

# **Pharmakologisch optimierte Ribonukleinsäuren als rekombinante Impfstoffe und Immunadjuvantien**

**Abschlussbericht zum Vorhaben 0313886  
im Rahmen des Wettbewerbs „GO-Bio“  
im Rahmenprogramm „Biotechnologie-  
Chancen nutzen und gestalten“**

Prof. Dr. med. Ugur Sahin  
Abteilung für Experimentelle und Translationale Onkologie  
III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Universitätsmedizin Mainz  
Obere Zahlbacherstr. 63  
55131 Mainz

*Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0313886 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.*

**Inhaltsverzeichnis**

<b>I.1</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>I.2</b>	<b>Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde</b>	<b>1</b>
<b>I.3</b>	<b>Planung und Ablauf des Vorhabens</b>	<b>2</b>
<b>I.4</b>	<b>Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens</b>	<b>3</b>
<b>I.5</b>	<b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	<b>4</b>
<b>II.1</b>	<b>Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse</b>	<b>5</b>
<b>II.1.1</b>	<b>Auswahl der Leitstrukturen</b>	<b>5</b>
<b>II.1.2</b>	<b>RNS Immunogenität</b>	<b>8</b>
<b>II.1.3</b>	<b>RNS Pharmakokinetik und Galenik</b>	<b>16</b>
<b>II.1.4</b>	<b>RNS Adjuvantien</b>	<b>23</b>
<b>II.1.5</b>	<b>Weitere Wert-generierende Arbeiten</b>	<b>31</b>
<b>II.2</b>	<b>Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises</b>	<b>32</b>
<b>II.3</b>	<b>Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>II.4</b>	<b>Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>II.5</b>	<b>Vorhabensbezogene Fortschritte bei anderen Stellen</b>	<b>34</b>
<b>II.5.1</b>	<b>Biochemische Optimierung von Immunoribopharmaka</b>	<b>34</b>
<b>II.5.2</b>	<b>Immunologische Optimierung von RNS-basierten Impfstoffen</b>	<b>34</b>
<b>II.5.3</b>	<b>Klinische Studien mit RNS</b>	<b>35</b>
<b>II.6</b>	<b>Veröffentlichung der Ergebnisse</b>	<b>36</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>

**Anlagen**

<b>III.1</b>	<b>Beitrag zu den förderpolitischen Zielen</b>
<b>III.2</b>	<b>Wissenschaftlich-technisches Ergebnis</b>
<b>III.3</b>	<b>Fortschreibung des Verwertungsplans</b>
<b>III.4</b>	<b>Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben</b>
<b>III.5</b>	<b>Präsentationsmöglichkeiten</b>
<b>III.6</b>	<b>Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung</b>
<b>IV.</b>	<b>Kurzfassung/Berichtsblatt</b>

## I.1 Aufgabenstellung

Die Substanzklasse langkettiger rekombinanter Ribonukleinsäuren (RNS) hat ein ideales Eigenschaftsprofil für die Entwicklung von neuen Immunopharmaka im industriellen Maßstab. Allerdings steht ihrem hohen Potential der Nachteil ihres schnellen Abbaus durch ubiquitäre Ribonukleasen gegenüber, der das Erreichen pharmakologisch ausreichend wirksamer Medikamentenspiegel nach direkter Applikation von RNS bis zum Zeitpunkt der Antragsstellung nicht möglich gemacht hatte.

**Wissenschaftliches Ziel** unseres Vorhabens war es daher, Immunoribopharmaka mit einer überlegenen Pharmakokinetik und Potenz zu entwickeln, die sich von klassischen RNS Impfstoffen durch (i) eine höhere Stabilität und Translationseffizienz, (ii) die Induktion integrierter zellulärer und humoraler Immunantworten und (iii) eine potente inhärente Adjuvansfunktion unterscheiden. Durch Modifikationen der Antigen-kodierenden RNS sollten die pharmakologischen und immunologischen Eigenschaften von rekombinanten Ribonukleinsäuren für die Nutzung als Impfstoffe und Immunadjuvantien optimiert werden. Hierdurch sollte es ermöglicht werden, Impfstoffe als direkt zu applizierende Medikamente („off the shelf“) zu entwickeln.

Unser **wirtschaftliches Ziel** war es, die sich dadurch eröffnenden neuen Perspektiven des Einsatzes von langkettiger RNS der breiten Wertschöpfung zugänglich zu machen. So können derartige Immunoribopharmaka Impfstoffkomponente und Adjuvansfunktion in einer Substanzklasse vereinigen, Entwicklungs- und Produktionszeiten drastisch verkürzen und neue Impfstoffe für eine breite Masse schnell verfügbar machen. Die neu entwickelten Technologien sollten daher in ein für den industriellen Transfer geeignetes Format überführt, die Verfahren in einem neu zu gründenden Unternehmen zu einer modularen Technologieplattform gebündelt und die Produktentwicklung in Kombination mit unseren proprietären Tumorantigenen in ausgewählten Krankheitsindikationen bis zur klinischen Prüfung und dem Proof of Concept (PoC) vorangebracht werden.

## I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Der Projektleiter Ugur Sahin ist Professor an der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz. Die Laborräume der von Prof. Ugur Sahin geleiteten Abteilung für Experimentelle und Translationale Onkologie sind zusammen mit anderen Arbeitsgruppen im Verfügungsgebäude 911 der Universitätsmedizin untergebracht. Dieses bietet einen regen wissenschaftlichen Austausch zwischen den Abteilungen. Weiter ist dadurch der Zugriff auf zentrale Einrichtungen wie Tiersäle oder Radioaktivitätsbereich ermöglicht.

Die Arbeiten des Vorhabens sind von einem interdisziplinären Team aus Medizinern, Biologen und Chemikern durchgeführt worden. Jedem der unter I.3 beschriebenen Arbeitspakete ist ein Wissenschaftler zugeordnet worden, der dieses als Projektmanager geleitet hat. Die Arbeiten zu „Pharmakologisch optimierte Ribonukleinsäuren als rekombinante Impfstoffe und Immunadjuvantien“ waren eingebettet in das Gesamtkonzept der Abteilung von Prof. Ugur Sahin, immuntherapeutische Ansätze gegen Krebs basierend auf selber identifizierten, idealen Tumorantigenen zu entwickeln.

Neben der intensiven gegenseitigen Unterstützung innerhalb der Abteilung für Experimentelle und Translationale Onkologie gab es Interaktionen zu der Ganymed Pharmaceuticals AG, einer von Prof. Ugur Sahin mit gegründeten Firma in Mainz, die sich mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpertherapien beschäftigt, zum Krebsimmuntherapie Netzwerk CIMT und zum SFB432 „Immunität und Tumorabwehr“, in dem die Arbeitsgruppe des Projektleiters mit einer Reihe aktiver Kooperationen gut vernetzt ist.

### I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben war in vier wissenschaftliche Arbeitspakete (“working packages” oder WPs) unterteilt. Diese waren:

- WP1: Auswahl der Leitstrukturen
- WP2: RNS Immunogenität
- WP3: RNS Pharmakokinetik und Galenik
- WP4: RNS Adjuvantien

Für jedes dieser Arbeitspakete wurde eine Planung mit Meilensteinen aufgestellt. Diese wurden wie folgt vorgegeben (die erste Nummer entspricht dem Arbeitspaket, dem dieser Meilenstein zugeordnet ist):

	Meilenstein	Fälligkeit
S1.1	Auswahl von zwei Impfantigenen für eine erste Arzneimittelprodukt-Entwicklungslinie	6 Monate nach Projektstart
S1.2	Auswahl von zwei Impfantigenen für eine zweite Arzneimittelprodukt-Entwicklungslinie	24 Monate nach Projektstart
S2.1	“Technical proof of concept” (TpoC) für genetische Modifikationen zur Verbesserung der Immunogenität von Riboimpfstoffen	6 Monate nach Projektstart
S2.2	TPOC für genetische Modifikationen zur Verbesserung der Antikörperinduktion durch Riboimpfstoffe	18 Monate nach Projektstart
S2.3	TPOC für Sequenzelemente zur Induktion kombinierter Immunantworten	24 Monate nach Projektstart
S3.1	TPOC für verbesserte Pharmakokinetik (PK) von Riboimpfstoffen	6 Monate nach Projektstart
S3.2	Freigabe der ersten GMP-tauglichen Formulierungen aus RNS und Trägersubstanz/Pufferlösung für <i>in vivo</i> PK-Analysen	18 Monate nach Projektstart
S3.3	Abschluss von <i>in vivo</i> PK-Untersuchungen für die erste Generation von Riboimpfstoffen	24 Monate nach Projektstart
S4.1	TPOC für erste immunstimulatorische Sequenzelemente	6 Monate nach Projektstart
S4.2	Identifikation von immunstimulatorischen Elementen abgeschlossen	18 Monate nach Projektstart
S4.3	TPOC für erste Generation von kombinierten Riboadjuvantien	24 Monate nach Projektstart

Die Arbeiten wurden entsprechend der Planung der WPs angegangen und bezüglich ihres Fortschritts an Hand der Meilensteine kontrolliert. Folgendes konnte erreicht werden:

In WP1 wurden zweimal je zwei Tumor-assoziierte Antigene, die als Zielstrukturen für targetierte immuntherapeutische Anwendungen nutzbar sind, ausgewählt (Meilensteine **S1.1** und **S1.2**). Diese mussten zunächst mittels Hochdurchsatzverfahren identifiziert und dann auf ihre Eignung als Kandidaten evaluiert werden.

WP2 beschäftigte sich zum einen mit der Optimierung der Antigenpräsentationseffizienz durch genetische Modifikationen der RNS, wodurch eine effizientere Induktion von zellulären Immunantworten erreicht werden konnte (Meilenstein **S2.1**). Zum anderen wurden Strukturkomponenten entwickelt, die analog eine Verbesserung von wirksamen Antikörperantworten erzielen konnten (Meilenstein **S2.2**). Da letztere nur im Kontext einer zellulären Immuntherapie funktionieren, die im Rahmen unserer weiteren Arbeiten nicht

von Interesse ist, wurde die kombinierte Immunantwort (Meilenstein **S2.3**) nicht weiter verfolgt.

Im Rahmen der Arbeiten zu WP3 konnten wir schon mit den ersten Untersuchungen zeigen, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften von langkettigen, kodierenden RNS für eine Anwendung als Impfstoff weiter optimiert werden können (Meilenstein **S3.1**). Die weiteren Arbeiten hierzu zusammen mit Untersuchungen zur RNS-Formulierung erlaubten uns die Freigabe einer GMP-tauglichen Formulierung aus RNS und Pufferlösung für die *in vivo* Pharmakokinetik-Analysen (Meilenstein **S3.2**), welche dann auch im Laufe der im Projekt durchgeführten Arbeiten abgeschlossen werden konnten (Meilenstein **S3.3**).

Die Untersuchungen zur Immunstimulation durch RNS (WP4) konnten zeigen, dass nackte kodierende RNS sequenzunabhängig von sich aus einen Adjuvanseffekt erreicht, der sowohl über TLR-7, als auch über TLR-3 vermittelt wird (Meilenstein **S4.1**). Weiter konnten wir erstmalig doppelsträngige RNS mit definierter Länge und Sequenz herstellen, die zu einer spezifischen Immunstimulation führen (Meilenstein **S4.2**). Interessanterweise haben die weiteren Untersuchungen dann aber gezeigt, dass durch weitere dsRNS-Moleküle eine Steigerung der durch nackte, kodierende RNS ausgelösten Immunstimulation – wie als Meilenstein **S4.3** vorgesehen – nicht erreicht werden kann.

#### **I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens**

Vor Beginn dieses Vorhabens sind eine Vielzahl von Vakzinformaten (synthetische Peptide, rekombinantes Protein, virale Vektorsysteme, Nukleinsäuren etc.) als potentielle Tumorpimpfstoffe propagiert worden. Es zeichnete sich schon ab, dass Antigen-kodierende RNS aufgrund verschiedener Alleinstellungsmerkmale mehr und mehr in den Fokus rücken würde (Sullenger & Gilboa 2002). Die Eigenschaft von RNS-basierten Vakzinformaten unabhängig von den HLA Restriktionselementen des Patienten zu sein, alle potentiell immunogenen Epitope zu erfassen und sicherheitstechnisch unbedenklich zu sein, war dargelegt worden (Pascolo 2004). Aufgrund der geringen Stabilität von RNS standen zum damaligen Zeitpunkt Ansätze im Vordergrund, die auf dem Transfer autologer dendritischer Zellen, die mit RNS transfiziert worden sind, beruhten (Boczkowski et al. 1996; Van Tendeloo et al. 2001). Im Rahmen von ersten klinischen Anwendungen war gezeigt worden, dass auf der Basis solcher Ansätze meßbare Immunantworten induziert werden konnten (Heiser et al. 2002 ; Su et al. 2005). Die logistischen Nachteile einer solchen autologen Zelltherapie haben allerdings bis heute eine weitere Verbreitung dieses Konzeptes verhindert.

Demgegenüber stellt die direkte *in vivo* Applikation von RNS – z.B. durch intradermale Injektion – eine vielversprechende Möglichkeit dar, um die *ex vivo* Generierung von gentechnisch veränderten Zellen zu umgehen. Die Nutzung nackter Nukleinsäuren zur Expression von Proteinen ist patentrechtlich frei. Bei der Applikation von *in vitro* transkribierter RNS besteht – anders als bei DNS Vektoren – keine Abhängigkeit von oft mit Patenten belegten Promotoren und Antibiotikaresistenzgenen etc. Allerdings waren entsprechende Ansätze aufgrund hoher Technologiebarrieren zum Vorhabenbeginn noch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Ein Hauptproblem der direkten Gabe von RNS ist deren hohe Instabilität durch nukleolytischen Abbau. Dieses hatten wir in Vorarbeiten schon angegangen und dabei prototypische Vektoren für die *in vitro* Transkription von RNS entwickelt, die unter anderem aufgrund optimierter Länge des Poly(A)-Schwanzes und stabilisierender regulatorischer Sequenzelemente die Herstellung von RNS mit deutlich verbesserten pharmakologischen Eigenschaften (höhere Halbwertszeit, verbesserte Translationseffizienz) im Vergleich zu den damals präklinisch und klinisch genutzten Ribonukleinsäuren ermöglichten. Dies resultierte in bis zu 10-fach erhöhten Proteinnengen in den transfizierten Zellen, führte zu einer höheren Dichte von Epitopen auf der