

Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte

Immuntherapie des Melanoms mit Plasmid DNA – Erkenntnisse aus der präklinischen und klinischen Forschung

Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Dermatologie und Venerologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Frau Dr. med. Lucie Heinzerling
geboren am 2.5.1969 in München

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Eingereicht im Dezember 2005

Gutachter 1. Herr Prof. Dr. Grabbe
2. Herr Prof. Dr. Stingl

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung.....	5
3. Therapie des metastasierenden Melanoms	6
4. Interleukin-12 (IL-12)	9
4.1 Immunologische Wirkung	9
4.2 Präklinische Studien zu Interleukin-12	10
4.2.1 Rekombinantes Interleukin-12.....	10
4.2.2. Interleukin-12 exprimierende Zellen	11
4.2.3. Interleukin-12 transfektierte virale Vektoren	14
4.2.4. Interleukin-12 kodierende DNA	16
4.3 Klinische Studien zu Interleukin-12	17
4.3.1 Wirksamkeit von rekombinantem Interleukin-12.....	18
4.3.2. Wirksamkeit von Interleukin-12 exprimierenden Zellen.....	18
4.3.3. Toxizität von rekombinantem Interleukin-12 und IL-12 exprimierenden Zellen	19
5. Zielsetzung der Arbeit	23
6. Erkenntnisse präklinischer Untersuchungen und klinische Ergebnisse	24
6.1 Induktion eines langanhaltenden Zytokineffektes durch Injektion von Interleukin-12 kodierender Plasmid DNA: Schultz J, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K (2000) Induction of long-lasting cytokine effect by injection of IL-12 encoding plasmid DNA. <i>Cancer Gene Ther</i> , 7:1557-1565.	24
6.2 Tumorregression von humanen und murinen Melanomen nach intratumoraler Injektion von Interleukin-12 kodierender Plasmid DNA in Mäusen: Heinzerling L, Dummer R, Pavlovic J, Schultz J, Burg G, Moelling K (2002) Tumor regression of human and murine melanoma after intratumoral injection of IL-12 encoding plasmid DNA in mice. <i>Exp Dermatol</i> , 11:232-240.....	25
6.3 Therapie mit IP-10 kodierender Plasmid DNA zeigt Antitumorwirkung und anti-metastatische Wirksamkeit: Keyser J, Schultz J, Ladell K, Elzaouk L, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K (2004) IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. <i>Exp Dermatol</i> , 13:380-390.	26
6.4 Intratumorale Injektion von humaner Interleukin-12 kodierender DNA induziert Tumorregression von Melanommetastasen beim Schimmel: Heinzerling LM, Feige K, Rieder S, Akens MK, Dummer R, Stranzinger G, Moelling K (2001) Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. <i>J Mol Med</i> , 78:692-702.	27
6.5 Klinische Wirksamkeit von intratumoral injizierter humaner Interleukin-12 kodierender Plasmid DNA bei Patienten mit metastasierendem Melanom: Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, Elzaouk L, Pavlovic J, Moelling K (2005) Clinical efficacy by intratumoral injection of DNA encoding human IL-12 in metastatic melanoma patients. <i>Hum Gene Ther</i> , 16(1):35-48.	28
7. Diskussion	29
8. Verwendete Abkürzungen und Einheiten	34
9. Literaturverzeichnis	35

1. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine Tumorerkrankung mit steigender Inzidenz, von der vor allem jüngere Patienten betroffen sind. Patienten mit Metastasen der Haut, der Subkutis oder der Lymphknoten haben eine mittlere Überlebenszeit von 12 Monaten, bei Patienten mit viszeralen Metastasen beträgt diese nur etwa 5 Monate. Zur Zeit steht bei fortgeschrittener Erkrankung mit Fernmetastasen keine kurative Therapie zur Verfügung.

Interleukin-12 (IL-12) ist ein Schlüsselmediator sowohl der angeborenen als auch der zellulären Immunität und verbessert die Tumorerkennung durch Induktion von HLA-Klasse-I- und -II-Molekülen sowie des Zelladhäsionsmoleküls Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) auf Melanomzellen. Ausserdem wird die Tumorabwehr durch Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T-Helfer 1-Zellen, durch Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und natürlicher Killer (NK)-Zellen, sowie einer anti-angiogenetischen Wirkung gefördert. Diese Eigenschaften haben IL-12 zu einem potentiell vielversprechenden Krebs-Therapeutikum gemacht. Klinische Phase I/II Studien mit rekombinantem IL-12 mussten jedoch aufgrund der schwerwiegenden Toxizität mit zwei Todesfällen abgebrochen werden. In den hier vorgestellten Studien wird die Applikation von IL-12 kodierender Plasmid DNA zunächst bei der Maus, dann beim Schimmel und schliesslich beim Menschen untersucht. Intramuskuläre Applikation von IL-12 kodierender Plasmid DNA bei B16 Melanomen in der BL/6 Maus war protektiv gegen Metastasenbildung, zeigte jedoch keine Effekte auf bereits etablierte subkutane Tumoren. Demgegenüber induzierte die intratumorale Injektion von IL-12 kodierender DNA Tumorregression von etablierten Melanommetastasen sowie eine systemische Immunantwort mit Induktion von IFN- γ . Es zeigte sich sowohl eine Antitumorwirkung bei etablierten B16 Melanomen in der BL/6 Maus als auch bei etablierten humanen Melanomen in der Nacktmaus. Depletionsversuche in der Nacktmaus zeigten, dass diese Antitumorwirkung zum Teil über NK-Zellen vermittelt ist. Interessanterweise kam es jedoch auch in Abwesenheit von T- und NK-Zellen zu einer Tumorregression. Diese Regression konnte auf die anti-angiogenetische Wirkung von IL-12 zurückgeführt werden, da das Vaskularisierungsmuster in den behandelten Tumoren verändert war. Um bessere Aussagen über die Wirkung der IL-12 kodierenden Plasmid DNA bei dem natürlichen metastasierenden Melanom machen zu können, wurde eine Therapiestudie an einem neuen Tiermodell

untersucht - an Schimmeln, die an metastasiertem Melanom erkrankt waren. Auch bei diesen erkrankten Tieren führte die Injektion von humaner IL-12 kodierender Plasmid DNA zur Induktion von Interferon- γ und einer Rückbildung von Metastasen. In einer klinischen Studie mit intratumoraler Applikation von IL-12 kodierender Plasmid DNA bei 9 bereits stark vortherapierten Patienten mit metastasiertem Melanom zeigten sich ebenfalls Tumorregressionen. Hierbei konnte sowohl eine lokale Tumorregression (bei 7 von 9 Patienten) als auch ein systemisches Ansprechen beobachtet werden. Bei 4 Patienten kam es zu einer Regression von Fernmetastasen, bei 3 Patienten zu einem Gesamtansprechen (1 komplette Remission und 2 Stabilisierungen der Erkrankung). Immunologische Wirkungen mit einem Anstieg von IFN- γ im Serum und in injizierten Tumorknoten, einer lokalen Tumordinfiltration mit Lymphozyten und einem Anstieg der Tumorantigen-spezifischen Antikörper im Serum konnten ebenfalls dokumentiert werden.

IL-12 kodierende Plasmid DNA zeigte sowohl in allen untersuchten Tiermodellen als auch in einer klinischen Phase I/II Studie am Menschen Wirksamkeit bei etablierten Melanommetastasen sowie gute Verträglichkeit und erweitert damit grundlegend das Behandlungsspektrum in der Therapie des Melanoms. In Kombination mit anderen therapeutischen Ansätzen könnte die Wirksamkeit IL-12 kodierender Plasmid DNA synergistisch verstärkt werden. Darüberhinaus ist der Einsatz IL-12 kodierender Plasmid DNA auch in der Behandlung anderer Krebserkrankungen denkbar.

8. Verwendete Abkürzungen und Einheiten

APC	Antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsantigene
CTL	Cytotoxic T-lymphocytes, zytotoxische T-Lymphozyten
CR	Complete response; komplette Remission
DTIC	Dacarbazin
FDA	Food and Drug Administration
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible protein 10, Interferon-induzierbares Protein 10
Mig	Monokine induced by IFN- γ
mu IL-12	Murines Interleukin-12
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PD	Progressive disease ; Progressive Erkrankung
PR	Partial response; Partielle Remission
rIL-12	Rekombinantes Interleukin-12
SD	Stable disease; Stabilisierung der Erkrankung
Th	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den

.....
Dr. med. L. Heinzerling

Danksagung

Hiermit danke ich allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere

Prof. Wolfram Sterry

Prof. Torsten Zuberbier

Dr. Uwe Trefzer

Prof. Günter Burg

Prof. Reinhard Dummer

Prof. Karin Mölling

PD Dr. Jovan Pavlovic

PD Dr. Thomas Kündig

PD Dr. Sylke Gellrich

Prof. Hans-Dieter Volk

Dr. Guido Burbach

Für das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung möchte ich meinen Eltern danken.