

# Krebsbehandlung mit Antisense-Molekülen

## Wissenschaftliche Aspekte und klinische Perspektiven

**Krebs ist eine genetische Erkrankung mit Veränderungen, die auf die Proteomebene durchschlagen und typische Eigenschaften von Krebs wie Apoptosedefizienz, Proliferation, Angiogenese und Metastasierung bedingen. Das menschliche Genom besteht aus ca. 35.000 Genen und deren verschiedenen RNA-“splice“-Varianten. Diese Fülle an Information lässt sich mit Hilfe von effizienten Genom- und Proteomtechnologien entschlüsseln und klinisch nutzen, indem therapeutisch relevante Zielstrukturen mit hoher Krebspezifität identifiziert und gezielt inaktiviert werden. Antisense-Oligonukleotide (ASO) und kurze Interferenz-RNA (siRNA) sind für die sequenzspezifische Unterdrückung der Genexpression Moleküle der Wahl.**

### Strategische Betrachtungen und historische Aspekte

ASO binden an komplementäre Sequenzen der Ziel- (prä-)mRNA durch Watson-Crick-Basenpaarung, wodurch die Genexpression auf verschiedenen Ebenen gehemmt wird. Vor 30 Jahren wurde bereits gezeigt, dass synthetische Einzelstrangnukleinsäuren die RNA-Translation hemmen. Das Zeitalter therapeutischer ASO begann, als Zemecnik und Stephenson 1978 erstmals mit Hilfe von Oligonukleotiden die Replikation von Rous-Sarkomviren in Fibroblasten unterdrücken konnten [24]. Als eine weitere Möglichkeit zur

Hemmung der posttranskriptionalen Genexpression wurde vor wenigen Jahren die Strategie der RNA-Interferenz vorgestellt und 2002 sogleich als wissenschaftlicher Durchbruch des Jahres gefeiert [4]. Obwohl es sich vom Ergebnis her nicht von der Wirkung von ASO unterscheidet, beruht dieses Prinzip auf der Anwendung von Doppelstrang-RNA-Molekülen, die eine komplizierte Bindungs- und Degradierungsmaschinerie aktivieren, mit der die Ziel-mRNA abgebaut wird (■ **Abb. 1**). Das Phänomen der RNA-Interferenz wurde erstmals Anfang der 90er Jahre beschrieben, als nach genetischen Manipulationen von Petunien unerwartete Phänomene der Unterdrückung der Genexpression beobachtet wurden [15]. Spätere Untersuchungen an *Drosophila* und *C. elegans* haben die biologische Bedeutung der durch RNA-Interferenz vermittelten Genregulation eindrucksvoll bestätigt und dadurch den Weg für therapeutische Anwendungen geebnet [11].


Mit der Einführung automatischer DNA-Syntheseprozesse, permanenter Fortschritte in der Nukleinsäuretechnologie und der genomweiten Verfügbarkeit spezifischer siRNA-Moleküle konnten auch die therapeutischen Ansprüche neu formuliert werden. Das viel versprechende Konzept der beiden Antisense-Technologien darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die bisher vorliegenden klinischen Daten noch nicht zur Anerkennung als Heilmittel geführt haben. Dies hat mehrere Ursachen. Zum einen gelangen nach systemischer Anwen-

dung nur ungenügend große Mengen aktiver Substanz in das Tumorgewebe, während der Großteil metabolisiert und ausgeschieden wird. Dies betrifft sowohl ASO als auch siRNA. Eine Verbesserung der Situation ist durch chemische Veränderungen zur Erhöhung der Molekülstabilität oder durch Anwendung liposomaler Trägersysteme und anderer Nanotechnologien in Sicht, die gegenwärtig intensiv untersucht werden. Jüngste Erkenntnisse mit kleinmolekularen Kinasehemmern und Antikörpern, die häufig eine breitere Wirksamkeit als nur gegen die ursprünglich anvisierte Zielstruktur zeigen bzw. ganze Signaltransduktionswege beeinflussen, werfen die Frage auf, ob auch Antisense-Moleküle nicht nur die Expression nur eines Gens unterdrücken sollten und ob manche unerwartete Nebeneffekte bei einer komplexen multifaktoriellen Erkrankung wie Krebs nicht sogar erwünscht sind. Zelluläre Signalübertragungsprozesse sind nicht linear und beinhalten komplexe Interaktionen oftmals redundanter Signalwege. Das Bcl-2-spezifische ASO Oblimersen scheint diesem Vorsatz Recht zu geben, indem seine therapeutische Wirkung weniger auf der Hemmung des antiapoptotischen Gens als vielmehr auf der Aktivierung einer CpG-vermittelten Immunaktivierung beruht [19]. Präklinische Untersuchungen mit einem Bcl-2/Bcl-xL-bispezifischen ASO konnten die therapeutische Überlegenheit der gleichzeitigen Unterdrückung zweier, teilweise redundant wirkender Apoptosehemmer belegen [5].

Die Frage, ob ASO oder siRNA benutzt werden soll, stellt sich im Laboralltag häufig. Generell lässt sich sagen, dass in verschiedenen Modellsystemen wie HeLa-Zellen siRNA in kleinsten Mengen wirksam ist (1–10 nM) und bei diesen geringen Konzentrationen auch kaum Nebenwirkungen wie „Off-target“-Effekte zu erwarten sind. Andererseits benötigen viele Tumorzellen, u. a. primäre Tumorzellkulturen, wesentlich größere Mengen an siRNA, um biologische Effekte zu erzielen. Im Bereich von mehr als 50 nM zeigen sich dabei die gleichen unspezifischen Effekte wie mit ASO [6]. Darüber hinaus konnten bispezifische Effekte – wie für ASO bereits gezeigt – mit siRNA bisher nicht reproduziert werden, obwohl auch siRNA Moleküle eine deutliche Toleranz für Basenmismatches besitzen. Im Gegensatz zu ASO wurde die krebstherapeutische Wirkung von siRNA bisher auch noch nicht klinisch bestätigt. Obwohl In-vivo-Untersuchungen die Aktivität intravenös injizierter Apolipoprotein-B- (ApoB-)spezifischer siRNA in metabolischen Zielorganen wie Leber, Dünndarm und Fettgewebe beschreiben [22], ist dies wohl in erster Linie auf die präferenzielle Lokalisierung der Nukleinsäure-Lipid-Konjugate in diesen Organen zurückzuführen. Diese im Mausmodell gemachte Beobachtung konnte mit den gleichen siRNA-Molekülen und ähnlichen liposo-

malen Vektoren inzwischen auch in Primaten bestätigt werden [27].

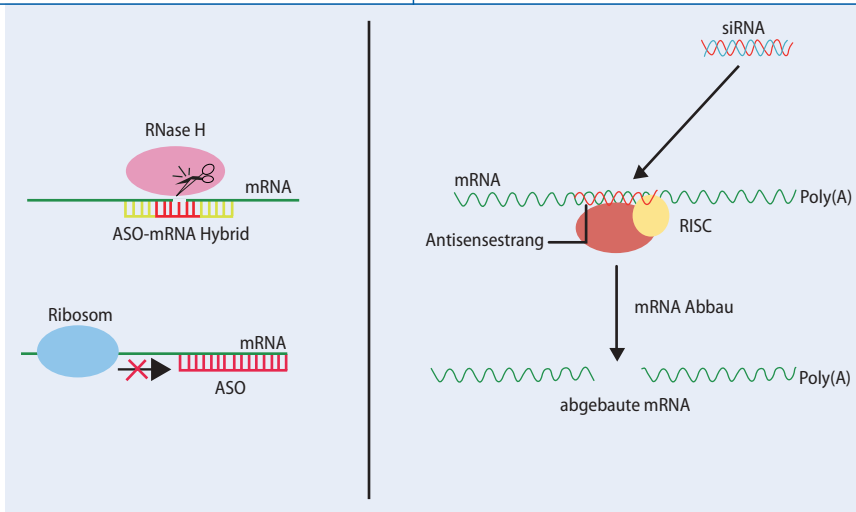
### Formate von Antisense-Molekülen

ASO sind synthetische, aus DNA-Bausteinen aufgebaute Einzelstrangoligonukleotide, von denen jeder zur Watson-Crick-Bindung an komplementäre Basen der Ziel-mRNA befähigt ist. Das Ergebnis ist entweder Hemmung der Proteintranslation im Zytoplasma oder Abbau der mRNA durch Aktivierung der Ribonuklease H (RNase H), einer Endonuklease im Zellkern ([17];  **Abb. 1**). Zur Verbesserung der klinischen Eigenschaften können Aktivität und Stabilität von ASO durch chemische Veränderungen der Ribose, Base oder des Phosphatrückgrats vorgenommen werden. Die wichtigsten Verbesserungen beruhen auf Verwendung von sog. Phosphothioate-ASO, in denen ein Schwefelatom das natürliche Sauerstoffatom im Phosphatrückgrat ersetzt. Diese ASO der 1. Generation zeichnen sich durch hohe Stabilität, Bindungsaffinität sowie verbleibender Fähigkeit zur Aktivierung von RNase H aus [23]. Weitere Verbesserungen der funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften lassen sich durch Veränderungen der Riboseeinheit wie 2'-O-Alkylierung erzielen. Zu diesen ASO der 2. Generation gehören die inzwischen auch unter klinischen Bedin-

gungen untersuchten O-Methyl- (OMe-) und O-(2'-Methoxy)ethyl- (MOE-)Analoge. Durch die teilweise Blockierung der Ribose als Folge der Substitution nimmt das ASO eine RNA-ähnliche Struktur ein und zeigt damit höhere Bindungsaffinität zur komplementären mRNA-Sequenz [13]. Vollständig blockiert in der C3'-endo-Konformation durch eine 2'-O,4'-C-Methylen-Bindung ist die Ribose in sog. „Locked-Nucleic-Acid“- (LNA-)ASO [18]. Da RNA-RNA-Homodimere die RNase H nicht mehr zu aktivieren vermögen, werden diese Riboseveränderungen nur an wenigen Nucleotiden an den 3'- und 5'-Enden vorgenommen, während die Zentralregion unverändert als DNA bleibt (Gapmer- oder Wingmer-ASO). Günstige Hybridisierungseigenschaften und hohe Stabilität zeichnen auch Peptidnucleinsäuren aus, in denen das Phosphatrückgrat durch Polyamidbindungen ersetzt wird [16]. Diese ungeladenen ASO dringen allerdings sehr schlecht in Zellen ein und können keine RNase H aktivieren. Aufgrund ihrer extrem hohen Bindungsaffinität blockieren sie dagegen den Translationsprozess am Ribosom.

Die Erkenntnis, dass Organismen die Genexpression mit Hilfe hoch konservierter antisenseähnlicher RNA-Interferenz-Mechanismen negativ regulieren, hat das Feld der molekularen Targetvalidierung und Therapie bedeutend bereichert.

Hier steht eine Anzeige.



**Abb. 1** ▲ Wirkungsweise herkömmlicher ASO und siRNA-Moleküle. Beide Antisense-Moleküle binden komplementär an die mRNA und hemmen die Proteinsynthese vor allem auf der Transkriptionsebene. ASO sind Einzelstrangnukleinsäuren, die den Abbau der mRNA durch die Endonuklease RNase H im Zellkern aktivieren (*linke Bildhälfte oben*). Wenige hochaffine ASO blockieren auch die mRNA Translation am Ribosom (*linke Bildhälfte unten*). Das Prinzip der RNA-Interferenz ist in der rechten Bildhälfte dargestellt. Es basiert auf der Anwendung von kurzen Doppelstrang RNA Molekülen (siRNA), die im Zytoplasma wirksam sind. Der Prozess beginnt mit der Bildung des RNA-induced silencing complex (RISC), einem komplizierten Ribonukleoproteinkomplex, der aus verschiedenen RNA-prozessierenden Enzymen besteht. Nachfolgend kommt es zur Auftrennung der doppelsträngigen siRNA und Bindung des Antisense-Strangs an die komplementäre mRNA-Sequenz. Der Abbau der mRNA erfolgt ebenfalls durch eine Endonuklease

Natürliche RNA-Interferenz wird durch lange Sequenzen von Doppelstrang-RNA-Molekülen eingeleitet, die enzymatisch zu kurzen 19–21 Nukleotid langen Einheiten abgebaut werden [2]. Die kurzen siRNA-Moleküle bestehen aus einem „Sense“- und einem „Antisense“-Strang, die an einen Multiproteinkomplex binden und den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) bilden. Im RISC wird die Antisense-RNA vom Sense-Strang befreit und führt den Komplex an die komplementäre mRNA, die schließlich durch Endonukleasen abgebaut wird ([10]; ■ **Abb. 1**). In der Laborpraxis werden zweckmäßigerweise direkt die kurzen siRNA anstelle der langen Doppelstrang-Vorläufermoleküle eingesetzt. Die genregulatorische Wirkung und das therapeutische Potenzial der siRNA-Technologie konnte inzwischen auch in verschiedenen Tiermodellen bestätigt werden [22, 25, 27]. Ähnlich wie herkömmliche ASO lassen sich siRNA-Moleküle in Mengen herstellen, die für klinische Anwendungen realistisch sind, und ihre Stabilität und Effizienz übertrifft oft die von ASO der 1. Generation. Beim Vergleich mit den oben erwähnten funktionell verbesserten ASO heben sich diese Vorteile allerdings wieder weitgehend auf.

### Zielgerichtete Behandlung mit Antisense-Molekülen

Ein allgemeines Problem der molekularen Krebstherapie ist die ungenügende Anreicherung von Therapeutika im Tumorgewebe. Darüber hinaus ergeben sich Schwierigkeiten mit der intrazellulären Aufnahme der anionischen Nukleinsäuren, was in vitro, nicht aber unter In-vivo-Bedingungen, durch die Anwendung kationischer komplexierender Lipide gelöst wird. Die intrazelluläre Aufnahme geladener Nukleinsäuren erfolgt überwiegend durch Endozytose, wobei die Freisetzung aus den endo-/lysosomalen Vesikeln ins Zytoplasma eine hohe funktionslimitierende Barriere darstellt. Mit dem Ziel, Antisense-Moleküle auch in vivo wirksam im Tumor anzureichern, wurden verschiedene Transfersysteme entwickelt. Virale Vektoren vereinen den Vorteil effizienter Transporteigenschaften mit dem Nachteil variabler unvorhersehbarer Gewebespezifität, hoher Immunogenität und anhaltender Sicherheitsbedenken [14]. Aus diesen Gründen wurden v. a. nichtvirale Transfersysteme bevorzugt [21, 26]. Insbesondere nanopartikuläre Polymerkomplexe und Liposomen wurden untersucht.

Dabei weisen sterisch stabilisierte Liposomen, die aus unilamelären neutralen Vesikeln bestehen, welche mit einer Hülle aus Polyethylenglykol umzogen sind, die günstigsten pharmakologischen Eigenschaften in vivo auf [1].

Obwohl derartig stabilisierte Liposomen dank verlängerter Plasmahalbwertszeit eine höhere Tumorkonzentration aufweisen, ist die Anreicherung nur passiv. Aktive Anreicherung im Tumor wird mit Hilfe von Liganden möglich, die chemisch an die Liposomenoberfläche gekoppelt werden und spezifisch an Rezeptorstrukturen auf der Tumorzelle binden. Beispiele hierfür sind Wachstumsfaktoren und Antikörper, die das liposomale Antisense-Transportsystem selektiv ins Tumorgewebe befördern und die zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe durch rezeptorvermittelte Endozytose ermöglichen. Antisense-Moleküle können nach chemischer Veränderung auch direkt an Trägersubstanzen angehängt werden, was am Beispiel von siRNA gegen Apolipoprotein B anhand eines Cholesterol-Konjugats gezeigt wurde [22]. Nach Applikation in Mäusen ließen sich in cholesteroltypischen Zielgeweben wie Leber, Dünndarm und Fettgewebe signifikante biologische Effekte nachweisen. Trotz viel versprechender Ansätze bleiben zahlreiche Probleme ungelöst. So beträgt die Dosis, die im Mausmodell therapeutisch wirksam ist, auf den Menschen übertragen mehrere Gramm siRNA-Konjugat. Darüber hinaus sind nur wenige Rezeptoren auf Tumorzellen bekannt, die zum einen hohe Internalisierungsraten aufweisen und zum anderen ausreichend selektiv sind.

Der Erfolg von Antisense-Therapeutika hängt von der Identifizierung von Genen und deren Proteinen ab, die maßgeblich an malignen Prozessen wie Apoptosehemmung, Proliferation und Angiogenese beteiligt sind. Fortgeschrittene Tumoren unterhalten oft redundante Signaltransduktionswege mit dem Ergebnis, dass die Hemmung einer Signalkaskade biologisch unwirksam ist. Das ideale Onkogen ist im komplexen Signalnetzwerk an Knotenpunkten positioniert, an denen verschiedene Informationsströme zusammenlaufen. Die viel versprechendsten ASO und ihre biologischen Zielstrukturen sind in

■ **Tab. 1** zusammengefasst. Es ist zu erwarten, dass die Liste therapeutischer Antisense-Moleküle schon bald durch die bis heute noch fehlenden siRNA erweitert wird.

### Erfahrungen aus klinischen Antisense-Studien

Die ersten erfolgreichen In-vivo-Versuche mit ASO und siRNA haben, wie bei anderen potenziellen Krebsmedikamenten auch, zu euphorischen Reaktionen und übereifrigen Vorbereitungen für klinische Untersuchungen geführt. In Anbetracht der vielen Hindernisse auf dem Weg vom Tierexperiment zum erfolgreichen Krebsmedikament wurden die Erwartungen deutlich gedämpft. So ist es auch nicht verwunderlich, dass das erste ASO, welches als Heilmittel anerkannt ist, lokal bei einer nichtonkologischen Erkrankung wie CMV-induzierter Retinitis angewandt wird. Ähnlich verhält es sich mit siRNA-Molekülen die bisher auch nur lokal bei nichtonkologischen Erkrankungen getestet wurden [7]. Leider ist die lokale Anwendung bei den meisten fortgeschrittenen Krebserkrankungen wenig hilfreich.

Bei Betrachtung der klinischen Entwicklung der beiden ältesten ASO, dem Bcl-2-spezifischen ASO Genasense (G3139) und dem gegen PKCa gerichteten ASO Affinitak (■ **Tab. 1**), werden die wichtigsten Probleme und Hindernisse bei der therapeutischen Anwendung dieser Moleküle sichtbar. Obwohl die biologische Aktivität dieser beiden Phosphothioat-ASO in zahlreichen präklinischen Untersuchungen bestätigt wurde, ließen sich die Erkenntnisse aus der Laborsituation nur unzureichend in die klinische Praxis extrapolieren. Beide ASO verpassten in Phase-III-Studien ihre primären klinischen Endpunkte. Affinitak konnte weder in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel noch mit Gemcitabine und Cisplatin das mediane Überleben von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom verlängern [9]. Ähnlich negativ verliefen die Studien mit Genasense welches in Kombination mit Dacarbazin das Überleben von Melanompatienten nicht signifikant verlängerte. Allerdings führte es in Kombination mit Chemotherapie zu höheren Ansprechraten (11,7% vs.

Onkologie 2007 · 13:256–262 DOI 10.1007/s00761-006-1170-z  
© Springer Medizin Verlag 2007

U. Zangemeister-Wittke

### Krebsbehandlung mit Antisense-Molekülen. Wissenschaftliche Aspekte und klinische Perspektiven

#### Zusammenfassung

Herkömmliche Krebsmedikamente sind unspezifisch wirksam und schädigen auch gesundes Gewebe. Fortschritte im Verständnis der molekularen Besonderheiten von Krebszellen konnten neue Signaltransduktionswege und deren Regulatoren aufzeigen, die spezifisch am malignen Prozess beteiligt und damit für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente von Interesse sind. Antisense-Moleküle, einschließlich herkömmlicher Einzelstrang-Antisense-Oligonukleotide (ASO) und kurzer Interferenz-RNA (siRNA), hemmen die Genexpression v. a. auf der Transkriptionsebene. Sie richten sich spezifisch gegen die genetische Ursache von Krebs und lassen sich

besonders gut gegen Onkogene einsetzen, deren Proteine für kleinmolekulare Substanzen wie Proteinkinasehemmer oder für therapeutische Antikörper nicht zugänglich sind. Trotz bisher mäßiger Erfolge in klinischen Studien besteht nach wie vor große Hoffnung, dass ASO und siRNA dank der Identifizierung neuer krebsrelevanter Zielstrukturen und Fortschritte in der Nukleinsäureentwicklung die Krebsbehandlung entscheidend verbessern werden.

#### Schlüsselwörter

Krebstherapie · Onkogen · Gentergating · Antisense · RNA-Interferenz

### Antisense molecules for targeted cancer therapy. Scientific aspects and clinical perspectives

#### Abstract

The efficacy of traditional anti-cancer agents is hampered by toxicity to normal tissues. Recent advances in molecular oncology research have led to the identification of signaling pathways and their regulators implicated in tumor development and progression. Consequently, novel biological agents were designed which specifically target key regulators of the malignant process and are superior to unspecific cytotoxic agents. Antisense molecules comprising conventional single-stranded oligonucleotides (ASO) and small interfering RNA (siRNA) inhibit gene expression mainly on the transcript level. Thus, they specifically target the genetic basis of cancer

and are particularly useful for inhibiting the expression of oncogenes the protein products of which are inaccessible to small molecules or inhibitory antibodies. Although antisense oncology trials could not fulfill all expectations so far, recent progress in gene expression profiling and nucleic acid development have raised new hopes that this fascinating gene targeting concept will eventually translate into enhanced clinical efficacy.

#### Keywords

Cancer therapy · Oncogenes · Gene targeting · Antisense · RNA interference

**Tab. 1 Zielstrukturen wichtiger Antisense-Oligonukleotide (ASO) in präklinischen und klinischen Onkologiestudien**

Biologische Wirkung	Zielstruktur	Chemie	Firma	Entwicklungsstadium	Tumor
Apoptosehemmer	<b>Bcl-2-Familie</b>				
	Bcl-2	PS-ASO LNA-ASO	Genta Santaris	I-III I	Melanom, CLL, Myelom, Prostatakarzinom, CLL
	Bcl-xL	MOE-ASO	Isis	Präklinisch	Xenotransplantate (verschiedene)
	Mcl-1	MOE-ASO	Isis	Präklinisch	Xenotransplantate (verschiedene)
	<b>IAPs</b>				
	Survivin	MOE-ASO	Lilly/Isis	I	Verschiedene solide Tumoren
	XIAP	OMe-ASO	Aegera	I	Verschiedene solide Tumoren
	<b>Indirekt</b>				
	MDM 2 via p53	OMe-ASO	Hybridon	Präklinisch	Xenotransplantate (verschiedene)
Regulatoren der Signaltransduktion	Raf	PS-ASO	Isis	II	Verschiedene solide Tumoren
	Ras	PS-ASO	Isis	II	Verschiedene solide Tumoren
	IGFBP2/5	MOE-ASO	Oncogenex	Präklinisch	Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Gliom
	PKCa	MOE-ASO	Lilly/Isis	III	Lungenkarzinom
	PKA	OMe-ASO	Hybridon	Präklinisch	Xenotransplantate (verschiedene)
	STAT3	MOE-ASO	Isis	Präklinisch	Xenotransplantate (verschiedene)
	c-Myb	PS-ASO	Genta	I	CML
Chaperone	Clusterin	MOE-ASO	Oncogenex	II	Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Lungenkarzinom
	HSP27	MOE-ASO	Oncogenex	I	Prostatakarzinom
DNA-Enzyme	Methyltransferase	PS-ASO	Methylgene	II	Kopf- und Halskarzinom, Nierenzellkarzinom
	Ribonukleotide Reduktase	PS-ASO	Lorus	II	Prostatakarzinom

6,8%) sowie zur Verlängerung der progressionsfreien Zeit (78 Tage vs. 49 Tage) im Vergleich zu Patienten, die nur mit Chemotherapie behandelt wurden. Nach Analyse der 24-Monate-Follow-up-Daten ergaben sich Hinweise darauf, dass v. a. Patienten mit niedrigen Laktatdehydrogenase-Werten von einer Genasensebehandlung profitieren könnten [8]. Der Hintergrund dieses Zusammenhangs ist nicht bekannt.

Abgesehen von der Diskussion über die Wahl der Antisense-Zielstrukturen und deren biologischer Bedeutung stellt sich auch die Frage, ob Dosis und Applikationsmodus in den beiden Antisense-Studien optimal gewählt wurden. Sowohl für Affinitak als auch für Genasense wurde die empfohlene Phase-II-Dosis aus der maximal tolerierten Dosis (MTD) berechnet.

**► Affinitak und Genasense haben vergleichbare Nebenwirkungen**

Trotz unterschiedlicher Spezifitäten zeigten beide ASO vergleichbare Nebenwirkungen. Daraus lässt sich schließen,

dass diese im Zusammenhang mit der Substanzeigenschaft stehen und unabhängig vom biologischen Antisense-Effekt auftraten. Da funktionsunabhängige Toxizität nicht als Ersatzmarker für Antitumoraktivität dienen kann, wäre es im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika wohl sinnvoller, wenn die Dosisfindung in ASO-Studien die direkten Effekte auf die Expression der Zielstruktur innerhalb einer verträglichen Dosismarge berücksichtigen würde. Allerdings sind aus den frühen Phase-I-Untersuchungen mit Affinitak und Genasense zu wenig pharmakodynamische Daten bekannt, als das eine verlässliche Dosisempfehlung auf der Basis biologischer Antisense-Effekte möglich ist. Darüber hinaus spielt auch die Applikationsart eine Rolle, die den physikochemischen Eigenschaften der Nukleinsäuren angepasst sein sollte. Als ASO der 1. Generation mit beschränkter Plasmahalbwertszeit wird die kontinuierliche Zufuhr empfohlen, womit Plasmakonzentrationen von 100–500 nM erzielt werden, die unter In-vitro-Bedingungen biologisch wirksam sind.

Noch komplizierter sind die Verhältnisse bei der Optimierung von Kombinationstherapien. Vom biologischen Wirkprinzip her sind sowohl Affinitak als auch Genasense in der Lage, die Wirkung herkömmlicher Chemotherapeutika zu verstärken. Das Fehlen diesbezüglicher Dosis-Wirkungs-Daten lässt jedoch keine rational begründete Kombinationsstrategie zu. Ausgehend von biologischen Antisense-Effekten nach 4 Tagen wurde im Fall der Affinitak-Studie die Chemotherapie während der 14-tägigen ASO-Infusion verabreicht [9], während in der Genasense-Studie Dacarbazin nach einer 5-tägigen ASO-Infusion verabreicht wurde [12]. Insgesamt ist also wenig rationales Vorgehen erkennbar, sodass viele Fragen betreffend Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von ASO unbeantwortet bleiben. In erster Linie muss geklärt werden, was genau die ASO-Wirkung und die Wirkungskinetik definiert, wie lange der biologische Antisense-Effekt anhält und ob dieser akut, verzögert oder kumulativ ist. ASO und siRNA modulieren auch die Expression unspezifischer Ge-

Hier steht eine Anzeige.





ne durch sog. „Off-target“-Effekte. Diese beruhen v. a. auf den chemischen Eigenschaften der Nukleinsäuren und der Anwesenheit bestimmten CpG-Sequenzen [19], wodurch es zu interferonähnlichen unspezifischen Wirkungen auf die Genexpression und zur Aktivierung natürlicher Immunzellen kommt [20]. Wie am Beispiel von Genasense gezeigt wurde, können die für diese Medikamentengruppe typischen Nebenwirkungen den Therapieverlauf unter Umständen günstig beeinflussen.

Die klinischen Erfahrungen mit Afinitak und Genasense haben das rationale Vorgehen beim Entwurf neuerer Antisense-Studien mitbestimmt. So wurde das gegen Clusterin gerichtete MOE-ASO OGX-11 (■ Tab. 1) zunächst ausführlich auf biologische Effekte im Tumorgewebe untersucht [3] und daraufhin ein Dosis-Wirkungs-Profil erstellt, welches eine biologisch optimale Dosisfindung ohne die übliche Dosisescalation ermöglichte. Ein Vorteil der verbesserten Stabilität dieser ASO-Generation ist die Möglichkeit der Bolusinjektion einmal wöchentlich anstelle von Dauerinfusion. Unter vergleichbaren Bedingungen werden gegenwärtig zwei gegen Bcl-2 bzw. das Inhibitor-of-Apoptosis-Protein (IAP) Survivin gerichtete LNA-ASO in Phase-I-Studien getestet (■ Tab. 1).

Antisense- und andere zielgerichtete Therapieformen verlangen auch die Einführung neuer klinischer Endpunkte, da sie im Gegensatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika eher zytostatisch als zytotoxisch wirksam sind und zudem nur an Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungen angewendet werden. Dies hat zur Suche nach geeigneten definierten Markern in leicht messbaren Ersatzgeweben wie im Blut geführt, in denen biologische Effekte nachweisbar sind. Aufgrund der komplexen biologischen Zusammenhänge von Signaltransduktionswegen und deren Regulatoren als Zielstrukturen therapeutischer ASO wird empfohlen, gleichzeitig verschiedene Biomarker als Endpunkte zu wählen, um das gesamte Wirkungsspektrum dieser Therapieform zu erfassen.

## Fazit für die Praxis

**Dank technischer und biomedizinisch wissenschaftlicher Fortschritte ist das Gebiet der Antisense-Therapie trotz zahlreicher Rückschläge zu einer vielversprechenden Behandlungsform gereift, die sich gut mit herkömmlichen zytotoxischen Krebsmedikamenten kombinieren lässt und diese verstärkt. Weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der Genom-, Proteom- und Metabonomforschung werden neue Signaltransduktionswege und Regulatoren aufzeigen, die maßgeblich am malignen Verlauf beteiligt sind und als hoch spezifische Zielstrukturen für funktionell verbesserter Antisense-Moleküle Verwendung finden.**

## Korrespondierender Autor

**Prof. Dr. U. Zangemeister-Wittke**

Institut für Pharmakologie, Universität Bern  
Friedbühlstraße 49, 3010 Bern  
uwe.zangemeister@pki.unibe.ch

**Interessenkonflikt.** Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

## Literatur

- Allen TM, Cullis PR (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303: 1818
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM et al. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363
- Chi KN, Eisenhauer E, Fazi L et al. (2005) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 1287
- Couzin J (2002) Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 298: 2296
- Gautschi O, Tschopp S, Olie RA et al. (2001) Activity of a Novel bcl-2/bcl-xL-Bispecific Antisense Oligonucleotide Against Tumors of Diverse Histologic Origins. *J Natl Cancer Inst* 93: 463
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J et al. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635
- Karagiannis TC, El-Osta A (2005) RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 12: 787–795
- Kirkwood JM, Bedikian AY, Millward MJ et al. (2005) Long-term survival results of a randomized multinational phase 3 trial of dacarbazine (DTIC) with or without Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) in patients (pts) with advanced malignant melanoma (MM). *Proc Am Soc Clin Oncol* 24: 7506

- Lynch TJ Jr, Raju R, Lind M et al. (2003) Randomized phase III trial of chemotherapy and antisense oligonucleotide LY900003 (ISIS 3521) in patients with advanced NSCLC: initial report. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 623
- Martinez J, Tuschl T (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18: 975
- Mello CC, Conte D Jr (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338
- Millward MJ, Bedikian AY, Conry M et al. (2004) Randomized multinational phase 3 trial of dacarbazine (DTIC) with or without Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) in patients (pts) with advanced malignant melanoma (MM): Analysis of long-term survival. *J Clin Oncol* 22: 7505
- Monia BP, Lesnik EA, Gonzalez C et al. (1993) Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 268: 14514–14522
- Morizono K, Chen IS (2005) Targeted Gene Delivery by Intravenous Injection of Retroviral Vectors. *Cell Cycle* 4
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2: 279
- Nielsen PE (2000) Antisense properties of peptide nucleic acid. *Methods Enzymol* 313: 156
- Opalinska JB, Gewirtz AM (2002) Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat Rev Drug Discov* 1: 503
- Orum H, Wengel J (2001) Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr Opin Mol Ther* 3: 239
- Raffo A, Lai JC, Stein CA et al. (2004) Antisense RNA down-regulation of bcl-2 expression in DU145 prostate cancer cells does not diminish the cytostatic effects of G3139 (Oblimersen). *Clin Cancer Res* 10: 3195–3206
- Sanjuan MA, Rao N, Lai KT et al. (2006) CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J Cell Biol* 172: 1057–1068
- Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J (2005) Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23: 709
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B et al. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173
- Stein D, Foster E, Huang SB et al. (1997) A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-methyl RNA, DNA, and phosphorothioate DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7: 151
- Stephenson ML, Zamecnik PC (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 285
- Tong AW, Zhang YA, Nemunaitis J (2005) Small interfering RNA for experimental cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 7: 114
- Wagner E, Cotten M, Foisner R et al. (1991) Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4255
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A et al. (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111–114