

Retinale Gentherapie: Neue Aspekte durch klinische Studienergebnisse

Aktuelle Ansätze zur Optimierung gentherapeutischer Effekte

Die Ergebnisse der ersten gentherapeutischen klinischen Studien an Patienten mit schwerer frühkindlicher Netzhautdegeneration aufgrund von Mutationen im RPE65-Gen liegen vor und geben Grund zur Hoffnung, dass in absehbarer Zeit effektive Therapien für eine ganze Reihe verschiedener erblicher Netzhauterkrankungen zur Verfügung stehen. Allerdings zeigen die Daten auch, dass die durchaus euphorisch bewerteten Ergebnisse aus präklinischen Studien an Tiermodellen nicht eins zu eins in die Klinik transferiert werden konnten. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Prof. Knut Stieger und Prof. Birgit Lorenz (Gießen) problematisieren die Ursachen für die mangelnde Übertragbarkeit als Basis für die Identifikation aktueller klinischer Herausforderungen sowie die Erforschung neuer Wege zur Optimierung der gentherapeutischen Effekte.

Seit 2007 werden für mehrere neurodegenerative Erkrankungen klinische Studien zur retinalen Gentherapie durchgeführt, am weitesten fortgeschritten sind sie für RPE65-Mangel und Chorioideremie. Besonders für die schwere frühkindliche Netzhautdegeneration assoziiert mit Mutationen im RPE65-Gen liegen umfangreiche Daten zur Sicherheit und Effektivität der Behandlung vor (Jacobson et al. 2012; Maguire et al. 2009). Die Behandlung mittels adenoassoziierter viraler Vektoren (AAV) wird momentan in einer Phase-III-Studie getestet und steht kurz vor der Zulassung durch die Firma Spark Therapeutics in den USA (Schimmer and Breazzano 2015).

Das Protein RPE65 stellt ein entscheidendes Enzym im Sehzyklus dar, in dem gebleichtes alltrans Retinal aus den Photorezeptoraußensegmenten über einen Kreislauf in den RPE-Zellen wieder in lichtsensitives 11-cis-Retinal umgewandelt wird. Der therapeutische Ansatz besteht in der Wiederherstellung der Funktion des Sehzyklus in den RPE-Zellen durch Gentransfer der genetischen Information des korrekten RPE65-Proteins. Dadurch erhofft man sich einen Stopp der fortschreitenden Degeneration retinaler Zellen und eine Funktionswiederherstellung. Da vor allem die Stäbchen zu 100 Prozent auf das 11-cis-Retinal aus dem Sehzyklus angewiesen sind, ist deren Funktionsverlust im Sinne einer kompletten Nachtblindheit dramatisch. Dagegen scheinen die Zapfen weniger stark von der Erkrankung betroffen zu sein, wodurch zumindest initial eine Restfunktion vorhanden ist (reduzierter Visus), wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß (Jacobson et al. 2009; Lorenz et al. 2012 und 2008). Die Ergebnisse der klinischen Studien zeigten, dass nach

erfolgtem Gentransfer vor allem die Stäbchenfunktion teilweise deutlich verbessert wurde, sodass sich die Betroffenen besser unter schwachen Beleuchtungsbedingungen orientieren können. Dies stellt für viele Patienten eine deutliche Erleichterung des täglichen Lebens dar. Demgegenüber war ein Effekt auf die Zapfen im Sinn einer Visusverbesserung meist nicht zu beobachten.

Therapeutische Ziele retinaler Gentherapie

Während die Gentherapie bei RPE65-Mangel auf eine Funktionswiederherstellung retinaler Zellen abzielt, die nach einer Karenzzeit von wenigen Wochen nach der Behandlung messbar sein sollte, ist das therapeutische Ziel einer gentherapeutischen Behandlung bei Chorioideremie ein anderes. Bei dieser Erkrankung sind die intrazellulären Proteintransportvorgänge im RPE und den Photorezeptoren aufgrund von Mutationen im Rep1-Gen gestört, wodurch es zum Zelluntergang kommt. Die Erkrankung schreitet von peripher nach zentral hin fort und verbliebene Zellen in der zentralen Netzhaut sind weiterhin funktionsfähig, wodurch die Patienten über mehrere Jahrzehnte noch einen guten zentralen Visus haben können bei gleichzeitiger massiver konzentrischer Gesichtsfeldeinschränkung. Ziel einer gentherapeutischen Behandlung ist, dass durch den Gentransfer einer korrekten Sequenz für das Rep1-Protein die Transportvorgänge wieder korrekt ablaufen und dadurch der fortschreitende Zelluntergang gestoppt wird (MacLaren et al. 2014). Eine Funktionswiederherstellung peripherer Bereiche wird nicht erwartet. Da ein Anhalten der Progression der Erkrankung aufgrund des langsamen Fort-

schreitens erst nach mehreren Jahren zweifelsfrei messbar ist, dauert hier die Auswertung der ersten klinischen Daten noch an.

Weitere klinische Studien zur Behandlung von Morbus Stargardt und Usher-Syndrom vom Typ II durch Gentransfer der korrekten Gensequenzen der betroffenen Gene ABCA4 oder USH2A mithilfe eines auf einem Lentivirus basierenden viralen Vektor befinden sich ebenfalls in der klinischen Testung, belastbare publizierte Daten liegen jedoch momentan noch nicht vor.

Notwendigkeit belastbarer Daten zum natürlichen Verlauf

Da gerade bei den oben angeführten Erkrankungen der Verlauf zwischen Patienten sehr unterschiedlich sein kann und auch die Progression nicht immer gleichmäßig verläuft, sind umfangreiche longitudinale klinische Daten von einer großen Anzahl von Patienten notwendig, um den Verlauf der Erkrankung eingehend beschreiben und den Verlauf unter Therapie adäquat bewerten zu können. Dies wird momentan für mehrere Erkrankungen durchgeführt, bei denen klinische Studien begonnen wurden oder in den nächsten Jahren wahrscheinlich werden, (zum Beispiel für X-chromosomale RP, Morbus Stargardt und Juvenile Retinoschisis), und für RPE65-Mangel und Chorioideremie aktuell erweitert. In longitudinalen Studien werden Patientendaten zunächst retrospektiv über lange Zeiträume, idealerweise von der ersten Untersuchung an, analysiert, wobei natürlich bestimmte aktuelle Untersuchungsverfahren, wie die optische Kohärenztomographie, erst seit einigen Jahren zur Verfügung steht (Jacobson et al. 2008; Paunescu et al. 2005). Auch Wechsel der aufgesuchten Klinik oder des behandelnden Arztes im Laufe der Zeit erschweren eine einheitliche Auswertung. Daher sind auch weiterhin prospektive, auf mehrere Jahre angelegte Studien notwendig, in denen die Patienten regelmäßig standardisiert untersucht werden, um ein Maximum an Information über den natürlichen Verlauf zu erheben. Querschnittsuntersuchungen sind demgegenüber von geringerem Wert aufgrund interindividueller Schwankungen selbst bei identischen Mutationen und noch mehr aufgrund Mutationsspezifischer phänotypischer Unterschiede.

Bedarf an morphologischen Daten

Durch das Vorhandensein hochauflösender bildgebender Verfahren wie der optischen Kohärenztomographie oder der adaptiven Optik ist es heute möglich, die Veränderungen der Netzhaut bei degenerativen Erkrankungen sehr genau darzustellen. Gerade die Vermessung der äußeren nukleären Schichtdicke, der Länge der Außensegmente der Photorezeptoren oder die Darstellung der Ellipsoide des inneren Segmentes (ISE), die als ein funktionelles Korrelat zu vorhandener Funktion von Photorezeptoren angesehen wird, können wertvolle strukturelle Informationen liefern, die in der Planung, Durchführung und Auswertung von klinischen Studien zentral sind (Birch et al. 2013; Ehnes et al. 2014). Eingehende Analysen der Zapfenmorphologie und -verteilung sind durch Verfahren der adaptiven Optik zumindest bei bestimmten Erkrankungen möglich und ergänzen die OCT-Daten. Dies ist insofern von zentraler Bedeutung, als nur Bereiche der Netzhaut, bei denen vorhandene Photorezeptoren durch morphologische Verfahren nachgewiesen sind, für eine Gentherapie zur Funktionswiederherstellung oder zumindest -verbesserung dieser Zellen infrage kommen. Sind keine Photorezeptoren mehr vorhanden, wird diese Art der Therapie nicht funktionieren.

Bedarf an funktionellen Daten

Die momentan verfügbaren Methoden zur Messung der retinalen Funktion sind nur bedingt für die Bestimmung des therapeutischen Effektes einer Gentherapie geeignet, da die Patienten häufig schon vor der Behandlung weit fortgeschrittene morphologische Veränderungen haben und nur noch minimale Restfunktionen aufweisen, so dass die Effekte nach Behandlung objektiv eher gering erscheinen. Durch die Entwicklung von neuen, hochsensitiven und möglichst orts aufgelösten Funktionsmessungen wie der funduskontrollierten Perimetrie unter skotopischen und photopischen Bedingungen können Bereiche der Netzhaut identifiziert werden, die für eine Behandlung besonders geeignet sein könnten (Bowl et al. 2013). Hierbei muss allerdings den häufig geringen Restfunktionen bei den Patienten Rechnung getragen werden, sodass handelsübliche Perimeter oft nicht eingesetzt werden. Sehr anschaulich lässt sich dies daran zeigen, dass in der klinischen Studie zur Behandlung der Chorioide-remie bei Patienten mit guter zentraler Restfunktion die funduskontrollierte Perimetrie ein wichtiger Auswerteparameter ist (MacLaren et al. 2014), während die Patienten mit RPE65-Mangel selbst die stärksten Stimuli der Perimeter meistens nicht wahrnehmen können, sodass die Methode ohne Erweiterung des messbaren Bereichs nicht eingesetzt werden kann.

Korrelation der Daten und neue klinische Endpunkte

Durch Nutzung von orts aufgelösten morphologischen und funktionellen Daten desselben Patienten werden Analysen im Sinne eines multimodalen Mappings möglich, die entweder helfen, den optimalen Bereich der Netzhaut für eine Therapie auszuwählen oder ein genaueres Bild der Auswirkungen der Behandlung auf den therapierten Bereich der Netzhaut ermöglichen.

Eine weitere Hürde für die Entwicklung und Planung klinischer Studien für weitere Netzhauterkrankungen liegt in der teilweisen Ablehnung neuer hochauflösender Parameter als klinische Endpunkte durch die Regulationsbehörden auf europäischer (EMA) und amerikanischer Ebene (FDA). Akzeptierte klassische Parameter wie Visus und Gesichtsfeldanalysen sind aufgrund der mangelnden Sensitivität für lokale Funktionsänderungen sowie suboptimaler Reproduzierbarkeit nur bedingt geeignet, um teilweise subtile Veränderungen der retinalen Funktion, die für die Patienten sehr deutlich sind, darzustellen (Roman et al. 2013). Dadurch ist es schwer, klinische Studien mit durchaus positivem Ergebnis in diesem Sinne auch offiziell zu bewerten und es geht in wissenschaftlicher Sicht viel Information verloren.

Aus der Sicht der Wissenschaftler erscheint es sinnvoll und wünschenswert, dass die funduskontrollierte klassische Perimetrie mit weißem Licht oder als Zweifarbenperimetrie mit rotem und blauem Licht zur isolierten Betrachtung von Stäbchen- und Zapfenfunktion sowie aus morphologischer Sicht die orts aufgelöste

Analyse der OCT-Scans als primäre Endpunkte akzeptiert werden. Interessanterweise wird momentan der Hindernisparcours unter definierten Beleuchtungsbedingungen als primärer Endpunkt einer Funktionsprüfung von der FDA akzeptiert und umgehend in der laufenden Phase-III-Studie in den USA als Hauptzielparameter genutzt (Schimmer and Breazzano 2015).

Neue Wege zur Optimierung der Ergebnisse

Der Langzeiteffekt einer retinalen Gentherapie wurde in Studien an Maus und Hund mehrfach nachgewiesen, sodass man von einer einmaligen Behandlung der Patienten ausgehen konnte (Acland et al. 2001; Le Meur et al. 2007; Narfstrom 2003). Allerdings deuten die Ergebnisse der ersten humanen Gentherapiestudien für RPE65-Mangel darauf hin, dass der Behandlungseffekt nach mehreren Jahren nachlassen kann (Bainbridge et al. 2015; Jacobson et al. 2015). Der genaue Grund kann hierfür noch nicht abschließend benannt werden. Eine Theorie besagt, dass die fortschreitende Degeneration der Photorezeptoren nicht aufgehalten wurde, da die Photorezeptoren schon einen so genannten point of no return in den Mechanismen des Zelltodes überschritten haben (Cideciyan et al. 2013). Eine Funktionswiederherstellung der Zellen führt dann leider nicht, wie ursprünglich gedacht, auch zu einem Widerruf der Zelltodinduktion. Da diese Beobachtung entgegen den Daten der präklinischen Daten beim Hund steht, wird momentan nach Unterschieden zwischen den Spezies gesucht, die hierfür verantwortlich sein könnten.

Ein Unterschied liegt in der Tatsache, dass beim Hund die meisten Behandlungen in einem Bereich der Netzhaut durchgeführt wurden, der zum Therapiezeitpunkt noch nicht von degenerativen Veränderungen betroffen war (Cideciyan et al. 2013; Klein et al. 2014). Dadurch wurden die Zellen vor der Zelltodinduktion behandelt und gingen nicht verloren. Dies ist beim Menschen mit RPE65-Mangel anders, da hier meistens überall in der Netzhaut früh degenerative Veränderungen auftreten. Daher erscheint heute die Netzhaut des Hundes nicht mehr als optimales Modell. Momentan werden Wege gesucht, das Problem der fortschreitenden Degeneration nach erfolgter Gentherapie zu beheben, um eine längerfristige Behandlung zu ermöglichen.

Eine weitere Hypothese, warum die Ergebnisse der klinischen Studien nicht mit den präklinischen Studien übereinstimmen, ist, dass die Produktion des fehlenden Enzyms nach erfolgreichem Gentransfer nicht ausreichend ist, um eine volle Wiederherstellung der Zellfunktion zu ermöglichen (Bainbridge et al. 2015). Hier können verschiedene Ursachen angeführt werden: So sind die bisher verwendeten Vektoren noch nicht optimal für den Gentransfer entwickelt oder die Expressionskassetten enthalten Elemente, die nicht ausreichend stark die Produktion des Proteins initiieren. Die Optimierung von viralem Vektor und Expressionskassette für eine

möglichst starke Produktion des fehlenden Proteins in den retinalen Zellen ist aktuell daher ein aktiv bearbeitetes Forschungsfeld: Hauptsächlich werden verbesserte Vektorkapside für eine effektivere Internalisierung der genetischen Informationen in die Photorezeptoren untersucht sowie stärkere Promotorsequenzen und weitere regulatorische Elemente für eine möglichst aktive Produktion. Basierend auf diesen Studien wird es neue klinische Studien für eine Gentherapie von RPE65-Mangel geben, in denen optimierte Vektoren getestet werden sollen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der retinalen Gentherapie ist, dass die momentan einzig effektive Art des Gentransfers auf einer subretinalen Injektion von viralen Vektoren basiert. Dadurch können aber nur begrenzte Bereiche der Netzhaut therapiert werden und nicht die gesamte Netzhaut. Zur Verbesserung dieser Limitation wird momentan aktiv an Möglichkeiten geforscht, die Vektorkapside derart zu verändern, dass auch eine intravitreale Applikation zu einem effektiven Gentransfer in die Photorezeptoren führt und man durch diesen Weg die gesamte Netzhaut therapieren könnte (Dalkara et al. 2013). Die Effekte einer solchen Therapie wären dann aufgrund der fehlenden räumlichen Begrenzung sicherlich stärker.

Neue Ansätze der Gentherapie – Genome editing

Um die Probleme der optimalen Produktion des therapeutischen Proteins in einem artifiziellen Expressionssystem zu umgehen, wird auch an Ansätzen gearbeitet, die krankheitsauslösenden Mutationen im Genom durch zelleigene Reparaturmechanismen zu korrigieren. Dadurch wären die Photorezeptoren in der Lage, im Anschluss an die Reparatur mittels zellulärer Regulationsmechanismen die genau passende Menge des Proteins wiederherzustellen. Für die Reparatur werden bestimmte Enzyme, so genannte

Endonukleasen basierend auf dem TALE- oder dem CRISPR-Cas-System, und DNA-Sequenzen in die Zielzellen transferiert, sodass die Reparatur gezielt nur dort vorgenommen wird, wo der Schaden auftritt. Diese Technik, die in der Zellkultur schon sehr gut funktioniert, muss an der Netzhaut jedoch noch eingehend studiert werden, sodass hier mit einem Einsatz in klinischen Studien erst in einigen Jahren zu rechnen ist.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der ersten klinischen gentherapeutischen Studien haben dazu geführt, dass auf dem Gebiet der experimentellen Therapieforschung für erbliche Netzhauterkrankungen viele neue Aspekte bearbeitet werden. Zum einen bestehen Herausforderungen in der Analyse und Auswahl der zu behandelnden Bereiche in funktioneller und morphologischer Hinsicht, die ebenso bei der Auswertung der therapeutischen Effekte bestehen. Hier werden in den nächsten Jahren neue Methoden und Analyseverfahren entwickelt und zum Einsatz kommen, die völlig neuen Auswertungen ermöglichen. Auch der Gentransfer selbst wird weiterentwickelt, hier stehen die Forscher immer noch vergleichsweise am Anfang bezüglich der Entwicklung möglichst optimaler Vektoren. Neue Ansätze, die es ermöglichen, bestehende Limitationen zu umgehen, existieren ebenfalls, ein Einsatz in der Klinik wird aber noch einige Jahre auf sich warten lassen.

Literatur auf Anfrage in der Redaktion.

Prof. Knut Stieger

Univ.-Augenklinik Gießen, Experimentelle Ophthalmologie
E-Mail: knut.stieger@uniklinikum-giessen.de