

Multikinase-Inhibitoren als therapeutischer Ansatz bei neovaskulärer AMD: In-vitro-Evaluation der Sicherheit von Axitinib, Pazopanib und Sorafenib zur intraokularen Anwendung

Multikinase Inhibitors as a New Approach in Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD) Treatment: In Vitro Safety Evaluations of Axitinib, Pazopanib and Sorafenib for Intraocular Use

Autoren

S. Thiele, R. G. Liegl, S. König, J. Siedlecki, J. Langer, K. Eibl, C. Haritoglou, A. Kampik, M. Kernt

Institut

Augenklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München

Schlüsselwörter

- Retina
- AMD
- Ranibizumab
- anti-VEGF
- Multikinase-Inhibitoren

Key words

- retina
- AMD
- ranibizumab
- anti-VEGF
- multikinase inhibitors

eingereicht 5.10.2012
akzeptiert 21.12.2012

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328161>
Klin Monatsbl Augenheilkd 2013; 230: 247–254 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0023-2165

Korrespondenzadresse

Dr. Marcus Kernt
Ludwig-Maximilians-Universität München
Augenklinik
Mathildenstr.8
80336 München
Tel.: ++ 49/89/51 60 38 11
Fax: ++ 49/89/51 60 51 60
marcus.kernt@med.uni-muenchen.de

Zusammenfassung

Fragestellung: Multikinase-Inhibitoren (MKI) greifen an verschiedenen Stellen der Neovaskularisationskaskade wirkungsvoll an. Erste klinische und experimentelle Daten deuten darauf hin, dass MKIs einen vielversprechenden, neuartigen Ansatz in der Therapie der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration (AMD) darstellen, bisher ist jedoch wenig über die Biokompatibilität von MKIs in Bezug auf humane okuläre Zellen bekannt. Diese In-vitro-Studie untersucht und vergleicht die Biokompatibilität der MKIs Axitinib, Pazopanib und Sorafenib an okulären Zellen des vorderen und hinteren Augenabschnitts, sowie an organkultivierten Spenderhornhäuten.

Methodik: Primäre humane Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (ONHA), Trabekelmaschenwerkzellen (TMC) und retinale Pigmentepithelzellen (RPE), sowie humane korneale Endothel- und Linseneithelzellen (CEC und LEC) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Axitinib, Pazopanib und Sorafenib (0,1–100 µg/mL) behandelt. Zur Simulation von oxidativem Stress wurden die Zellen zusätzlich mit 400 µM Wasserstoffperoxid koinkubiert. Die Induktion von Zelltod (Live-Dead-Assay), sowie die zelluläre Vitalität wurden mittels Live-Dead- und Tetrazolium-Farb-Reduktions-Assay (MTT) untersucht. Außerdem wurde der Einfluss der 3 Testsubstanzen auf das humane Hornhautendothel an seropositiven Spenderhornhäuten in Organkultur mittels Phasenkontrastmikroskopie evaluiert.

Ergebnisse: Bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/mL zeigten sich bei keiner der untersuchten Substanzen und an keinem der untersuchten Zelltypen toxische Effekte. Auch nach 10 Tagen Inkubation der organkultivierten Spenderhornhäute mit 7,5 µg/mL Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib ergab sich kein Hinweis auf endotheliale Toxizität.

Abstract

Background: Multikinase inhibitors (MKI) interfere effectively at different levels of the neovascularisation cascade. Early clinical and experimental data suggest that MKIs represent a promising novel approach for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (AMD). However, so far little is known about the biocompatibility of MKIs regarding human ocular cells. This in vitro study investigates and compares the biocompatibility of three MKIs, axitinib, pazopanib, and sorafenib regarding ocular cells of the anterior and posterior segments, as well as organ-cultured donor corneas.

Methods: Primary human optic nerve head astrocytes (ONHA), trabecular meshwork cells (TMC), and retinal pigment epithelium (RPE), human corneal endothelial and lens epithelial cells (CEC and LEC) were treated with different concentrations of axitinib, pazopanib, or sorafenib (0.1 to 100 µg/mL). To simulate oxidative stress, the cells were additionally co-incubated with 400 µM hydrogen peroxide. Induction of cell death and cellular viability were examined by live-dead assay and tetrazolium dye reduction assay (MTT). In addition, the influence of the three substances on human corneal endothelium was evaluated in seropositive donor corneas in organ culture by phase contrast microscopy.

Results: Up to a concentration of 7.5 mg/mL of the substances tested in any cell type examined, no toxic effects were found. Even after 10 days of incubation of organ-cultured donor corneas with 7.5 µg/mL, axitinib, pazopanib, or sorafenib, no evidence for endothelial toxicity was found.

Conclusion: All three MKIs tested, axitinib, pazopanib, and sorafenib showed a good biocompatibility on the investigated ocular cells. Even under conditions of oxidative stress, there were no toxic effects up to a concentration of 7.5 µg/mL. Only at higher concentrations, there was a dose-depen-

Schlussfolgerung: Alle 3 untersuchten Substanzen, Axitinib, Pazopanib und Sorafenib, zeigten an den untersuchten okulären Zellen eine gute Biokompatibilität. Auch unter den Bedingungen von oxidativem Stress kam es bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/mL zu keinerlei toxischen Effekten. Erst bei höheren Konzentrationen kam es zu einer dosisabhängigen Abnahme der zellulären Vitalität und zur Induktion von Zelltod. Diese Effekte waren bei Pazopanib, gefolgt von Sorafenib, stärker ausgeprägt als bei Axitinib.

Einleitung

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) stellt in den westlichen Industrienationen die Hauptursache für Blindheit bei über 60-jährigen Patienten dar [1,2]. Etwa 10% der Patienten entwickeln die neovaskuläre Form der AMD. Hier kommt es im Bereich der Stelle des schärfsten Sehens (Macula lutea) zu einer pathologischen Gefäßeinsprossung aus der Choroidea (choroidale Neovaskularisation, CNV) in die neurosensorische Netzhaut. Die daraus resultierenden Folgen sind für 90% der Fälle von AMD bedingter Blindheit verantwortlich [1,2].

Die Pathogenese der neovaskulären AMD ist multifaktoriell und letztendlich nicht abschließend geklärt. Bei der Entstehung von CNV scheinen aber Entzündungs- und Ischämieprozesse im retinalen Pigmentepithel (RPE), in der Bruch-Membran und der Choroidea zu einer lokalen Überexpression von Wachstumsfaktoren zu führen, welche dann wiederum zu einer pathologischen Neovaskularisation führt [1,2]. In diesem Zusammenhang wurde die zentrale Rolle der Überexpression des Wachstumsfaktors Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bei der Entstehung von CNV erkannt und intravitreal (in den Glaskörperraum) injizierbare VEGF-Antikörper (z. B. Bevacizumab), Aptamere (z. B. Pegaptanib) oder Fab-Fragmente (z. B. Ranibizumab) als effektive Therapeutika gegen CNV bei AMD entwickelt [1,3–7]. Diese neue Therapieoption hat zu einer deutlichen Verbesserung in der Behandlung von CNV bei AMD geführt, da hierdurch erstmals bei einer Vielzahl der AMD-Patienten nicht nur der rapide Verfall der Sehkraft gestoppt, sondern in vielen Fällen auch wieder eine Verbesserung der Sehschärfe erzielt werden kann [4–6].

Dennoch haben die Ergebnisse großer Studien gezeigt, dass es in den meisten Fällen unter Anti-VEGF-Therapie, trotz einer Verbesserung der Sehschärfe, nur sehr bedingt zu einem Rückgang des neovaskulären Gewebes kommt und ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung nicht immer verhindert werden kann [4,5].

Multikinase-Inhibitoren (MKI) sind eine neue Klasse antiangiogener Wirkstoffe, welche die zelluläre Aktivität von Wachstumsfaktoren inhibieren. Jüngst veröffentlichte Studienergebnisse konnten die Wirksamkeit von MKIs in der Behandlung verschiedener Krebsarten belegen [8,9]. Sorafenib, Axitinib und Pazopanib sind 3 neue Wirkstoffe dieser Substanzklasse, die in der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms angewendet werden [8,9].

Außerdem deuten erste experimentelle, aber auch klinische Daten darauf hin, dass diese Substanzen, allein oder in Kombination mit anderen angiostatisch wirksamen Medikamenten, einen günstigen Effekt in der Therapie neovaskulärer Netzhauterkrankungen, wie der exsudativen AMD oder der diabetischen Retinopathie, haben können [10,11]. So konnte unter anderem unsere Arbeitsgruppe in mehreren experimentellen Arbeiten zeigen, dass neben der direkten Wirkung auf diese Rezeptor-Tyrosin-

kinasen, MKIs bei verschiedenen okulären Zellen die Überexpression von Wachstumsfaktoren regulieren [12–15]. Die vorgelegte Studie untersucht und vergleicht die grundlegende toxikologische Sicherheit von Sorafenib, Axitinib und Pazopanib, für eine mögliche Anwendung im Auge in einem etablierten Zellkulturmodell [16,17]. Diese Daten stellen einen wichtigen Beitrag auf dem Weg zur Etablierung dieses neuen Therapieansatzes für die neovaskuläre AMD dar. Hierzu wurden primäre humane RPE-Zellen, Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (optic nerve head astrocytes, ONHA), Trabekelmaschenwerkzellen (TMC), Linsenepithelzellen (LEC), korneale Endothelzellen (CEC) und humane Spenderhornhäute in Organkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib, Axitinib und Pazopanib (0,1–100 µg/ml) behandelt und zusätzlich oxidativem Stress ausgesetzt. Dann wurde sowohl die Induktion von Zelltod als auch die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht.

kinasen, MKIs bei verschiedenen okulären Zellen die Überexpression von Wachstumsfaktoren regulieren [12–15].

Die vorgelegte Studie untersucht und vergleicht die grundlegende toxikologische Sicherheit von Sorafenib, Axitinib und Pazopanib, für eine mögliche Anwendung im Auge in einem etablierten Zellkulturmodell [16,17]. Diese Daten stellen einen wichtigen Beitrag auf dem Weg zur Etablierung dieses neuen Therapieansatzes für die neovaskuläre AMD dar. Hierzu wurden primäre humane RPE-Zellen, Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (optic nerve head astrocytes, ONHA), Trabekelmaschenwerkzellen (TMC), Linsenepithelzellen (LEC), korneale Endothelzellen (CEC) und humane Spenderhornhäute in Organkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib, Axitinib und Pazopanib (0,1–100 µg/ml) behandelt und zusätzlich oxidativem Stress ausgesetzt. Dann wurde sowohl die Induktion von Zelltod als auch die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht.

Methoden

Testsubstanzen

Die untersuchten Substanzen, Sorafenib (Nexavar, BAY 43–9006 [N-(3-trifluoromethyl-4-chlorophenyl)-N-(4-(2-methyl-carbamoyl pyridin-4-yl)oxyphenyl)Harnstoff], Bayer HealthCare Pharmaceuticals, New Haven, CT, USA), Pazopanib (Votrient, [N(4)-(2,3-dimethyl-2H-indazol-6-yl)-N(4)-methyl-N(2)-(4-methyl-3-sulfonamidophenyl)-2,4-pyrimidinediamin], GlaxoSmithKline, Brentford, UK) und Axitinib (N-Methyl-2-((3-((1E)-2-(pyridin-2-yl)ethenyl)-1H-indazol-6-yl)sulfanyl)benzamid; N-methyl-2-((3-((E)-2-pyridin-2-ylethenyl)-1H-indazol-6-yl)sulfanyl)benzamid, LC-Laboratories, Woburn, MA, USA) wurden in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) gelöst und so verdünnt, dass für die Behandlung in den Zellkulturgefäßen eine Konzentration von jeweils 0,1% DMSO vorlag. Den Kontrollen wurde ebenfalls 0,1% DMSO beigegeben.

Untersuchung auf Hornhaut-Endotheltoxizität

Zur Beurteilung einer möglichen Toxizität von Sorafenib, Axitinib und Pazopanib auf Endothelzellen wurden humane, seropositive Spenderhornhäute in Organkultur mit jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen von Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib, 1 µg/ml und 7,5 µg/ml behandelt. Die Konzentration von 1 µg/ml wurde gewählt, da im Rahmen von Voruntersuchungen bereits bei Konzentrationen ≤ 1 µg/ml eine Wirksamkeit in Bezug auf die Expression von Wachstumsfaktoren gezeigt werden konnte. Die Konzentration von 7,5 µg/ml wurde gewählt, da sich sowohl im MTT-Assay als auch im Live-Dead-Assay bis zu dieser Konzentration bei keiner der im Weiteren untersuchten Zelllinien unter den 3 untersuchten Testsubstanzen Hinweise auf Toxizität ergaben. Die Endothelzellzahl wurde im Verlauf über 10 Tage mittels Phasenkontrastmikroskopie beurteilt. Dabei wurde jeweils meh-

rere Blickfelder aus zentralen Hornhautarealen fotografisch dokumentiert, die Endothelzellen hieraus standardisiert ausgezählt und aus dem Mittelwert die mittlere Endothelzelldichte pro mm^2 errechnet.

In-vitro-Toxizitäts-Untersuchung an Zellen des vorderen und hinteren Augenabschnitts

Um mögliche toxische Wirkungen von Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib auf Zellen des menschlichen Auges zu untersuchen, wurden 3 primäre, humane Zelltypen, Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (optic nerve head astrocytes, ONHA), retinale Pigmentepithelzellen (RPE), sowie Trabekelmaschenwerkzellen (TMC) und eine kommerziell verfügbare, immortalisierte Linseneithelzelllinie (LEC) sowie eine immortalisierte korneale Endothelzelllinie (CEC) in Kultur mit 2 hierfür etablierten Testverfahren, dem MTT-Assay und dem Live-Dead-Assay, getestet. RPE-Zellen, ONHA und TMC wurden von 4 Spenderaugen aus der Hornhautbank der Augenklinik der LMU gewonnen und wie bereits beschrieben kultiviert [12–15]. Zur Kultivierung der Zellen wurde für die CEC eine Eins-zu-eins-Mischung aus F10 und M199 als Medium, für die LEC Modified Eagle (ME)-Medium, für die ONHA F12-Medium, für die RPE Zellen Dulbecco's ME-Medium und für die TMC F12-Medium verwendet (alle: Sigma, St. Louis, MO, USA). In der Wachstumsphase wurde bei LEC, ONHA, RPE-Zellen und TMC den Medien jeweils 10% fetales Kälberserum, den CEC 5% fetales Kälberserum beigefügt. Vor der Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen wurden die Zellen für 24 Stunden mit Medien, ohne Zugabe von Serum gehalten.

Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten an stationären Zellkulturen. Untersuchungen an stationären Zellkulturen erleichtern, besonders im MTT-Assay, die Abgrenzung von zytotoxischen gegenüber antiproliferativen Effekten eines Wirkstoffs. Hierzu wurden ca. 2×10^5 Zellen (RPE, CEC und LEC) bzw. ca. 4×10^5 Zellen (TMC und ONHA) pro Well auf 6 Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen mit den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen behandelt.

Um exemplarisch für den vorderen Augenabschnitt den Einfluss von Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib auf das Trabekelmaschenwerk, das Linseneithel und das korneale Epithel zu untersuchen, wurden die primären TMC, CEC und LEC mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib (0,1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Exemplarisch für die menschliche Netzhaut wurden primäre RPE-Zellen und primäre ONHA ebenfalls auf mögliche Nebenwirkungen durch die genannten Konzentrationen von Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib untersucht. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen der entsprechenden Zellkultur.

MTT-Assay

Der Tetrazolium Farb-Reduktions-Assay (MTT; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) stellt eine der Standarduntersuchungstechniken dar, um den Einfluss von Substanzen auf Zellen in Zellkultur zu untersuchen. Der MTT-Assay wurde für diese Untersuchung an primären humanen ONHA, TMC und RPE-Zellen, sowie humanen CEC und LEC, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt [15,16]. Kurz zusammengefasst wird der initial gelbe MTT-Farbstoff in Zellkulturmedium gelöst und bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Dann werden die Zellen mit dem den Farbstoff enthaltenden Zellkulturmedium bei 37°C für 30–45 min inkubiert. Der MZZ-Farbstoff wird dann, dem Vitalitätsgrad der Zellen entsprechend, mit-

tels der zelleigenen mitochondrialen Dehydrogenase verstoffwechselt und nimmt dadurch einen violetten Farbton an. Dieser Farbumschlag wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen und erlaubt über die Quantifizierung des verstoffwechselten MTT-Farbstoffs indirekte Rückschlüsse auf die Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen.

Simulation von oxidativem Stress als Modell einer intraokularen Entzündung

Um die Sicherheit der Testsubstanzen auch unter den Bedingungen einer intraokularen Entzündung zu evaluieren, wurden die primären humanen ONHA, TMC und RPE-Zellen, sowie die humanen CEC und LEC in einem Modell für oxidativen Stress untersucht. Hierzu wurden die untersuchten Zellen am Ende der 48-stündigen Inkubationszeit mit Sorafenib, Axitinib oder Pazopanib zusätzlich mit 400 μM Wasserstoffperoxid koinkubiert und dann der MTT-Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt. In einer Reihe von Voruntersuchungen wurden für die Koinkubation der Zellen verschiedene Konzentrationen Wasserstoffperoxid untersucht. Die Konzentration von 400 μM Wasserstoffperoxid wurde gewählt, da hierbei lichtmikroskopisch zwar ein ausreichender zellulärer Effekt sichtbar war, der in seinem Ausmaß aber lediglich subletal sein sollte.

Live-Dead-Assay

Im Live-Dead-Assay wird die Induktion von Zelltod unter dem Einfluss bestimmter Substanzen untersucht. Dabei wird die Entwicklungsfähigkeit durch eine 2-Farben-Fluoreszenzuntersuchung bestimmt, indem die Zellkerne nicht lebensfähiger primärer humaner, ONHA, TMC und RPE-Zellen, sowie humaner CEC und LEC durch den roten, membranundurchlässigen Farbstoff Propidiumjodid angefärbt werden. Gleichzeitig werden die Kerne aller Zellen durch den blauen, membrandurchlässigen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Anhand der Differenz aus beiden Färbungen lassen sich die Anzahl der lebenden und der toten Zellen bestimmen. Der Test wurde entsprechend vorangehender Beschreibung [15,16] und den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Ergebnisse

▼ Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die effektiven Wirkkonzentrationen von Sorafenib, Axitinib und Pazopanib unterhalb einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu liegen scheinen [12–15].

Multikinase-Inhibitoren Axitinib, Pazopanib und Sorafenib ohne toxische Wirkung auf Hornhautendothel-, Linseneithel- und Trabekelmaschenwerkzellen

Die mit einer Endkonzentration von je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der 3 untersuchten MKIs, Axitinib, Pazopanib und Sorafenib, behandelten seropositiven Spenderhornhäute wurden im Verlauf über 10 Tage untersucht. Dabei wurde die Endothelzellzahl als das maßgebliche Kriterium für die Aufrechterhaltung der Klarheit und Vitalität der Hornhaut im Phasenkontrast-Mikroskop bestimmt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der 3 untersuchten Substanzen eine signifikante Abnahme der Endothelzellzahl oder andere Auffälligkeiten festgestellt werden (◉ Abb. 1).

Zelldichte des Hornhautendothels nach 10d Inkubation mit MKIs

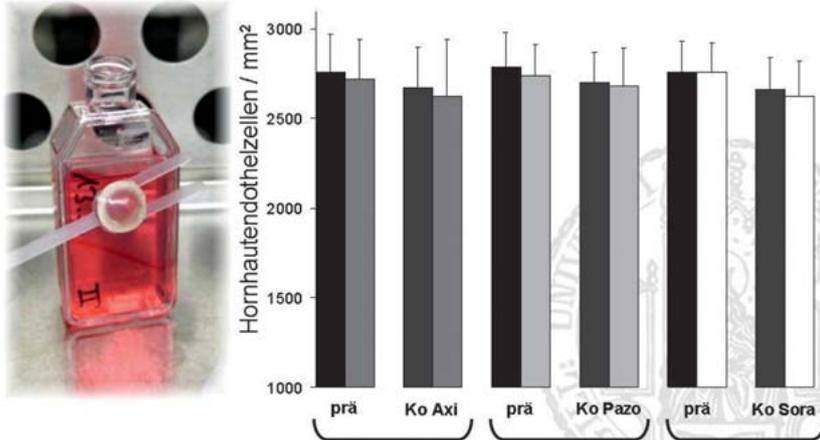


Abb. 1 Für die Untersuchung der kornealen Toxizität wurden von paarigen, humanen Spenderhornhäuten in Organkultur jeweils eine Hornhaut für 10 Tage mit Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib (**Axi**, **Pazo**, **Sora**) in einer Konzentration von je 7,5 µg/ml inkubiert. Vor und nach der Behandlung wurde die korneale Endothelzellzahl bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml wurde, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollhornhaut (**Ko**), bei keiner der untersuchten Testsubstanzen eine vermehrte Abnahme der Endothelzellzahl festgestellt.

An den von uns untersuchten Zellkulturen (primäre TMC, LEC und CEC) zeigten sich bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml für keine der 3 untersuchten MKIs, Axitinib, Pazopanib und Sorafenib, Hinweise auf Toxizität. Die über 48 Stunden mit Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib behandelten Zellen wurden weder in Bezug auf ihre Proliferationsfähigkeit noch in Bezug auf durch die einzelne Testsubstanz (Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib) induzierten Zelltod, selbst wenn sie zur Simulation von oxidativem Stress mit 400 µM Wasserstoffperoxid koinkubiert wurden, beeinflusst. Bei deutlich höheren Konzentrationen (> 10 µg/ml) kam es bei allen untersuchten Zelllinien und bei allen 3 untersuchten Testsubstanzen zu einer dosisabhängigen Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität (● **Abb. 2** und **3**). Diese Effekte waren nach Behandlung mit Axitinib schwächer ausgeprägt als nach Behandlung mit Pazopanib oder Sorafenib. Auch bei der Evaluation von substanzinduziertem Zelltod ergaben sich nach Inkubation der primären TMC, LEC und CEC mit Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml keine Hinweise für erhöhte Toxizität.

Keine Beeinflussung der Vitalität von RPE-Zellen und Astrozyten aus dem Sehnervenkopf durch therapeutische Dosen Axitinib, Pazopanib und Sorafenib

Auch die untersuchten primären ONHA und RPE-Zellen zeigten bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml Axitinib, Pazopanib oder Sorafenib nach 48 Stunden Inkubation keinerlei Beeinflussung durch die Testsubstanzen, weder im Hinblick auf die Vitalität noch in Bezug auf die Induktion von Zelltod. Diese Ergebnisse zeigten sich auch unter den simulierten Bedingungen des oxidativen Stresses (Koinkubation mit 400 µM Wasserstoffperoxid) (● **Abb. 2**, **3** und **4**).

Diskussion

Für die Entstehung der AMD werden eine Vielzahl genetischer und Umweltfaktoren verantwortlich gemacht, die gemeinsam zu degenerativen Veränderungen in der zentralen Retina und der Stelle des schärfsten Sehens führen [1,2]. Die Entwicklung

einer CNV im Bereich der Makula stellt hierbei das morphologische Korrelat, welches für den drastischen Abfall der Sehschärfe bei Patienten mit „feuchter“ AMD verantwortlich ist, dar. Dieser pathologische Prozess der CNV-Bildung und der konsekutiven Schädigung umliegender, neurosensorischer Netzhautstrukturen kann zu einem unwiederbringlichen Verlust der Lesefähigkeit, des Erkennens von Gesichtern und der Fähigkeit, Auto zu fahren, führen [1,2].

Für die Entstehung von CNVs werden eine Reihe von Mechanismen verantwortlich gemacht, worunter eine Fehlregulation in der Signaltransduktion verschiedener Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Der Wachstumsfaktor VEGF ist hierbei als zentrales Schlüsselmolekül zu nennen und die Entwicklung von spezifischen Antikörpern gegen VEGF hat in der Therapie dieser Erkrankung deutliche Fortschritte ermöglicht [1, 3]. In vielen Fällen kommt es unter dieser Therapie zu einer Verbesserung des Sehvermögens und einer Rückbildung der aus der Neovaskularisation resultierenden Netzhautschwellungen an der zentralen Netzhaut, dem Makulaödem. Die alleinige Blockade dieses Wachstumsfaktors scheint aber oft nicht zur vollständigen Rückbildung der pathologischen Gefäße zu führen [1,3,4]. Die neu gebildeten Blutgefäße und das sie umgebende, pathologisch veränderte Gewebe bleiben meist weiter bestehen, und langfristig ist oft dennoch ein weiteres Voranschreiten der Erkrankung festzustellen [1,3,4]. Der Grund für diesen Mangel an nachhaltiger Wirkung könnte darin bestehen, dass redundante molekulare Signalwege trotz Therapie weiter aktiv bleiben und die alleinige Reduktion von VEGF im Extrazellulärraum nur begrenzte Wirkungen auf das neovaskuläre Gewebe hat. Zudem ist bekannt, dass die Hemmung eines einzelnen Moleküls über rezeptorvermittelte Feedback-Mechanismen zu einer kompensatorischen Zunahme alternativer Signalwege führen kann [2, 18, 19].

In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer Wirkstoffe entwickelt, die über eine selektive Hemmung von Rezeptor-Tyrosinkinasen bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen das Tumorwachstum hemmen. Wirkstoffe dieser neuen Substanzklasse werden unter dem Oberbegriff MKI zusammengefasst. Zu den in der onkologischen Therapie zugelassenen Wirkstoffen dieser Substanzklasse gehören auch die von uns untersuchten Substan-

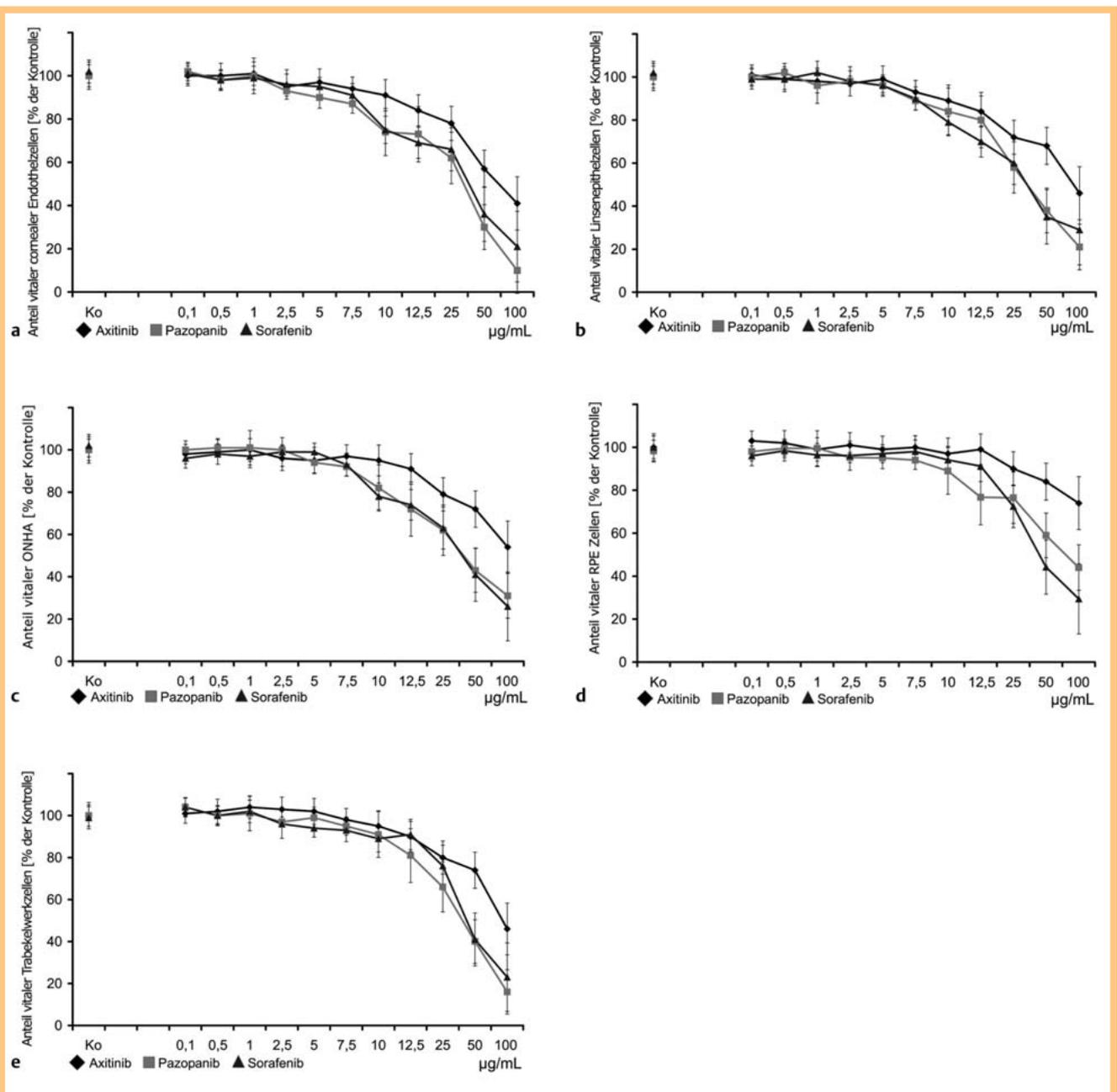


Abb. 2 Evaluation des Anteils vitaler Zellen nach 48 h. Behandlung von humanen kornealen Endothelzellen (CEC, **a**), Linseneithelzellen (LEC, **b**), primären humanen Astrozyten aus dem Sehnervenkopf (ONHA, **c**), primären

humanen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE, **d**) und primären humanen Trabekelmaschenwerkzellen (TMC, **e**) mit Axitinib, Pazopanib und Sorafenib (MTT-Assay).

zen Sorafenib, Axitinib und Pazopanib. Die Wirksamkeit dieser MKIs beruht auf der Unterdrückung pathologischer Gefäßneubildungen im Tumorgewebe. Die Substanzen greifen hierbei an mehreren Angriffspunkten in der Neovaskularisationskaskade an. Zunächst wurde beispielsweise für Sorafenib die Hemmung der RAF-Kinase als primärer Wirkmechanismus angenommen, inzwischen konnte aber auch eine signifikante Wirkung auf verschiedene, andere Rezeptor-Tyrosinkinasen, die bei der Entstehung von Gefäßneubildungen beteiligt sind, nachgewiesen werden. Die antiproliferative Wirkung von Sorafenib, aber auch von anderen Multikinase-Inhibitoren, scheint dabei auch aus der Blockierung der RAF/Mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated Kinase (ERK) (MEK)/ERK (RAF/MEK/ERK) Kaska-

de und seiner Wirkung auf verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie den VEGF-Rezeptoren 2 und 3 (VEGFR-2/3), des PDGF-Rezeptors, von FLT3, Ret und c-Kit zu resultieren [9,20–22]. Außerdem konnte in vitro gezeigt werden, dass Sorafenib zumindest indirekt auch die Expression von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, den Platelet-derived Growth Factor (PDGF) oder Placenta Growth Factor (PIGF) beeinflusst [11]. Axitinib und Pazopanib gehören der 2. Generation von MKI an, die selektiver an spezifischen Rezeptor-Tyrosinkinasen angreifen. Axitinib wirkt spezifisch auf die VEGF-Rezeptoren 1, 2 und 3, für Pazopanib konnte eine spezifische Affinität zum PDGF-Rezeptor, aber auch zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen gezeigt werden.

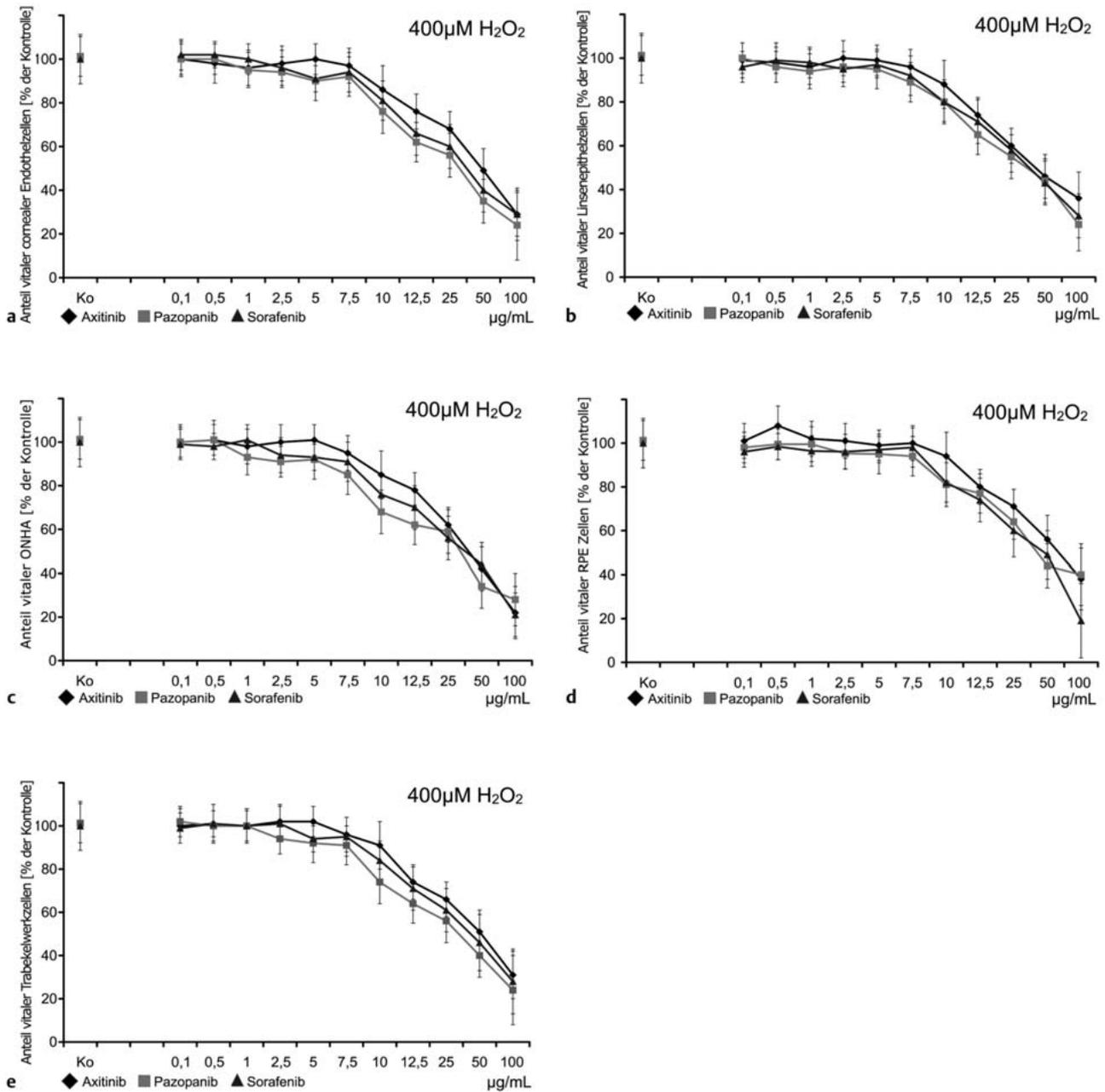


Abb. 3 Evaluation des Anteils vitaler Zellen nach kombinierter Behandlung mit je einer der 3 Testsubstanzen und 400 µM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 48 h (a–e). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung (Standard Deviation, SD) an. Bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml war bei kei-

ner der untersuchten Substanzen, auch unter den Bedingungen von H_2O_2 -induziertem oxidativen Stress, eine Abnahme der zellulären Vitalität zu verzeichnen.

Aufgrund dieser spezifischen Wirkung von MKIs können diese Substanzen möglicherweise auch in die Signalwege eingreifen, welche an der Entstehung von CNVs und der neovaskulären AMD maßgeblich beteiligt sind. So deuten jüngst veröffentlichte Fallberichte darauf hin, dass beispielsweise Sorafenib, allein oder in Kombination mit anderen proliferationshemmenden Wirkstoffen, bei der Behandlung der „feuchten“ AMD wirkungsvoll sein kann [10,11]. Die Wirksamkeit einer topischen Gabe von Pazopanib bei neovaskulärer AMD wird derzeit in Phase-I- und -II-Studien evaluiert. Für Axitinib sind bisher keine In-vivo-Daten über die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Substanz in Bezug auf okuläre Erkrankungen bekannt, unsere Arbeitsgruppe konnte

aber zumindest in vitro günstige Eigenschaften bezüglich einer möglichen Anwendung in der Therapie okulärer, neovaskulärer Erkrankungen nachweisen.

Für die Therapie retinaler, neovaskulärer Erkrankungen bietet sich eine direkte Applikation des Wirkstoffs in den Glaskörperraum mittels intravitrealer Injektion an, da so entsprechend hohe Wirkspiegel im Augeninneren erzielt werden können und das Risiko für systemische Nebenwirkungen deutlich reduziert wird. Hierbei kommen die in das Auge eingebrachten Substanzen aber auch mit einer Reihe sensibler Strukturen, wie dem Hornhautendothel, der natürlichen Linse und dem Trabekelmaschenwerk im vorderen Augenabschnitt, aber auch mit der neurosensori-

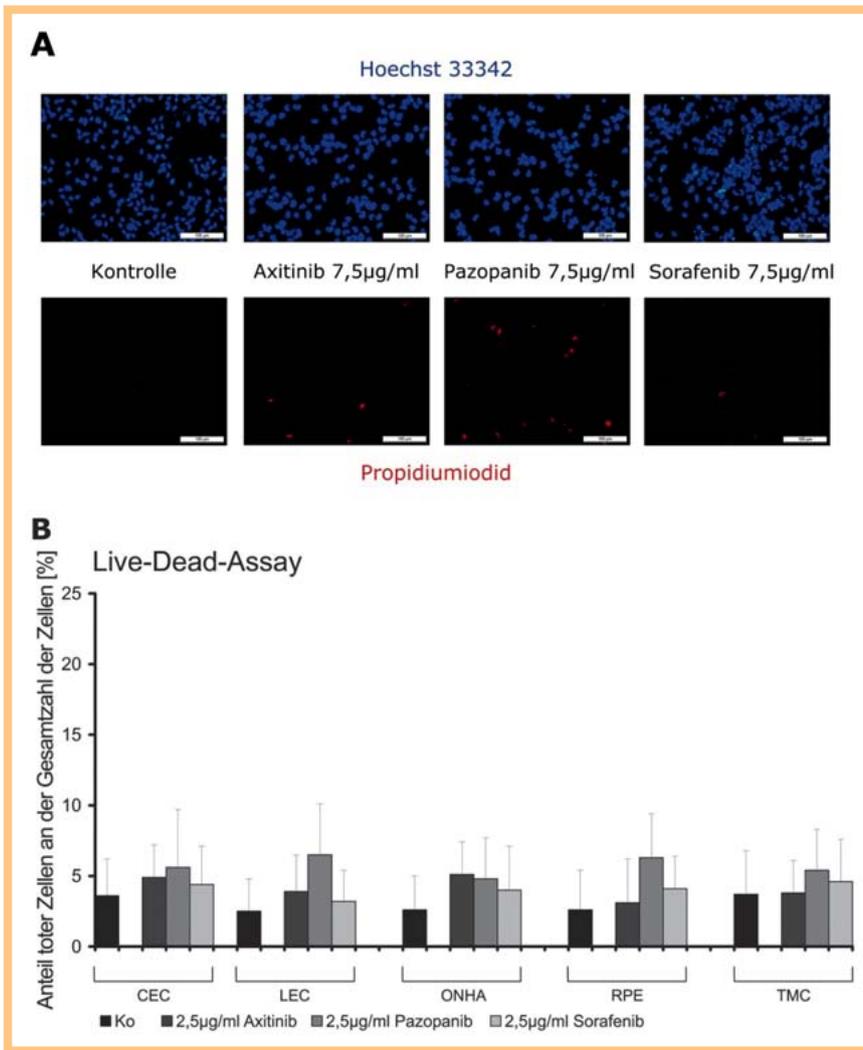


Abb. 4 Evaluation der Induktion von Zelltod nach Behandlung mit Axitinib, Pazopanib und Sorafenib. Um die Toxizität der untersuchten Substanzen zu überprüfen, werden die Zellkerne aller vorhandenen Zellen mittels des Farbstoffs Hoechst 33342 blau angefärbt (A, obere Reihe), zusätzlich werden die Zellkerne aller toten Zellen selektiv durch den Farbstoff Propidiumjodid rot eingefärbt (A, untere Reihe). A zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie an primären RPE-Zellen. In B sind die Ergebnisse für alle untersuchten Zelltypen (CEC, LEC, ONHA, RPE und TMC) zusammengefasst. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung (Standard Deviation, SD) an. Bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml zeigte sich bei keinem der untersuchten Multikinase-Inhibitoren ein Hinweis auf vermehrten Zelltod.

schen Netzhaut und dem RPE im hinteren Augenabschnitt in Kontakt. Um schwerwiegenden Komplikationen und Unverträglichkeiten vorzubeugen, muss deshalb vor jeglicher intraokularer Anwendung einer neuen Substanz zunächst zwingend die Toxizität ausreichend evaluiert werden [16, 17].

Für die von uns untersuchten MKIs liegen bisher nur sehr wenige Daten zur Sicherheit für die intraokulare Anwendung vor. Die im Rahmen der hier vorgestellten Studie erbrachten In-vitro-Ergebnisse deuten auf eine gute Biokompatibilität aller 3 evaluierter Substanzen, Sorafenib, Axitinib und Pazopanib hin und zeigen zumindest in vitro eine ausreichende therapeutische Breite für eine Anwendung am Auge. Bei keiner der 3 untersuchten MKIs, Axitinib, Pazopanib und Sorafenib, zeigte sich bis zu einer Konzentration von 7,5 µg/ml an den untersuchten Zelllinien und auch an den für 10 Tage mit den Testsubstanzen inkubierten Spenderhornhäuten in Organkultur ein Hinweis auf Toxizität. In-vitro-Untersuchungen unserer Forschungsgruppe ergaben, dass eine spezifische Wirkung auf Wachstumsfaktor-Signalkaskaden im RPE und an vaskulären Zellen für alle 3 untersuchten MKIs im Bereich von 1 µg/ml und darunter zu liegen scheint, sodass bei allen 3 untersuchten Substanzen, Axitinib, Pazopanib und Sorafenib, zumindest auf Basis der hier vorgelegten experimentellen Daten, von einer guten Biokompatibilität und ausreichenden therapeutischen Breite ausgegangen werden kann.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie ergänzen also die Daten unserer vorangegangenen Untersuchungen, die zeigen konnten, dass alle 3 Substanzen spezifische Effekte auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese der neovaskulären AMD und anderer proliferativer Netzhauterkrankungen aufweisen, haben, um den äußerst wichtigen Aspekt der Biokompatibilitätsprüfung. Unsere Untersuchungen stellen hierzu lediglich einen ersten Schritt dar, weitere experimentelle und klinische Studien sind jedoch notwendig. Wir hoffen aber, dass unsere Ergebnisse einen Beitrag leisten, die Therapie dieser schwerwiegenden Erkrankungen, die unbehandelt bis zur Erblindung führen können, weiter zu verbessern und dass die Wirkstoffgruppe der MKIs zukünftig das Spektrum der wirksamen Therapeutika erweitern kann.

Acknowledgements

Die Autoren danken Frau Katja Obholzer für hervorragende technische Unterstützung.

Interessenkonflikt: Nein

Literatur

- 1 *Algvere PV, Seregard S.* Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80: 136–143
- 2 *Fine SL, Berger JW, Maguire MG et al.* Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2000; 342: 483–492
- 3 *Aiello LP.* Targeting intraocular neovascularization and edema—one drop at a time. *N Engl J Med* 2008; 359: 967–969
- 4 *Regillo CD, Brown DM, Abraham P et al.* Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *Am J Ophthalmol* 2008; 145: 239–248
- 5 *Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; 355: 1419–1431
- 6 *Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA.* Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 336–339
- 7 *Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham jr. ET et al.* Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351: 2805–2816
- 8 *Bukowski RM.* Pazopanib: a multikinase inhibitor with activity in advanced renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 635–645
- 9 *Wilhelm SM, Adnane L, Newell P et al.* Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3129–3140
- 10 *Diago T, Pulido JS, Molina JR et al.* Ranibizumab combined with low-dose sorafenib for exudative age-related macular degeneration. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 231–234
- 11 *Kernt M, Staehler M, Stief C et al.* Resolution of macular oedema in occult choroidal neovascularization under oral Sorafenib treatment. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 456–458
- 12 *Kernt M, Liegl RG, Rueping J et al.* Sorafenib protects human optic nerve head astrocytes from light-induced overexpression of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and placenta growth factor. *Growth Factors* 2010; 28: 211–220
- 13 *Kernt M, Neubauer AS, Liegl RG et al.* Sorafenib prevents human retinal pigment epithelium cells from light-induced overexpression of VEGF, PDGF and PlGF. *Br J Ophthalmol* 2010; 94: 1533–1539
- 14 *Kernt M, Thiele S, Hirneiss C et al.* [Cytoprotective and antiangiogenic effects of the multikinase inhibitor sorafenib on human retinal pigment epithelium.]. *Ophthalmologe* 2011; 108: 445–451
- 15 *Kernt M, Thiele S, Liegl RG et al.* Axitinib modulates hypoxia-induced blood-retina barrier permeability and expression of growth factors. *Growth Factors* 2012; 30: 49–61
- 16 *Kernt M, Neubauer AS, De Kaspar HM et al.* Intravitreal voriconazole: in vitro safety-profile for fungal endophthalmitis. *Retina* 2009; 29: 362–370
- 17 *Kernt M, Neubauer AS, Ulbig MW et al.* In vitro safety of intravitreal moxifloxacin for endophthalmitis treatment. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 480–488
- 18 *Freyberger H, Brocker M, Yakut H et al.* Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 106–109
- 19 *Grisanti S, Tatar O.* The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27: 372–390
- 20 *Liu L, Cao Y, Chen C et al.* Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851–11858
- 21 *Takahashi H, Tamaki Y, Ishii N et al.* Identification of a novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor and its effect for choroidal neovascularization in vivo. *Curr Eye Res* 2008; 33: 1002–1010
- 22 *Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y et al.* Suppression and regression of choroidal neovascularization by the multitargeted kinase inhibitor pazopanib. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 494–499