die Synthese von Peptiden/ Proteinen unbekannter Funktion (durch Expression weiterer Leserahmen 5' des Transgens) vermieden wird; zum anderen auf der Ebene der verwendeten cDNA, wo kryptische Spleißstellen, die auch in mit einer vollständigen Transkriptionseinheit transduzierten Zielzellen aktiv sind, zur Entstehung von *nonsense* Proteinen mit unbekannter Funktion und/ oder immunogenem Potential führen können. Als letzter Punkt (V) bleibt ein hoher genotypischer Index des Transgens zu erwähnen: Ziel ist es, daß alle transduzierten Zellen eine intaktes Transgen aufweisen, Grundvoraussetzung für die Expression des gewünschten Phänotyps.

Lösungsansätze zur Erfüllung dieser fünf Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt.

(I) FMEV-Vektoren vermitteln hohe, vom Transgen unabhängige Genexpression in hämatopoetischen Zellen

Für viele Anwendungen im Bereich des somatischen Gentransfers ist eine hohe Genexpression in den entsprechenden Zielzellen wünschenswert. Je nach Anwendung ist eine Expression in Stammzellen unerlässlich (z. B. zur dauerhaften Korrektur von Erbkrankheiten). Manchmal reicht jedoch auch eine Expression in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen (z. B. im Rahmen einer Chemoprotektion) oder sogar reifen Zellen (z. B. T-Zellen im Rahmen der HIV-Gentherapie) aus. In der in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich angesprochenen Chemoprotektion durch MDR1-Gentransfer sollte die Expression in den frühen Vorläuferzellen ein Überleben der Zellen gewährleisten. Ansonsten scheitert die Ausführung. Ebenso sollte beim Transfer zweier Gene - zum Beispiel eines *in vivo* Selektionsmarkergens und eines therapeutischen Gens - die Expression des Resistenzgens die Selektion ermöglichen, während die des therapeutischen Zweitgens einen kurativen Effekt bewirkt.

Bisher publizierte Daten sprachen für eine Verwendung von FMEV-Vektoren für den retroviralen MDR1-Gentransfer (Baum *et al.* 1995, 1996b, 1996c; Eckert *et al.* 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, daß sich diese Ergebnisse auch auf andere Systeme (*lacZ*, *neo^R*, GFP, Δ LNGFR) übertragen lassen. Demzufolge gewährleisten FMEV-Vektoren eine vom Transgen unabhängige, hohe Genexpression in frühen und späten hämatopoetischen Zellen.

2.1 Die hohe Expression der FMEV-Vektoren in hämatopoetischen Zellen ist unabhängig vom übertragenen Gen

In bicistronischen Vektoren bedarf es jedoch einer weiteren Expressionssteigerung für eine funktionelle Expression, um den koexpressionsbedingten Expressionsverlust zu kompensieren. Deshalb wurden weitere Modifikationen in die *Leader*-Region des FMEV-Vektors eingeführt, durch die die Transgenexpression auf posttranskriptioneller Ebene erhöht werden konnte. So wurde das Transgen in seine ursprüngliche Stelle im *gag*-Leserahmen kloniert und 5' mit einer Spleißakzeptor-Konsensussequenz versehen. Durch vermehrtes Spleißen mit dem retroviralen Spleißdonor konnte somit die Genexpression unabhängig vom Transgen erhöht werden, da (a) die komplexe *Leader*-Sekundärstruktur herausgespleißt wird, (b) Introns 5' der cDNA in vielen Fällen die Transgenexpression erhöhen (Matsumoto *et al.* 1998) und (c) aberrante Leserahmen in dem gespleißten Transkript fehlen.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

(II) FMEV-Vektoren ermöglichen die Selektion hämatopoetischer Zellen über Koexpression mit einem Resistenzgen (MDR1)

Transfer und Expression von Resistenzgenen wie MDR1 in hämatopoetischen Zellen ist ein effizientes Mittel, um genetisch modifizierte Zellen über Selektion anzureichern. Durch diese Strategie der dominanten Selektion hämatopoetischer Zellen sollte es möglich sein, das Ausmaß des genetischen Chimärismus im Patienten (d. h. den Anteil genetisch modifizierter Zellen, die zur aktuellen Hämatopoese beitragen) zu erhöhen: Transduzierte Zellen, die durch das Resistenzgen geschützt sind, erfahren gegenüber den untransduzierten Zellen einen Selektionsvorteil, indem sie die Selektion überleben und sich weiter teilen können. Diese Zellen nehmen somit im Laufe der Zeit einen größeren Anteil an der Gesamthämatopoese ein. Durch Koexpression von MDR1 mit anderen Resistenzgenen oder therapeutischen Genen wird das Anwendungsspektrum dieser Strategie immens erweitert. Jedoch war die Expression bisher vorgestellter retroviraler MDR1-Koexpressionsvektoren zu gering, um eine dominante Selektion auf Ebene früher, primärer humaner Vorläuferzellen zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung von FMEV-Vektoren zum ersten Mal eine erfolgreiche Selektion auf Ebene CD34-positiver humaner Progenitorzellen mit MDR1-Koexpressionsvektoren gezeigt werden.

2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen

(III) **FMEV-Vektoren ermöglichen die Anreicherung hämatopoetischer Zellen über Koexpression mit einem Zelloberflächenmarker (Δ LNGFR)**

Neben einer pharmakologischen Selektion hämatopoetischer Zellen ist auch die Selektion über einen Zelloberflächenmarker wie Δ LNGFR *in vitro* möglich (Ruggieri *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997). So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein FMEV-MDR1-Koexpressionsvektor vorgestellt, der neben MDR1 Δ LNGFR als klinisch relevantes Zweitgen koexprimiert. Dieser Vektor verleiht über MDR1 Zytostatikaresistenz und gestattet gleichzeitig mittels Δ LNGFR eine Zelloberflächenmarkierung und Selektion transduzierter Zellen, einschließlich humaner CD34 positiver Primärzellen. Dies ermöglicht die Anreicherung und Expansion Zytostatika-resistenter Zellen vor Reinfusion in Krebspatienten im Rahmen einer intensivierten Chemotherapie. Außerdem können MDR-positive humane Zellen über Δ LNGFR-Koexpression detektiert werden. Hierdurch wird das Überwachen der Selektion transduzierter Zellen *in vivo* und die Analyse ihrer biologischen Eigenschaften erleichtert. Die Bedeutung der Δ LNGFR-Koexpression beschränkt sich jedoch nicht nur auf MDR1. Auch andere chemoprotektive oder therapeutische Gene bieten sich an, vor allem wenn sie keiner direkten durchflußzytometrischen Analyse zugänglich sind

2.3 Bicstronische retrovirale Vektoren für kombinierte Myeloprotektion und Zelloberflächenmarkierung

Dennoch zeigten sowohl das MDR1/NPTII- als auch das MDR1/ Δ LNGFR-System zwei Probleme der Koexpression: Zum einen wurde der erniedrigte genotypische Index der MDR1-Transkriptionseinheit deutlich, d. h. nicht alle transduzierten Zellen zeigten einen funktionellen MDR1-Phänotyp; zum anderen blieb in beiden Systemen die Expression des bicstronischen Vektors unter der des monocstronischen Gegenstückes, weshalb - wie bereits erwähnt - weitere Modifikationen im *Leader*-Bereich der FMEV-Vektoren eingeführt wurden.

(IV) **erhöhte Vektorsicherheit**

Die Entstehung replikationskompetenter Retroviren stellt ein großes Gefahrenpotential bei der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren im Rahmen einer Gentherapie dar (s.1.4.5.2). Da die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit endogenen Retroviren umso höher ist, je mehr Sequenzhomologie mit dem retroviralen Vektor besteht, ist es sinnvoll, soviel virale Sequenz wie möglich aus retroviralen Vektoren zu entfernen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit neuartige retrovirale Vektoren vorgestellt, bei denen alle nicht unmittelbar notwendigen viralen Sequenzen deletiert wurden. So wurden *gag*-Sequenzen, die in den weit verbreiteten *gag*⁺ Vektoren vorhanden sind, entfernt bzw. durch ein minimales Spleißakzeptoroligonukleotid ersetzt. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich außerdem, daß im Gegensatz zu den zusätzlichen *gag*-Sequenzen der retrovirale Spleißdonor für einen hohen Vektortiter verantwortlich ist. Ferner konnte - wie bereits erwähnt - durch Einführen des Spleißakzeptoroligonukleotids die Genexpression unabhängig vom verwendeten Transgen signifikant erhöht werden. Neben der Deletion nicht unmittelbar notwendiger viraler Sequenzen wurden auch alle ATG-Leserahmen 5' des Transgens mutiert, um die Expression un-

gewollter Peptide, die immunogen oder andersweitig für die Zelle nachteilig sein könnten, zu unterbinden.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

Neben der Erhöhung der Sicherheit des Vektorrückgrates wurde auch die verwendete MDR1-cDNA sicherheitsoptimiert. So existieren in der MDR1-cDNA kryptische Spleißstellen, die auch in mit einer vollständigen Transkriptionseinheit transduzierten Zielzellen aktiv sind und zur Entstehung von *nonsense* Proteinen mit unbekannter Funktion oder immunogenem Potential führen können. Tatsächlich ist ungefähr die Hälfte aller entstehenden Transkripte intern gespleißt. Durch Mutation des kryptischen Spleißdonors konnte das interne, kryptische Spleißen nahezu vollständig unterbunden werden.

2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes, der Expression und Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

(V) Der genotypische Index von MDR1 wurde erhöht

Im Rahmen einer Gentherapie ist es wünschenswert, daß alle transduzierten Zellen auch den gewünschten Phänotyp zeigen. Ist dies nicht der Fall, so kann es zum einen auf mangelnder Genexpression beruhen, zum anderen auf einer Instabilität der Transkriptionseinheit, so daß nicht alle transduzierten Zellen eine intakte Provirusintegration aufweisen. Letzteres käme in einem niedrigen genotypischen Index zum Ausdruck. Um diesen beiden Punkten (mangelnder Genexpression bzw. niedrigem genotypischem Index) zu begegnen, wurde einerseits die Transgenexpression auf posttranskriptioneller Ebene verbessert.

2.4 Die Modifizierung der *Leader*-Region in retroviralen Vektoren führt zu erhöhter Transgen-unabhängiger Genexpression und verringert die Wahrscheinlichkeit für virale Rekombination

Andererseits wurden die Ursachen für den niedrigen genotypischen Index retroviraler MDR1-Vektoren, bestehend aus Fehlern im Rahmen der reversen Transkription in den Zielzellen und kryptischen Spleißereignissen in den Verpackungszellen aufgezeigt.

2.2 FMEV-abgeleitete MDR1-Koexpressionsvektoren ermöglichen dominante Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen

Durch Mutation des kryptischen MDR1-Spleißakzeptors wurde der genotypische Index auf ca. 0,8 erhöht und gleichzeitig die funktionelle MDR1-Expression gesteigert.

2.5 Erhöhung des genotypischen Indexes und der Sicherheit retroviraler MDR1-Vektoren durch Mutation kryptischer Spleißstellen

Somit können die in der vorliegenden Arbeit präsentierten, bezüglich Sicherheit und Expression optimierten Vektoren einen neuen Standard im Bereich der somatischen Gentherapie setzen.

3.2 Summary

Which features characterize an optimized retroviral vector for gene therapy in the hematopoietic system?

It should mediate (I) high transgene expression in hematopoietic cells, both in a monocistronic and in a bicistronic context. This is a prerequisite for successful stem cell selection and therefore stem cell expansion using either (II) resistance genes (as MDR1) or (III) cell surface markers (as Δ LNGFR) co-expressed with other resistance genes (as alkyltransferase or aldehyde dehydrogenase) or therapeutic genes. For clinical applications (IV) vector safety also is a major point: Vector safety can be increased at the level of the vector backbone by avoiding the generation of replication competent retrovirus or the synthesis of peptides of unknown function (via expression of open reading frames 5' of the transgene), as well as at the level of the cDNA used, where cryptic splice sites, which are also active in target cells transduced with an intact transcription unit, can lead to the synthesis of nonsense proteins with unknown function and immunogenic potential. Last but not least, one should consider (V) the genotypic index: It is the primary aim, that all transduced cells possess the correct genotype, a prerequisite if all transduced cells are to show the desired phenotype (if there is sufficient gene expression). Events resulting in the wrong genotype are cryptic splicing in the packaging cells or mistakes (especially recombination) during reverse transcription in the target cells. Eliminating the causes for these events would also further improve vector safety.

Solutions for the five criteria mentioned above have been presented in this work.

(I) [FMEV vectors mediate high, transgene independent expression in early and late hematopoietic cells](#)

For many gene therapy applications, high gene expression in the appropriate target cells is desirable. Depending on the applications, transduction and expression is required in stem cells (e. g. for the long-term correction of inherited diseases), in early hematopoietic precursor cells (e. g. for chemoprotection purposes), or only in mature cells (e. g. T cells for HIV gene therapy). Chemoprotection via MDR1 gene transfer against side effects of chemotherapy is primarily discussed in this work; the expression level in early progenitor cells should guarantee the survival of these cells. In addition, for the transfer of two genes (e. g. an *in vivo* selectable marker gene together with a therapeutic gene), the expression level of the resistance gene should allow selection, whereas the therapeutic second gene should mediate curative effects.

Previous data supported the use of FMEV vectors for efficient retroviral MDR1 gene transfer (Baum *et al.* 1995, 1996b, 1996c; Eckert *et al.* 1996). The work presented here demonstrated that these results could be transferred to other systems (*lacZ*, *neo^R*, GFP, Δ LNGFR), too. In all cases tested, FMEV vectors have guaranteed high, transgene independent gene expression in early and late hematopoietic cells.

[2.1 The high expression of FMEV vectors in hematopoietic cells is independent of the gene transferred](#)

In the bicistronic context, further increase in transgene expression is required for functional expression levels to compensate the decrease in expression caused by coexpression. Therefore, additional modifications were introduced into the leader region of the FMEV vector resulting in increased transgene expression: The transgene was cloned in the normal *gag* reading frame, and a splice acceptor consensus sequence was introduced 5' of its start codon. By increased splicing with the retroviral splice donor, expression could be elevated because (a) the complex secondary structure of the leader is removed by splicing, (b) introns 5' of the cDNA increase transgene expression in general (Matsumoto *et al.* 1998) and (c) aberrant reading frames are absent in the spliced message

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: High and transgene independent expression with minimal potential for viral recombination

(II) FMEV vectors allow selection of hematopoietic cells by coexpression with a resistance gene (MDR1)

Transfer and expression of resistance genes, such as MDR1, in hematopoietic cells actually represents an efficient means to enrich selectively for genetically modified cells. Using this strategy of dominant selection of hematopoietic cells, it should be feasible to alter the amount of genetic chimerism (i. e. the percentage of genetically modified cells participating in actual hematopoiesis). Transduced cells, which are protected by the resistance gene, are - compared to untransduced cells - at a selective advantage because they can survive the selection process and continue to divide. Coexpression of MDR1 with other resistance or therapeutic genes increases the spectrum of possible applications of this strategy. However, the coexpression of two genes to date has been too weak to allow dominant selection at the level of early, primary human progenitor and stem cells. The work presented here demonstrated for the first time that FMEV coexpression vectors may allow the successful selection of CD34 positive human progenitor cells with MDR1.

2.2 FMEV-based MDR1 coexpression vectors allow dominant selection of hematopoietic precursor cells

(III) FMEV vectors allow enrichment of hematopoietic cells by coexpression with a cell surface marker (Δ LNGFR)

Apart from pharmacological selection of hematopoietic cells, selection via a cell surface marker such as Δ LNGFR *in vitro* is also possible (Ruggieri *et al.* 1997; Fehse *et al.* 1997). Therefore - as part of this work - an FMEV-MDR1 coexpression vector was developed that coexpressed MDR1 together with a clinically relevant second gene encoding Δ LNGFR. This vector mediates drug resistance (via MDR1) and, at the same time, cell surface marking and selection of transduced cells (via Δ LNGFR), including human CD34 positive primary cells. This makes enrichment and expansion of drug resistant cells feasible before reinfusion in cancer patients as part of an intensified chemotherapy. In addition, multidrug resistant cells can be detected by Δ LNGFR coexpression. This may facilitate both the follow-up of selection of transduced cells *in vivo* and the analysis of their biological features. The importance of Δ LNGFR coexpression

is not limited to MDR1. Other chemoprotective or therapeutic genes can also be combined with Δ LNGFR and improve the effectiveness of monitoring gene transfer, especially if their gene products cannot be directly monitored by cytometric analysis

2.3 Bicistronic retroviral vectors for combined myeloprotection and cell surface marking

Nevertheless, both systems (MDR1/NPTII and MDR1/ Δ LNGFR) revealed two limitations of coexpression: on the one hand, the genotypic index of the MDR1 transcription unit is reduced, i. e. not all transduced cells showed a functional MDR1 phenotype; on the other hand, the expression level of the bicistronic vectors was lower than that of the monocistronic counterparts. Therefore - as mentioned before - additional modifications were introduced into the leader region of the FMEV vector and into the MDR1 cDNA.

(IV) increased vector safety

The generation of replication competent retrovirus comprises a great risk in the clinical applications of retroviral vectors in gene therapy trials are concerned. As the probability of recombination increases with the extent of homology between endogenous retroviruses and the retroviral vector, it is useful to eliminate as much viral sequence from the retroviral vector as possible to increase its safety. For that reason novel retroviral vectors were presented in this work, in which all non essential viral sequences were deleted. Especially, the *gag* sequences, present in the commonly used *gag*⁺ vectors and said to be important for high virus titer and gene expression, were replaced by a minimal splice acceptor consensus oligonucleotide. In the course of this work, it became evident that the retroviral splice donor was essential for high vector titer, while the additional *gag* sequences were not. Moreover, introduction of the splice acceptor consensus yielded a significant increase in gene expression. In addition, apart from the deletion of non-essential viral sequences, all ATG reading frames 5' of the transgene were mutated to suppress the expression of unwanted peptides that could be immunogenic or disadvantageous for the cell in another way.

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: high and transgene independent expression with minimal risk for viral recombination

Besides increasing vector backbone safety, the MDR1 cDNA used was also safety optimized. Within the MDR1 cDNA there are cryptic splice sites that are also active in cells transduced with a complete transcription unit and could give rise to *nonsense* proteins with unknown function or immunogenic potential. About half of the transcripts is internally spliced. By mutation of the cryptic splice donor, internal, cryptic splicing could be nearly completely abolished

2.5 Increasing genotypic index, expression and safety of retroviral MDR1 vectors by mutation of cryptic splice sites

(V) high genotypic index of the transgene

For gene therapy applications it is desirable that all transduced cells show the desired phenotype. This requires sufficient gene expression and stability of the transcription

unit. To counteract these two points (insufficient gene expression and low genotypic index), transgene expression was optimized on the posttranscriptional level.

2.4 Modification of the leader region in retroviral vectors: high and transgene independent expression with minimal risk for viral recombination

In addition, the causes for the low genotypic index of retroviral MDR1 vectors were elucidated, which consist of mistakes during reverse transcription in the target cells and cryptic splicing events in the packaging cells.

2.2 FMEV-based MDR1 coexpression vectors allow dominant selection of hematopoietic precursor cells

By mutating the cryptic splice signals within the MDR1 cDNA, the genotypic index could be increased to nearly 0.8 without loss of gene expression.

2.5 Increasing genotypic index, expression and safety of retroviral MDR1 vectors by mutation of cryptic splice sites

Taken together, the safety- and expression-optimized vectors presented in this work should impose a new standard for vectors used in somatic gene therapy.