

6. Erkenntnisse präklinischer Untersuchungen und klinische Ergebnisse

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. Cancer Gene Ther, 7:1557-1565.

In vorangegangenen Studien wurde bereits der anti-metastatische Effekt von IL-12 kodierender Plasmid DNA nach intramuskulärer Applikation bei B16-Melanom gezeigt. Dabei kam es nach Gabe von IL-12 Plasmid DNA in den behandelten Mäusen zu einer signifikant verringerten Metastasenentwicklung. Ziel dieser Arbeit war es den Wirkungsmechanismus der Plasmid DNA, die für beide Untereinheiten des Heterodimers IL-12 kodiert, zu untersuchen.

Ein anti-metastatischer Effekt auf B16 Melanometastasen konnte festgestellt werden, wenn die IL-12 kodierende Plasmid DNA mehr als 10 Tage vor der Tumorzellapplikation intramuskulär verabreicht wurde. Nach der Injektion konnte eine langanhaltende IL-12 Expression im Serum über mehr als 50 Tage mit einem Maximalwert von 35 ng/ml an Tag 20 gemessen werden. Dieser Effekt war abhängig vom Mausstamm, so wurde er z. B. in Balb/c Mäusen nicht beobachtet.

Die in der IL-12 kodierenden Plasmid DNA enthaltenen immunstimulatorischen CpG Oligodeoxynucleotide konnten diesen Effekt nicht erklären, da diese eine nur wenige Stunden andauernde IL-12 Ausschüttung induzieren. Andere Zytokine wie Interferon- γ wurden ebenfalls induziert, während es bei IL-4 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α zu keinen messbaren Anstiegen kam. Der molekulare Wirkmechanismus wurde mittels IFN- γ Rezeptor-defizienter Mäuse, sowie durch Depletion von NK-Zellen in C57BL/6-Mäusen untersucht. Nur bei der NK-Zell-depletierten Gruppe zeigte sich der Effekt einer andauernden IL-12 Expression nicht. Die langanhaltende IL-12 Expression wurde auf einen positives autokrines Feed-back von Plasmid-exprimiertem IL-12 auf die natürliche IL-12 Ausschüttung zurückgeführt, da die Injektion von Plasmid DNA für humanes IL-12, welches nicht mit dem murinen Zytokinnetzwerk interagiert, nur zu einer schwachen und kurzdauernden IL-12 Expression führte.

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. Exp Dermatol, 11:232-240.

Plasmid DNA, die für murines IL-12 kodiert, verhindert die Entstehung von B16-Melanommetastasen, wenn die DNA intramuskulär appliziert wird. In dieser Arbeit wurde der direkte Antitumoreffekt von IL-12 kodierender DNA auf bestehende Melanome *in vivo* in zwei Tiermodellen untersucht, dem B-16 Melanom in C57BL/6 Mäusen und humanen Melanomen in Nacktmäusen.

Im Gegensatz zur intramuskulären Applikation von IL-12 kodierender Plasmid DNA und anderen Behandlungsoptionen, die keinen Antitumoreffekt auf bereits etablierte B16-Melanome zeigen, führte die intratumorale Injektion von IL-12 kodierender DNA zu einer hochsignifikanten Wachstumsverzögerung von B16-Melanomen während es bei Mäusen, die mit Kontrollplasmid intratumoral injiziert wurden zu einem expansiven Tumorwachstum kam. Bei dem humanen Melanommodell induzierte die IL-12 kodierende Plasmid DNA eine Regression aller Tumoren mit einem vollständigen Verschwinden der Tumoren in 2 von 5 Tieren. Die DNA Behandlung verursachte keine Nebenwirkungen. In den Tieren, die mit Kontrollvektor behandelt wurden, wuchsen die Tumoren hingegen expansiv. Der therapeutische Effekt der DNA Injektionen wurde teilweise durch Natürliche Killer (NK)-Zellen vermittelt. Dies konnte mittels NK-Depletions-Experimenten gezeigt werden. Darüberhinaus konnte ein anti-angiogenetischer Effekt mit Endothelzellschwellung und Kaliberschwankungen der Gefäße in der histologischen Untersuchung gezeigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei intratumoraler IL-12 kodierender Plasmid DNA um eine potentiell vielversprechende Therapie für etablierte Melanommetastasen handelt.

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. Exp Dermatol, 13:380-390.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-12 kodierende DNA einen Einfluss auf die Gefäßneubildung hat und dieser Effekt möglicherweise über Interferon- γ inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10) vermittelt ist. In dieser Arbeit wurde der Antitumoreffekt und der anti-metastatische Effekt von IP-10 kodierender Plasmid DNA auf Melanome und Lewis Lungenkarzinome untersucht.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass DNA, die für das murine IP-10 kodiert, einen Antitumor- und anti-metastatischen Effekt besitzt. Intratumorale, nicht aber intramuskuläre Injektion von IP-10 kodierender Plasmid DNA induzierte Tumorregression von Melanomen (B16F10) und Lewis Lungenkarzinomen (LL/2) in C57BL/6 Mäusen. Intramuskuläre Applikation von IP-10 kodierender Plasmid DNA verhinderte die Absiedelung von B16-Melanommetastasen. Im Gegensatz zum Antitumoreffekt wurde der anti-metastatische Effekt vor allem durch NK-Zellen vermittelt. Im Vergleich zu DNA, die für IL-12 kodierte, zeigte sich bei der intratumoralen Applikation von IP-10 kodierender DNA ein geringerer Effekt gegen etablierte subkutane Melanome. Bei dem anti-metastatischen Effekt gegenüber Lewis Lungenkarzinomen und Melanommetastasen bestand Äquivalenz in der Wirksamkeit zwischen IP-10 und IL-12 kodierender DNA. Eine Kombinationsbehandlung IL-12 kodierender DNA mit IP-10 kodierender DNA verstärkte die anti-metastatische Aktivität von IL-12 im Lungenmetastasenmodell, zeigte aber keinen zusätzlichen Effekt bei der lokalen Behandlung etablierter subkutaner Melanome und anderer Tumore. Interessanterweise konnte bei der IP-10 oder IL-12 Plasmid Behandlung von Nacktmäusen ohne funktionale T-Lymphozyten ebenfalls Wirksamkeit dokumentiert werden mit Verringerung des Tumorwachstums und verringerter Absiedelung von Metastasen.

6.4 Intratumorale Injektion von humaner Interleukin-12 kodierender DNA induziert Tumorregression von Melanometastasen 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. J Mol Med, 78:692-702.

Präklinische Studien zur Therapie des malignen Melanoms werden gegenwärtig in verschiedenen Mausmodellen durchgeführt. Diese Modelle sind jedoch weit davon entfernt die echte Erkrankung beim Menschen abzubilden.

In dieser Arbeit wird der Schimmel als neues Tiermodell für die Melanomforschung beschrieben. Diese Pferde entwickeln spontan Melanome, deren Krankheitsverlauf dem beim Menschen sehr ähnlich ist und damit eine hohe Relevanz für präklinische Studien neuer immuntherapeutischer Protokolle hat. Ähnlich wie beim Menschen metastasieren die Melanome in Lymphknoten, den Gastrointestinaltrakt, Leber, Lunge und das Gehirn.

Da bei den Zytokinen Speziesdifferenzen bekannt sind, wurde zunächst unter anderem durch Messung der Induktion von IFN- γ nach Stimulation mit humanem IL-12 untersucht, ob humanes IL-12 im Pferd wirksam ist. Daran schloss sich die Untersuchung der Antitumorwirkung von IL-12 kodierender Plasmid DNA im Vergleich zum reversen IL-12 Plasmid in diesem natürlichen Tumormodell. In der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Injektion von IL-12 kodierender Plasmid DNA in etablierte Metastasen zu einer signifikanten Regression aller 12 behandelten Tumoren führte (n=7 Pferde). Ein vollständiges rezidivfreies Verschwinden über einen Zeitraum von 6 Monaten wurde in einem Fall beobachtet. Bei der Applikation des Kontrollplasmids mit dem nicht-kodierenden reversen IL-12 wurde ein geringer Effekt beobachtet, der auf die unspezifische Immunstimulation durch die in der IL-12 DNA enthaltenen immunstimulatorischen CpG-Sequenzen zurückgeführt wird. Bei dem leeren Kontrollplasmid kam es zu einem Wachstum der Metastasen. Diese Ergebnisse zeigen die Wirksamkeit und Verträglichkeit von IL-12 Plasmid DNA Therapie bei Tumorerkrankung in einem Grosstiermodell.

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. Hum Gene Ther, 16(1):35-48.

Die Wirksamkeit und Verträglichkeit konnte in verschiedenen präklinischen Studien bei Melanom in Mäusen und Schimmeln gezeigt werden. In diesen Studien wurde kein Anhalt für Toxizität gefunden, daher konnte die klinische open label Phase I/II Studie unter Verwendung von humaner IL-12 kodierender Plasmid DNA begonnen werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde die unter Bedingungen der Good Medical Practice (GMP) hergestellte IL-12 kodierende Plasmid DNA bei neun Patienten mit metastasierendem Melanom (Stadium IV) intratumoral injiziert. Bei den Patienten war es trotz Behandlung mit Standardtherapien und Nicht-Standardtherapien zu einem Fortschreiten der Erkrankung gekommen. Die DNA wurde in 4-wöchigen Zyklen verabreicht, drei Injektionen pro Zyklus und bis zu sieben Zyklen. Bei jedem der Patienten wurde die Dosis im Laufe der individuellen Behandlung gesteigert. Zusätzlich gab es drei Therapiearme mit niedriger, mittlerer und hoher Anfangsdosis, wobei die Maximaldosis pro Injektion 1 mg Plasmid DNA betrug. Die Therapie wurde sehr gut vertragen. Drei der neun Patienten zeigten ein klinisches Ansprechen (zwei Stabilisierungen der Erkrankung (SD), 1 komplette Remission (CR)). Ein Patient, der eine niedrige Dosis DNA erhielt, erfuhr eine langanhaltende Stabilisierung der Erkrankung über mehr als drei Jahre, während die zwei anderen Responder hohe Dosen von DNA erhielten. Alle außer zwei Patienten zeigten ein lokales Ansprechen des injizierten Tumors. In der Immunhistochemie der Tumorbiopsien zeigte sich eine Reduktion der neugebildeten Gefäße sowie Lymphozyteninfiltrate. Mittels RT-PCR ließ sich weiterhin ein Anstieg von IL-12, IP-10 und IFN- γ in den Gewebeproben nachweisen. Die Serumwerte der Zytokine zeigten Schwankungen. Diese Arbeit zeigt, dass die intratumorale Injektion von Zytokin-kodierender DNA sicher und wirksam ist und als Therapie oder Adjuvans in der Krebsbehandlung eingesetzt werden kann.