

Schlussbericht Förderphase 1 (01/04/2007-30/09/2008)

FKZ 0315031: Neutralisierende Zyklopeptide gegen kardiostimulatorische - Beta1-Rezeptor-Autoantikörper

Zuwendungsempfänger:

Universität Würzburg, Sanderring 2, 97070 Würzburg

Projektleitung:

Prof. Dr. med. R. Jahns

Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universität Würzburg,

Klinik-Str. 6-8, 97070 Würzburg, sowie

Rudolf-Virchow-Zentrum/DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin,

Universität Würzburg, Versbacher Strasse 9, 97078 Würzburg

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Ziel des Vorhabens war, ein neues Konzept zur Therapie der Anti- β_1 -Antikörper (Ak)-positiven Herzinsuffizienz zunächst eingehend in einem human-analogen Tiermodell zu untersuchen und technisch wie strategisch (Herstellung Anti- β_1 -Ak-neutralisierender Zyklopeptide für die klinische Phase, Optimierung der Applikationsintervalle und Dosisfindung) so zu optimieren, dass klinische Therapiestudien im Menschen begonnen werden können. Parallel dazu sollte eine neue, sensitive diagnostische Methode zum Nachweis poly- und monoklonaler Ratten- und Maus-Anti- β_1 -Ak sowie humaner Anti- β_1 -Ak für serielle Screening-Untersuchungen weiterentwickelt werden.

Antikörper-neutralisierende Zyklopeptid-Homologe des β_1 -AR (ZP) sollten dabei beiden Zielen dienen. Im Tiermodell konnten erste, i.R. unserer Vorarbeiten generierte Zyklopeptide eine Anti- β_1 -Ak-induzierte Herzschädigung verhindern, und eine bereits manifeste Immun-Kardiomyopathie wieder umkehren. Kardioprotektive Antikörper-neutralisierende ZP wurden bisher in der Kardiologie und bei der Herzinsuffizienz noch nicht eingesetzt. Vor Anwendung dieses neuen Therapiekonzepts beim Menschen sollte zudem der Mechanismus, der in Vorarbeiten gesehenen immunmodulatorischen Wirkung der Zyklopeptide zugrunde liegt, weiter aufgeklärt werden.

2. Voraussetzungen der Vorhabensdurchführung

Jüngere experimentelle und klinische Daten weisen auf eine wichtige Rolle von Autoimmunphänomenen bei Entstehung und im Verlauf einer Herzpumpschwäche bzw. „Herzinsuffizienz“ hin. Bei einigen Patienten können i. R. einer fehlgeleiteten Immunreaktion gebildete funktionell aktive Autoantikörper gegen den für die Pumpfunktion wichtigsten kardialen Rezeptor - den β_1 -adrenergen Rezeptor (β_1 -AR) - die Herzerkrankung wahrscheinlich sogar auslösen. Das kardiale Schädigungspotential

von Antikörpern gegen die 2. extrazelluläre Domäne dieses Rezeptors (Anti- β_1 -EC_{II}) wurde vor kurzem zweifelsfrei in einem human-analogen Rattenmodell nachgewiesen.

In diesem Modell haben wir ein neues Konzept zur Prävention und Therapie der Anti- β_1 -EC_{II}-induzierten Herzschädigung umgesetzt. Dazu haben wir Antikörper-neutralisierende Zyklopeptid-Homologe und Zyklopeptid-Mutanten dieser extrazellulären Rezeptor-Domäne generiert. Die zunächst als Fängermoleküle für Anti- β_1 -EC_{II} konzipierten Zyklopeptide und deren Mutanten reduzierten aber nicht nur die Anti- β_1 -EC_{II} Antikörperspiegel im Serum, sondern supprimierten darüber hinaus auch spezifisch die Anti- β_1 -EC_{II}-produzierenden B-Zellen in der Milz behandelte Tiere.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Planung: In der 1. Förderphase (01/04/2007-30/09/2008) war eine Herstellung von optimierten Zyklopeptidvarianten, deren peptidchemische Charakterisierung, deren Basis-Pharmakokinetik inkl. des Nachweises ihrer Verträglichkeit *in vivo* (Basis-Toxikologie/GLP-Sicherheitspharmakologie) sowie der Nachweis einer relevanten Reduktion des Surrogatparameters Beta1-Ak-Spiegel im Rattenmodell, und außerdem der funktionelle Nachweis einer relevanten Reduktion Beta1Ak-induzierter FRET-(cAMP) Signale durch die neuen Zyklopeptide geplant bzw. zu erbringen.

Ablauf: Bis Ende 09/2008 konnte die GLP-Herstellung einer optimierten Zyklopeptidvariante (klin. Entwicklungskandidat) und deren peptidchemische Charakterisierung erzielt werden. Auch die Basis-Pharmakokinetik inkl. des Nachweises der *in vivo* Verträglichkeit (Basis-Toxikologie/GLP-Sicherheitspharmakologie) konnte für eine 2-fach Applikation bis zur 100-fachen klinisch geplanten Applikations-Dosis erbracht werden. Ebenso konnten wir eine relevante Reduktion des Surrogatparameters Beta1 Ak-Spiegel im Rattenmodell (a) *in vitro* ca. 80%-Reduktion ($p < 0.00001$) und (b) *in vivo* über 50%-Reduktion nach 12 Therapiemonaten ($p < 0.0001$) nachweisen. Zudem konnten wir zeigen, dass die Inkubation mit optimierten Zyklopeptiden zu einer relevanten >60%igen Reduktion Beta1Ak-induzierter FRET-(cAMP) Signale führt (zunächst mit Kaninchen, Maus und Ratten-Beta1-Ak (alle $p < 0.00001$)).

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Vorhabensbeginn

Herzinsuffizienz ist definiert als eine Funktionsstörung des Herzens mit der Folge, dass die Blutversorgung des Körpers nicht ausreicht, um den metabolischen Bedürfnissen des Organismus gerecht zu werden. In Deutschland leben ca. 1.5 Mio Patienten mit Herzinsuffizienz, Tendenz ansteigend. Neben einer angeborenen Herzmuskelschwäche oder Herzklappenfehlern beruht die myokardiale Kontraktionsstörung häufig auf einer Mangelversorgung des Herzens selbst durch eine koronare Herzerkrankung (ca. 60% der Fälle). Bei ca. 30% der Patienten aber ist die

Ursache der Pumpfunktionsstörung letztlich unklar; diese Herzerkrankungen werden unter dem Begriff der „idiopathischen“ dilatativen Kardiomyopathien (DCM) subsumiert.^{1,2}

Jüngere klinische und experimentelle Daten weisen auf eine wichtige Rolle von Autoimmunphänomenen bei kardialen Erkrankungen und besonders bei der DCM hin. Obwohl bei der DCM eine pathophysiologische Relevanz von myokardialen Autoantikörpern schon seit mehr als 20 Jahren diskutiert wird, gibt es bis heute nur wenige systematische Untersuchungen zur klinischen Bedeutung solcher Autoimmunphänomene. Aufgrund theoretischer Überlegungen hängt das Potential eines Autoantikörpers, eine Herzerkrankung ungünstig zu beeinflussen oder gar auszulösen, primär von der Zugänglichkeit und der funktionellen Bedeutung der jeweiligen Zielstruktur/en ab. Folglich stellen Antikörper gegen regulatorische Schlüsselproteine auf der Myozytenoberfläche Hauptkandidaten für die Induktion einer Herzerkrankung dar.³ Vor allem Autoantikörpern gegen den für die Herzpumpfunktion wichtigen kardialen β_1 -adrenergen Rezeptor (Anti- β_1 -AR) scheint deshalb eine wichtige Rolle bei der Entstehung und im Verlauf einer Herzinsuffizienz zuzukommen. Gegen die 2. extrazelluläre β_1 -AR-Domäne gerichtete „konformationelle“ Patienten-, aber auch Kaninchen- oder Ratten-Antikörper (Anti- β_1 -EC_{II}) sind dabei offensichtlich in der Lage, eine aktive Rezeptorkonformation zu induzieren oder zu stabilisieren, was zur Verstärkung der Wirkung hormoneller Effektoren (z.B. Adrenalin/Noradrenalin) führt.⁴⁻⁶ Dies fördert allerdings auch den *Circulus vitiosus* aus β -adrenerger Überstimulation, Herunterregulation/Degradation von β -Rezeptoren und Progression einer Herzinsuffizienz.^{7,8} Der direkte Nachweis eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen Herzschädigung und aktivierenden Anti- β_1 -AR gelang dann erst vor kurzem in einem human-analogenen Rattenmodell.⁹

Die tatsächliche klinische Relevanz von Anti- β_1 -AR Autoantikörpern beim Menschen ist noch nicht endgültig geklärt. Dies liegt v.a. an den uneinheitlichen Nachweismethoden und der damit uneinheitlichen Definition dieser Autoantikörper.³ Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass nur knapp 50% der in einem Peptid-ELISA detektierten humanen Anti- β_1 -AR auch dazu in der Lage waren, intakte humane β -AR auf Zelloberflächen zu erkennen.¹⁰ Nur diese Antikörper konnten dann auch die Rezeptorfunktion beeinflussen. In einer Pilotstudie fand sich bei Herzgesunden nur eine sehr geringe Prävalenz aktivierender Anti- β_1 -AR (<1%), wenn beim Screening intakte Rezeptor-exprimierende Zellsysteme eingesetzt wurden. Mit derselben Methode liessen sich jedoch bei ca. 13% der Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und ca. 30% der Patienten mit DCM funktionell aktive Autoantikörper gegen humane β_1 -AR nachweisen.^{6,10} Diese Patienten hatten gegenüber Ak-negativen Patienten eine schlechtere Herzpumpfunktion,¹⁰ und im 10-Jahres Follow-up auch eine ca. 3-fach erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit.^{11,12}

Systematische Untersuchungen an grösseren Patienten-Kollektiven zur Prävalenz und klinischen Relevanz von funktionell aktiven Anti- β_1 -AR stehen aber noch aus.

Neben der Standardtherapie der Herzinsuffizienz (ACEI, ARB, Diuretika, Aldosteron-antagonisten, Herzglykoside) besteht das einzige bisher etablierte, offenbar z.T. auch gegen aktivierende Anti- β_1 -AR wirksame konventionelle pharmakologische Therapie-regime in einer Gabe kardioselektiver β -Blocker im Spätstadium der Erkrankung. Bei Anti- β_1 -Ak positiven herzinsuffizienten Patienten erscheint eine prophylaktische Gabe von Betablockern schon im Frühstadium der Erkrankung sinnvoll. Gegenwärtige experimentelle Therapie-Ansätze bei Patienten mit Autoimmun-Kardiomyopathie zielen neben dem Versuch einer pharmakologische Antagonisierung der Autoantikörper-Effekte auch auf eine direkte Elimination der Autoantikörper selbst ab, z.B. durch unspezifische¹³ oder spezifische Immunadsorption,¹⁴ wobei die mittel- und langfristige Effektivität dieses personell und materiell sehr aufwendigen Ansatzes bisher nicht durch doppelblinde randomisierte Studien gesichert ist.¹⁵ Rezeptor-Antikörper-neutralisierende Peptide wurden trotz klinischer Erfolge in anderen medizinischen Bereichen (z.B. Therapie der MS mit Myelinantigen-Peptidgemischen (Copaxone[®]), Therapie der RA mit TNF-Rezeptor-Dimeren (Enbrel[®])) bisher bei Herzinsuffizienz oder der DCM noch nicht eingesetzt.^{3,16} Die direkte Konkurrenz eines Rezeptor-Antikörper-neutralisierenden ZP als Medikament wären vor allem β -Blocker. Wegen des günstigeren hämodynamischen Profils der ZP (Blutdruck und Herzfrequenz werden durch die bisher generierten Zyklopeptide nicht signifikant beeinflusst) hätte dies klinisch vermutlich Vorteile und somit ein hohes Marktdurchdringungs-Potential. Die Anti- β_1 -Ak-spezifische Immunadsorption als weitere Alternative kommt für den breiten klinischen Einsatz nicht in Frage, sondern wird nur experimentell in hochspezialisierten Zentren angeboten. Sie ist auch weiterhin mit Kosten von ca. 2000.- € pro Patient und Behandlungstag wesentlich aufwändiger und teurer als die voraussichtlichen Behandlungskosten mit einem Rezeptor-homologen Zyklopeptid.

Literatur (fettgedruckt: eigene Arbeiten):

1. Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mauter, B., *et al.* (1996). Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842.
2. American Heart Association (2008). Dallas, Heart Disease and Stroke Statistics - 2007 Update.
3. **Jahns, R.**, Boivin, V., and Lohse, MJ. (2006). Beta1-adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 16, 20-24.
4. Magnusson, Y., Wallukat, G., Guillet, J., Hjalmarsen, Å., and Hoebeke, J. (1991). Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies mimicking autoantibodies against the beta1-adrenergic receptor in patients with idiopathic DCM. *J Autoimmun* 4, 893-905.
5. Mobini, R., Magnusson, Y., Wallukat, G., Viguier, M., Hjalmarsen, A., and Hoebeke, J. (1999). Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta1-adrenoceptor. *J Autoimmun* 13, 179-186.
6. **Jahns, R.**, Boivin, V., Krapf, T., Wallukat, G., Boege, F., and Lohse, MJ. (2000). Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* 36, 1280-1287.

7. Bristow, M.R. (1993). Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 22, 61AA-71AA.
8. **Lohse, M.J.**, Engelhardt, S., and Eschenhagen, T. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93, 896-906.
9. **Jahns, R.**, Boivin, V., Hein, L., Triebel, S., Angermann, CE., Ertl, G., and Lohse, MJ. (2004). Direct evidence for a beta1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 113, 1419-1429.
10. **Jahns, R.**, Boivin, V., Siegmund, C., Inselmann, G., Lohse, MJ., and Boege, F. (1999). Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 99, 649-654.
11. Störk, S., Boivin, V., Horf, R., Hein, L., Lohse, MJ., Angermann, CE., and **Jahns, R.** (2006). Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 152, 697-704.
12. Iwata, M., Yoshikawa, T., Baba, A., Anzai, T., Mitamura, H., and Ogawa, S. (2001). Autoantibodies against the second extracellular loop of b₁-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic DCM. *J Am Coll Cardiol* 37, 418-424.
13. Felix, S.B., Staudt, A., Dörffel, W.V., Stangl, V., Merkel, K., Pohl, M., *et al.* (2000). Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in DCM: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol* 35, 1590-1598.
14. Wallukat, G., Müller, J., and Hetzer, R. (2002). Specific removal of beta1-adrenergic antibodies directed against cardiac proteins from patients with idiopathic DCM. *N Engl J Med* 347, 1806.
15. Hershko, A.Y., and Naparstek, Y. (2005). Removal of pathogenic autoantibodies by immunoadsorption. *Ann NY Acad Sci* 1051, 635-646.
16. Anderton, S.M. (2001). Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes, and possibilities. *Immunology* 104, 367-376.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Unser Vorhaben erforderte bereits in der 1. Förderphase (Zuwendungsempfänger: Universität Würzburg) eine koordinierte Forschungsaktion auf dem Gebiet der Herzinsuffizienz/Molekularbiologie herausragend ausgewiesener Kliniken und Institute der Universität Würzburg mit dem Rudolf-Virchow-Zentrum/ DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin und mit der Pharmazeutika produzierenden Industrie. Das Vorhaben vereinte somit schon in der 1. Förderphase die für die (insbesondere in der 2. Förderphase geplanten) klinischen Studien erforderliche Expertise der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Patienten-Screening und -Einschluß, wichtiges Mitglied im KNHI) mit der experimentellen Expertise des Instituts für Pharmakologie (Tierversuche/FRET-Verfahren) und der immunologischen Expertise des Instituts für Virologie und Immunbiologie (B-/T-Zellanalyse; Kooperation mit dem Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) hinaus ist von den GoBio-Antragstellern mit Beginn der 1. Förderphase (als Ausgründung der Universitäten Würzburg und Tübingen) die Firma Corimmun GmbH gegründet worden. Die weitere Unterstützung der neu gegründeten Corimmun GmbH durch das BMBF (Zuwendungsempfänger der 2 GoBio Förderphase) dient u.a. auch dem Erhalt der Einbindung der universitären Arbeitsgruppe (zukünftig F&E Auftragnehmer der Fa. Corimmun) in das während der 1. Förderphase