

Bericht über den Workshop der Paul-Martini-Stiftung (PMS) am 18. September in Berlin

„Therapeutische Oligonukleotide – Stand und Perspektiven“

Seite 1/6

Prof. Dr. Peter Scriba, wissenschaftlicher Berater der PMS, begrüßt die 65 Teilnehmer und stellt die Stiftung kurz vor. Er verweist auf den PMS-Workshop „Therapeutic oligonucleotides in drug development“ am 13./14. Juni 2003 in Berlin und führt kurz in das Thema ein.

Kontakt:

Dr. Siegfried Throm
Telefon 030 20604-301
info@paul-martini-
stiftung.de

Prof. Dr. Gunther Hartmann, Universitätsklinikum Bonn, stellt in seinem Vortrag „Therapeutische Oligonukleotide: Ein Überblick“ die verschiedenen Arten vor: Immunaktive Oligonukleotide mit den CpG- und den Triphosphat-Oligonukleotiden; die Antisense Oligonukleotide mit den Antisense-, den LNA-Antisense-, den Exon skipping- und den siRNA-Oligonukleotiden; die RNA-Enzym-Oligonukleotide mit den Ribozymen und die Aptamere mit den Spiegelmeren. Diese werden fast alle in mindestens einem Vortrag bei diesem Workshop adressiert. Die großen Technologiefortschritte seit dem letzten PMS-Workshop lassen erwarten, dass es in den nächsten Jahren eine Welle von Zulassungen für solche Moleküle geben könnte. Anschließend geht er näher auf die immunaktiven Oligonukleotide ein; diese werden sowohl zur Bekämpfung von Viren als auch von Tumoren entwickelt. Hierfür stellt er die bisher bekannten molekularen Vorgänge in der Zelle zur Erkennung von Bakterien und Viren vor. Derzeit ist ein CpG-Oligonukleotid als Wirkverstärker in einem Hepatitis-B-Impfstoff im EU-Zulassungsverfahren. Synthetische RIG-I-Ligand-Oligonukleotide zeigten in präklinischen Versuchen antivirale Wirksamkeit. Die Wirksamkeit gegen Tumoren beruht auf direkten und indirekten Effekten und wird u.a. auch am neu eingerichteten Exzellenzcluster „ImmunoSensation: das Immunsystem als Sinnesorgan“ in Bonn erforscht.

Prof. Dr. Simon Rothenfusser, Ludwig-Maximilian-Universität München, erläutert die „Erkennung immunstimulatorischer Oligonukleotide durch das angeborene Immunsystem“. Zunächst stellt er die Mustererkennungszellen für Nukleinsäuren vor, deren Anzahl beschränkt ist. Es gibt die membranständigen Toll-like-Rezeptoren (TLR) 3 (erken-

Hausvogteiplatz 13
10117 Berlin
www.paul-martini-
stiftung.de

nen doppelsträngige RNA), 7/8 (erkennen Einzelstrang-RNA) und 9 (erkennen DNA) sowie die zytoplasmatischen Rezeptoren RIG-I, MDA-5, AIM2, DAI und Pol III. Daraus zeigt er die Konsequenzen für therapeutische Oligonukleotide auf und erläutert die Bifunktionalität von small interfering (si)RNA. Für diese konnte im Mausmodell der Wirksamkeitsnachweis gegen Melanome erbracht werden, wobei die Wirkung von Interferon und natürlichen Killerzellen abhängt. Ihr Ziel ist die Erkennung konservierter Strukturen zur Unterscheidung, ob diese fremd oder körpereigen sind. Neben der Strukturdiskriminierung erfolgt aber auch eine solche nach Ort und Menge. Abschließend erläutert er die Epidemiologie (170 Mio chronisch Infizierte) und den Verlauf (15-20 % Spontanheilungen) von Hepatitis C, einem kleinen umhüllten RNA Flavivirus. Nur ein kleiner Teil der chronisch Infizierten (10-20 %) entwickelt nach langer Zeit eine Zirrhose bzw. ein Leberzellkarzinom (5 %). Hier könnten Polymorphismen in RIG-I-like-Helikasen als Prädiktoren dienen.

Seite 2/6

Prof. Dr. Jens Kurreck, Technische Universität Berlin, berichtet über das „Design von siRNA für antivirale Anwendungen“. Am Beispiel einer siRNA zur Behandlung der Myokarditis durch das Coxsackievirus B3 aus der Familie der Picorna-Viren geht er auf die Kriterien für eine effiziente siRNA ein, die zunächst die Thermostabilität, die Struktur des Antisense-Strangs und die lokale Struktur der Ziel-RNA umfassen und schließlich zu einem si Locked Nucleic Acid (LNA)-Oligonukleotid führen.

Weitere Optimierungen bringen zwar keine weiteren Verbesserungen im Virus-Assay, aber Vorteile bei der Reduzierung von off-target-Effekten.

Anschließend präsentiert er Untersuchungen zur Kombination von Oligonukleotiden mit antiviralen Proteinen; so ergibt die Anwendung von extrazellulär aktiven Virusködern, den löslichen Virusrezeptor-Varianten (sCAR), mit intrazellulär aktiven siRNA eine synergistische Wirkung im entsprechenden Assay.

Abschließend geht Kurreck auf die Probleme bei der Erreichung des Zielorts (Herzzellen) und die Lösungsmöglichkeiten ein: Haarnadel (small hairpin) (sh)RNA und Adeno-assoziierte Viren als Vektoren.

Dr. Jörg Kaufmann, Silence Therapeutics, Berlin, stellt bei seinem Vortrag „Einfluss der siRNA-Lipoplex-Eigenschaften auf RNA-Interferenz in vivo“ zunächst die Firma Silence Therapeutics vor. Großer Vorteil von RNAi sei, dass damit auch die Vielzahl der bisher nicht mit herkömmlichen Substanzen erreichbaren („undruggable“) krankheitsrelevanten Gene beeinflusst werden können. Die Entwicklung von siRNA zu Arzneimitteln bietet folgende Vorteile: Target-Spezifität und kürzere Entwicklungszeiten; dem stehen folgende Herausforderungen gegenüber: systemische Verabreichung erforderlich; Delivery-Systeme erforderlich; kein akuter Effekt (erst nach 12 – 24 h); möglicherweise off-target-Immuntoxizität. Anschließend erläutert er das aus positiv geladenen Liposomen bestehende Delivery-System Lipoplex und stellt

die Ergebnisse der bisher durchgeführten In-vitro- und In-vivo-Prüfungen vor. Je nach Zielorgan wurden unterschiedliche Formulierungen entwickelt: DACC für die Lunge (potenzielle Indikationen: Lungentzündungen und akutes Lungenversagen); DBTC für die Leber (potenzielle Indikationen: Fibrose und Leberzellkarzinom) sowie AtuPlex für das vaskuläre Endothel (potenzielle Indikation: solide Tumoren). Für letztes wurde mit Atu027 Mitte 2012 eine Phase I abgeschlossen, bei der die Sicherheit gezeigt werden konnte. Abschließend stellt Kaufmann kurz die eigene Pipeline vor und weist auf Programme hin, die mit großen Pharmafirmen verpartnert sind.

Dr. Hans-Peter Vornlocher, Axolabs, Kulmbach, berichtet über die „Präklinische Entwicklung von siRNA Therapeutika“. Zunächst zeigt er eine Übersicht über den Entwicklungsstand von siRNA; danach liegen für einige wenige bereits positive klinische Daten vor, wobei das jeweilige Arzneimittel aus der siRNA und dem dazu passenden Delivery-System besteht. Anschließend geht er auf Screening und Assay-Systeme ein, die für die Selektion und Charakterisierung von Lead-Molekülen wichtig sind. Neben der Spezifität und der Aktivität an der Target-mRNA muss auch die Stabilität im biologischen Umfeld (z.B. gegenüber Nukleasen) untersucht werden. Weitere Fragen wie Spezies-Kreuzreaktivität und off-target-Aktivität werden ebenfalls adressiert. Weiterhin spielt das Delivery-System eine bedeutende Rolle für den therapeutischen Einsatz von siRNAs. Hier gibt es verschiedenste Ansätze, deren Grundbausteine zusätzlich mit Modulen kombiniert werden können, die spezifische Zelltypen adressieren oder die Pharmakokinetik bzw. Bioverteilung der entsprechenden Partikel verbessern. Delivery-Systeme sollten gut herstellbar sein und eine geringe Toxizität aufweisen. Der Zelltyp-Tropismus neuer Formulierungen kann durch Knockdown von Zelltyp-spezifischer Target-mRNA überprüft werden. Vornlocher präsentiert Ergebnisse für die Leber (4 Zelltypen) und die Lunge (8 Zelltypen), wobei die siRNA mittels eines Hybridisierungs-basierten HPLC-Assays im Plasma detektiert wurde.

Seite 3/6

Dr. Giles Campion, Prosensa, Leiden, Niederlande, berichtet in seinem englischen Vortrag über „Treatment of Duchenne muscular dystrophy: Exon skipping with antisense-oligonucleotides“. Zunächst beschreibt er den klinischen Verlauf der Duchenne Muskeldystrophie, einer seltenen, X-Chromosom-gebundenen, fatalen Erkrankung, von der in Deutschland 2.400 Jungen und junge Männer betroffen sind. Sie tritt in 30 % der Fälle spontan auf und beruht auf Mutationen im Dystrophin-Gen, die zur fehlerhaften Herstellung dieses Proteins und damit zu Muskellähmungen führen. Die Beckersche Muskeldystrophie wird von ähnlichen Mutationen verursacht, hat aber einen wesentlich milderen Verlauf. Anschließend stellt er die Pipeline von ProSensa vor, aus der mehrere Projekte mit einer großen Pharmafirma verpartnert sind. Ziel ist es, durch gezielte RNA-Modulation durch Exon-skipping schwere Formen von Muskeldystrophie in leichtere Varianten zu verwandeln. Hierfür konnte bereits 2007 der local proof of concept er-

bracht werden, bei dem die Dosierungs-abhängige Steigerung der Dystrophin-Expression nachgewiesen wurde. In einer 2011 beendeten Phase I/IIa-Studie über 96 Wochen konnten die Sicherheit und Verträglichkeit sowie die Wirksamkeit für PRO051, das das Exon 51 adressiert, im 6 Minuten Gehstest gezeigt werden. Derzeit werden diese ersten Ergebnisse in einem Studienprogramm mit 300 Patienten, darunter einer pivotalen Studie mit 180 Patienten, überprüft. Weitere Exon-skipping-Medikamente sind in Phase I/II-Prüfungen sowie in der Präklinik.

Dr. Carmen Poehl, Genzyme, Neu-Isenburg, gab zu „Mipomersen - ein klinisches Update“. Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um ein Antisense-Oligonukleotid, das nach der Aufklärung der chemischen Struktur von Apolipoprotein B 2002 entwickelt und 2011/2012 zur Zulassung in der EU bzw. den USA eingereicht wurde. Mipomersen blockiert die Bildung von Apoprotein B 100, das für die Herstellung atherogener Lipoproteine wie LDL und Lipoprotein a benötigt wird. Mipomersen wird für Patienten mit einer schweren Verlaufsform der familiären Hypercholesterinämie (kurz FH) entwickelt. Der FH liegt eine genetische Disposition zugrunde, bei der mehrfach erhöhte LDL-Cholesterinwerte vorliegen. Dem entsprechend rasch schreitet bei diesen Menschen eine Atherosklerose voran und führt - unbehandelt - zu frühen kardiovaskulären Ereignissen, wie z.B. Herzinfarkten. Bei schweren Verlaufsformen liegt entweder eine Therapie-refraktäre Form vor (z.B. eine Statin-Unverträglichkeit) oder die LDL-Cholesterin Ausgangswerte sind so hoch, dass auch mit einer Lipidsenker Kombinationstherapie die anzustrebenden Zielwerte bei weitem nicht erreicht werden können.

Es wurden 4 Phase III Studien als Grundlage für den Zulassungsantrag für Mipomersen t mit Patienten mit folgenden Krankheiten durchgeführt: homozygote FH; heterozygote FH mit KHK; schwere Hypercholesterolämie bei heterozygoter FH und Hypercholesterolämie bei hohem Risiko für Koronare Herzkrankheit (KHK). Dabei konnte eine signifikante Senkung der LDL- und Lipoprotein a-Werte erreicht werden. Poehl stellt weiterhin die Nebenwirkungen und Halbwertszeit (1-2 Monate) von Mipomersen vor und gibt einen Überblick über weitere Medikamente gegen FH, die derzeit von Sanofi und einigen anderen Firmen entwickelt werden.

Dr. Troels Koch, Santaris, Hørsholm, Dänemark, erläutert in seinem englischen Vortrag „Locked Nucleic Acid: Targeting microRNA for the treatment of hepatitis C virus infection“ zunächst die Struktur und Konzeption von locked nucleic acids (LNAs), Oligonukleotiden, potente Inhibitoren von kodierenden und nicht-kodierenden RNA, die sich insbesondere durch eine hohe Affinität und eine hohe Stabilität wegen ihrer Nuklease-Resistenz auszeichnen. Da sie – wie in entsprechenden Assays nachgewiesen wurde – in die Zelle ohne Delivery-Systeme aufgenommen werden, sind sie weniger aufwändig und weniger toxisch. Koch stellt anschließend die Entwicklung von Miraversen vor, einer Le-

ber-spezifischen microRNA, die gegen miR 122 von Hepatitis-C-Viren (HCV) gerichtet ist; hierbei handelt es sich um eine bei allen HCV-Genotypen hoch konservierte RNA, was eine hohe Hürde für Resistenzbildung erwarten lässt. Die Resistenzen sind ein großes Problem bei der HCV-Therapie, wie die Therapieversager bei der herkömmlichen Standardtherapie mit Peginterferon und Ribavirin gezeigt haben. Seit 2011 stehen mit Boceprevir und Telaprevir neue, sehr potente HCV-Mittel zur Verfügung, aber auch bei diesen gibt es Resistenzen. Koch stellt die Ergebnisse der Studien mit Miraversen zur Pharmakokinetik und Sicherheit sowie die klinischen Ergebnisse aus den bisher durchgeführten Phase I- und IIa-Studien vor, bei denen sich in einigen Fällen bei alleiniger Anwendung von Miraversen nach 4 Wochen kein HCV mehr nachweisen ließ, und das bei guter Verträglichkeit.

Seite 5/6

Dr. Hubert Heinrichs, Antisense Pharma, Regensburg, präsentiert die „Klinische Entwicklung des TGF- β 2 Antisense-Oligonukleotids Trabedersen in der Onkologie“. Nach der Vorstellung der Historie der 1998 gegründeten Firma Antisense geht er auf das Target TGF- β 2 ein, das bei Gesunden und in Frühstadien einer Krebserkrankung als Tumorsuppressor, im Spätstadium einer Krebserkrankung aber als Tumorpromoter wirkt. Patienten mit einer Überexpression haben eine schlechte Prognose. Gegen TGF- β 2 wurde eine 18mer single-stranded DNA entwickelt, die sehr gut von der Zelle aufgenommen wird und daher keines Delivery Systems bedarf. Nach erfolgreicher präklinischer Entwicklung liegen inzwischen auch Ergebnisse einer Phase IIb-Studie bei Gliomen vor; die anschließende Phase III-Studie musste allerdings wegen Rekrutierungsproblemen vorzeitig beendet werden, da die WHO zwischenzeitlich die Diagnosekriterien für die angestrebten Patienten geändert hat. Um die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen, wurde Trabedersen mittels Pumpe und Katheter direkt in den Tumor appliziert. Bei den klinischen Prüfungen bei Gliomen wurde ein akzeptables Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil ermittelt; der primäre Endpunkt wurde zwar nicht erreicht, aber ein Trend zu längerem Überleben und besserem Ansprechen festgestellt, wobei die niedrigere Dosierung bessere Ergebnisse als die höhere zeigte. Abschließend weist Heinrichs auf die gute Verträglichkeit und positive Signale für die Wirksamkeit von i.v. appliziertem Trabedersen bei malignem Melanom und Pankreaskarzinom hin und stellt das weitere präklinische und klinische Programm mit Trabedersen vor.

Dr. Sven Klussmann, Noxxon Pharma, Berlin, referiert zum Thema „Spiegelmer: Besonderheiten und klinische Entwicklung“. Nach der Vorstellung der Historie der 1997 gegründeten Fa. Noxxon erläutert er zunächst die Spiegelmer-Technologie. Diese beruht auf der Herstellung von spiegelbildlicher L-RNA, die sich als chemisch und biologisch stabil und nicht immunogen erwiesen hat und sicher und gut verträglich ist. Spiegelmere sind zudem leicht herzustellen. Anschließend geht er auf Entwicklungsprogramme ein, bei denen Spiegelmere gegen diabetische Nephropathie, multiple Myelome und chronische lymphatische Leukä-

mie sowie Anämie bei chronischen Krankheiten entwickelt werden. Als Target bei diabetischer Nephropathie dient MCP1 (Monocyte chemoattractant protein-1), das ein Inflammations-Hilfesignal vermittelt. Dessen Inhibierung durch das Spiegelmer NOX-E36 verhindert das Anlocken von Makrophagen und könnte auch bei anderen Krankheiten wie Insulinresistenz, COPD oder arteriellem Lungenhochdruck wirksam sein. Klussmann stellt die bisherigen Studienergebnisse vor; erste Phase IIa-Ergebnisse sollen 2013 vorliegen.

Hartmann fasst in seinem Schlusswort die einzelnen Vorträge kurz zusammen, dankt den Referenten für ihre Beiträge, den übrigen Teilnehmern für die regen Diskussionsbeiträge und der PMS-Geschäftsstelle für die gute Organisation. Abschließend zeigt er sich zuversichtlich, dass in den nächsten Jahren eine ganze Welle von Oligonukleotiden die Zulassungsreife erlangen und ihren Weg in die Anwendung finden wird.