

Immuntherapie

Messenger RNA-basierte Impfstoffe zur Behandlung von Krebserkrankungen

JOCHEN PROBST
CUREVAC GMBH, TÜBINGEN

Krebserkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Für die meisten soliden Tumoren existieren derzeit keine wirksamen Medikamente. Neben operativer Entfernung werden in der Regel Therapieformen wie Chemotherapie und/oder Strahlentherapie eingesetzt, wodurch sich in Teilung befindendes Gewebe und damit auch Tumorzellen zerstört werden.

■ Trotz stetiger Verbesserung dieser Therapeutika ergeben sich zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen durch das Abtöten von gesunden Zellen und intaktem Gewebe. Zudem erweisen sich die momentanen Therapien nicht für alle Krebserkrankungen als wirksam. Es besteht somit ein großer Bedarf an neuen wirksamen und spezifischen Arzneimitteln zur Bekämpfung von Krebserkrankungen. Große Hoffnungen werden bei der Krebstherapie auf „sanfte“, gut verträgliche Therapieformen wie die Immuntherapie gesetzt. Dieses Konzept gründet auf der Beobachtung von spontanen körpereigenen Immunantworten gegen Krebszellen^[1]. So lassen sich beispielsweise in zahlreichen Patienten tumorspezifische T-Lymphozyten nachweisen. Offensichtlich ist das Immunsystem bei diesen Patienten also prin-

zipiell in der Lage, Tumorzellen als „fremd“ und damit potenziell schädlich zu erkennen. Durch verschiedene Mechanismen bedingt – oft entsteht eine Immuntoleranz gegenüber den veränderten Zellen – genügt dieser Abwehrmechanismus häufig nicht, um eine Rückbildung oder Stabilisierung der Erkrankung zu bewirken. Hier setzt die Immuntherapie an, durch die eine Verstärkung der körpereigenen Immunantwort erreicht werden soll. In zahlreichen Tumor-Tiermodellen und frühen klinischen Untersuchungen sind inzwischen bei verschiedenen Formen der Immuntherapie Wirksamkeitshinweise gezeigt worden.

Eigenschaften genetischer Impfstoffe

Impfstoffe in der Immuntherapie von Krebserkrankungen beruhen darauf, dass tumor-

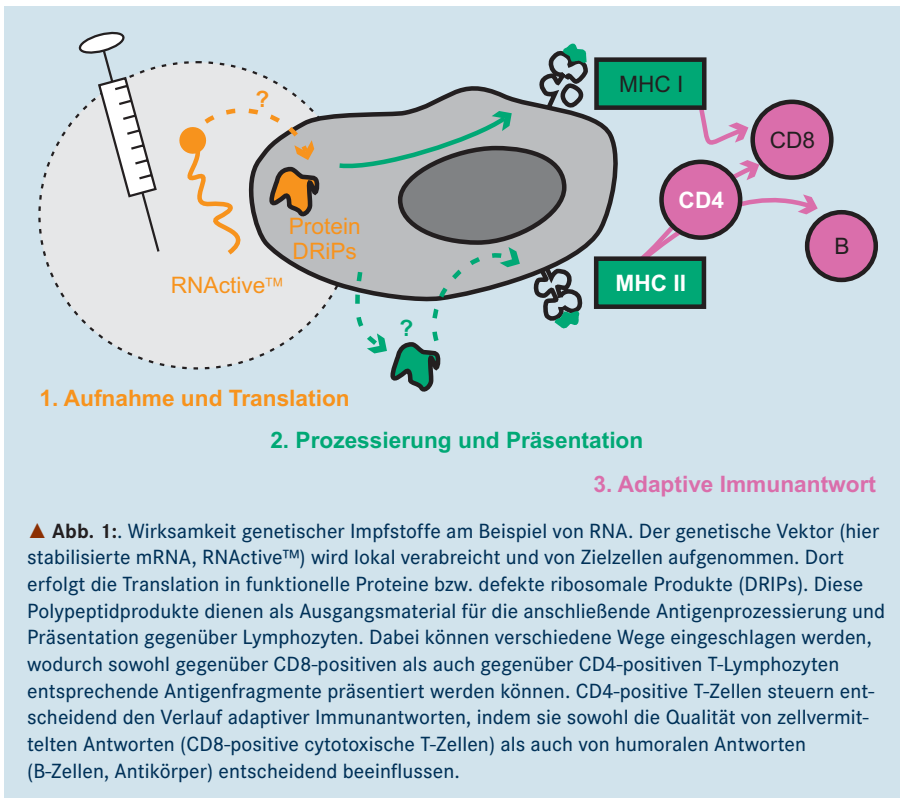
spezifische Antigene dem Immunsystem eines Patienten dargeboten werden, um die Krebszellen für das Immunsystem besser erkennbar zu machen. Ein solcher Krebsimpfstoff sollte dabei idealerweise folgende Anforderungen erfüllen:

Der Wirkstoff sollte in einem einfachen und wenig zeitaufwändigen Produktionsprozess zu vertretbaren Kosten hergestellt werden können. Der Impfstoff sollte möglichst einfach zu lagern und zu transportieren sein, bevorzugt bei Raumtemperatur. Daneben sollte der Wirkstoff eine sichere und nebenwirkungsarme Anwendung gewährleisten. Er sollte tumorspezifische und lang anhaltende immunologische Reaktionen einschließlich Zytotoxizität und Antikörperbildung gegen die Tumorzellen hervorrufen. Ferner sollte der Wirkstoff einerseits tumorspezifisch wirken, andererseits aber trotz hoher Spezifität auf möglichst alle Patienten einer bestimmten Erkrankung anwendbar sein. Ein idealer Impfstoff sollte dementsprechend neben einer generalisierten Wirkung, auch individuelle patientenspezifische Eigenschaften jedes Tumors erfassen.

So genannte genetische Impfstoffe erfüllen die Mehrzahl dieser Anforderungen (**Tab. 1**). Genetische Impfstoffe vermitteln die Information über tumorspezifische Antigene mittels genetischer Vektoren. Der Vektor in Form von rekombinanten Viren, rekombinanter DNA oder rekombinanter messenger RNA (mRNA) codiert dabei also für ein tumorspezifisches Antigen. Auf Basis der genetischen Information wird in transfizierten Zellen das antigene Protein gebildet, welches dann eine entsprechende adaptive Immunantwort über Aktivierung tumorspezifischer Lymphozyten auslösen kann. Ein wesentlicher Vorteil genetischer Impfstoffe, insbesondere von rekombinanter DNA und RNA, besteht darin, dass unterschiedliche Tumorantigene adressiert werden können. Diese Technologie bietet daher eine einzigartige Möglichkeit, in kurzer Zeit wirksame Medikamente für alle möglichen Krebsarten herzustellen.

Anforderung	rekombinante Viren	isolierte DNA	isolierte mRNA	stabilisierte mRNA (z.B. RNAActive™)
Sicherheit/Nebenwirkungen	-	?	+	+
Produktionsprozess	+/-	+/-	+	+
Transport und Lagerung	+/-	+	+	+
Wirksamkeit	+	+	-	+
Individualisierbarkeit	+	+	+	+

Tab. 1: Gegenüberstellung verschiedener Vektoren genetischer Impfstoffe bezüglich wichtiger Anforderungen an einen Krebsimpfstoff. Eine Anforderung kann dabei ungenügend (-), durchwachsen (+/-), umfassend (+) oder unklar (?) erfüllt sein.



Dualer Informationsgehalt von Nukleinsäuren

Die Verwendung von Nukleinsäuren zu Zwecken der Vakzinierung setzt voraus, dass die entsprechenden Moleküle *in vivo* von Zielzellen aufgenommen werden und anschließend in Proteine translatiert werden (**Abb. 1**). Erstmals wurde dieser Vorgang der Aufnahme und Translation im Jahr 1990 für solche Vektoren beschrieben, die für verschiedene Reporterproteine codierten^[2]. Darauf folgend konnte zunächst für DNA-Moleküle und später auch für stabilisierte mRNA-Moleküle gezeigt werden, dass sich deren Verabreichung zur Induktion von Immunantworten

in verschiedenen Tiermodellen eignet^[3]. Dabei werden sowohl von DNA-basierten als auch von stabilisierter mRNA-basierten Impfstoffen spezifische Antikörper- und T-Zellantworten induziert. Werden in Tiermodellen tumorspezifische Antigene für die Immunisierung verwendet, korrelieren die induzierten adaptiven Immunantworten mit der spezifischen Abstoßung entsprechender Tumorzellen bzw. einem deutlich verzögerten Krankheitsverlauf.

Jeder Impfstoff benötigt neben der Information über die Zielstruktur (Antigen) auch ein Signal zur Aktivierung des Immunsystems (Adjuvans). Um die Wirksamkeit

Rezeptor	Zelluläres Kompartiment	Einzelsträngige RNA	Doppelsträngige RNA	DNA#
TLR 3	Endosom	?	+	
TLR 7	Endosom	+		
TLR 8	Endosom	+		
TLR 9	Endosom			+
RIG-I	Cytosol	+	?	
MDA5	Cytosol		+	

Tab. 2: Zelluläre Lokalisation und Spezifität von nukleinsäurespezifischen Rezeptoren. Erkannte Moleküle sind mit (+) gekennzeichnet, bei (?) wird eine Erkennung diskutiert. TLR: Toll like receptor; RIG-I: retinoic acid-induced protein I; MDA5: melanoma differentiation-associated gene-5; # erkannt werden nicht methylierte Sequenzmotive einzelsträngiger DNA.

nukleinsäurebasierter Impfstoffe vollständig zu erklären, muss neben der Translation in entsprechende Antigene, auch deren immunmodulierende Aktivität beachtet werden. Sowohl DNA als auch RNA kann bei Säugtieren als so genanntes Gefahrensignal über entsprechende immunmodulierende Rezeptoren interpretiert werden (**Tab. 2**). Damit können auf DNA und stabilisierter mRNA basierte Impfstoffe als ihr eigenes Adjuvans dienen, indem sie im Bereich der Aufnahme und Translation ein bevorzugtes Milieu zur Auslösung von adaptiven Immunantworten schaffen.

Direkte Verwendung stabilisierter mRNA

Die Verwendung von mRNA als Impfstoff wurde im Vergleich zur DNA zunächst nur zögernd entwickelt. Dies lag vor allem daran, dass RNA-Moleküle in nicht stabilisierter Form sehr schnell durch Enzyme abgebaut werden. Trotzdem eignen sich mRNA-Moleküle aus mehreren Gründen als genetische Impfstoffe. Unter anderem zeichnen sie sich gegenüber DNA durch ein deutlich besseres Sicherheitsprofil und geringere Nebenwirkungen aus. Wenngleich zahlreiche präklinische und klinische Untersuchungen bislang keine Beweise für eine Gefährdung durch DNA-Moleküle geliefert haben, so gibt es zumindest theoretisch erhebliche Risiken. Zum einen besteht die Möglichkeit einer andauernden Integration von DNA ins Genom einer Zielzelle. Die möglichen Folgen einer solchen Integration sind schwer abschätzbar. Neben einer unkontrollierten Expression des Antigens, könnte dabei im ungünstigsten Fall die Entartung einer Zelle und damit eine Krebserkrankung ausgelöst werden. Als weiteres Risiko ist zu beachten, dass gegen DNA-Moleküle spezifische Antikörperantworten generiert werden können. Solche Antikörperantworten senken nicht nur die Wirksamkeit entsprechender Impfstoffe, sondern können auch bestimmte Autoimmunerkrankheiten (wie z. B. systemischen Lupus erythematoses) hervorrufen. Beide genannten Risiken treffen auf mRNA-Moleküle nicht zu. Aufgrund der definierten Halbwertszeit von mRNA-Molekülen *in vivo* ist darüber hinaus die Dosierung wesentlich leichter zu steuern als bei DNA.

Für die Wirksamkeit einer mRNA-basierten Immunisierung spielen zahlreiche Faktoren eine Rolle. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei die Beschaffenheit des Moleküls ein. So kann durch entsprechende Modifika-

tionen die extra- und intrazelluläre Stabilität sowie die Fähigkeit zur Bildung entsprechender Proteine *in vivo* deutlich gesteigert werden. Ein Ansatz, mRNA hinsichtlich dieser Fähigkeiten zu optimieren, besteht beispielsweise in der Auswahl bestimmter flankierender nicht translatierter Sequenzen, welche den eigentlichen proteincodierenden Bereich der mRNA umgeben. Durch derartige Modifikationen gegenüber der natürlich vorkommenden mRNA können verbesserte Moleküle generiert werden (z. B. RNActive™, CureVac GmbH), welche ohne zusätzliche Hilfsmoleküle (wie z. B. Liposomen) direkt zur Immunisierung verwendet werden können^[4]. Derartig stabilisierte mRNA-Moleküle können in industriellem Maßstab in einer pharmazeutischen Qualität gemäß den internationalen GMP-Richtlinien (*Good Manufacturing Practise*) hergestellt werden. Ausgehend von einem Produktionsplasmid wird hierzu mittels rekombinanter RNA-Polymerasen die mRNA transkribiert und anschließend in einem mehrstufigen Aufreinigungsprozess von der DNA-Matrize, von fehlerhaften, zu kurzen und zu langen Transkripten sowie Nukleotiden getrennt. Die Entwicklung von auf stabilisierter RNA-basierten Impfstoffen zur klinischen Anwendung bei Krebserkrankungen befindet sich derzeit in den frühen Phasen der klinischen Prüfung. Der Beweis für das tatsächliche Potenzial dieser neuartigen Wirkstoffe für die Bekämpfung derzeit nicht therapierbarer Krebserkrankungen beim Menschen muss also erst noch erbracht werden. ■

Literatur

- [1] Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991): A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643–1647.
- [2] Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P. L. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1465–1468.
- [3] Pascolo, S. (2004): Messenger RNA-based vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4: 1285–1294.
- [4] Hoerr, I., Obst, R., Rammensee H. G., Jung, G. (2000): *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J. Immunol.* 30: 1–7.



Korrespondenzadresse:

Dr. Jochen Probst
Chief Scientific Officer
CureVac GmbH
Paul-Ehrlich-Str. 15
D-72076 Tübingen
Tel.: 07071-92053-0
Fax: 07071-92053-11
jp@curevac.de
www.curevac.de