

7. Diskussion

Unsere präklinischen Studien waren die Basis für die weltweit erste klinische Studie, die die Wirksamkeit von IL-12 kodierender Plasmid DNA bei Krebspatienten belegen konnte. In den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-12 kodierende Plasmid DNA zur Regression von etablierten Melanomen in der Maus, im Schimmel und im Menschen führt, wobei die Therapie in allen Spezies sehr gut verträglich war. Basierend auf den präklinischen Ergebnissen wurde eine Phase I/II Studie bei neun Patienten mit fortgeschrittenem metastasierten Melanom (Stadium IV) mit intratumoraler IL-12 DNA Therapie durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die IL-12 DNA Applikation bis zu den höchsten Dosen von 1 mg pro Injektion gut verträglich war. Neben der sehr guten lokalen Wirkung, konnte bei einigen der behandelten Patienten eine systemische Wirkung beobachtet werden, die zum Rückgang von Fernmetastasen führte. Unsere Studie konnte als erste zeigen, dass die kodierenden Sequenzen der nichtverpackten DNA beim Menschen zur Expression des Proteins führen. Trotz Fluktuationen der IL-12 und IFN- γ Konzentrationen im Serum mit Maximalwerten von bis zu 90 pg/ml IL-12 und 300 U/ml IFN- γ , kam es zu keinen nennenswerten systemischen Nebenwirkungen. Unsere Studie dokumentiert somit, dass der Einsatz von Plasmid DNA, der lange Zeit nur bei Nagetieren als wirksam galt (114), auch beim Menschen wirksam ist. Die intratumoralen Injektionen von IL-12 kodierender Plasmid DNA zeigten im Gegensatz zur intratumoralen Applikation von rekombinantem IL-12 keine Toxizität (118). Durch diese sehr gute Verträglichkeit stellt die IL-12 Plasmid DNA Therapie eine sehr attraktive potentielle Therapieoption dar.

Klinische Wirksamkeit von IL-12 kodierender Plasmid DNA

Das klinische Ansprechen im Rahmen dieser Dosisfindungsstudie mit sehr niedrigen Anfangsdosierungen (50 μ g Plasmid DNA) bei Melanompatienten nach multiplen Vorbehandlungen mit verschiedenen Standardtherapien (Operation, Chemotherapie, Radiotherapie) und anderen experimentellen Protokollen sowie einer hohen Gesamttumorlast war überraschend ausgeprägt. Alle bis auf zwei injizierte Metastasen zeigten eine lokale Antwort. Ein Patient zeigte eine komplette

Regression, so dass eine Fußamputation bei ausgedehnter Metastasierung umgangen werden konnte, zwei weitere Patienten zeigten eine Stabilisierung der Erkrankung. Einige Patienten zeigten regionale Wirksamkeit in den drainierenden Lymphknotenmetastasen und bei vier Patienten zeigte sich eine Rückbildung von Fernmetastasen. Die hier beobachtete Antitumorwirkung geht weit über die in neueren Studien mit rekombinantem IL-12 oder viralen Vektoren beobachtete Wirkung hinaus. Erst vor kurzem publiziert wurde eine Studie unter Verwendung von Canarypoxvirus, welches IL-12 kodiert, und ebenfalls intratumoral bei Melanompatienten injiziert wurde. Hierbei zeigte sich nur bei einem von neun Patienten eine Regression der injizierten subkutanen Metastase sowie der In-transit-Metastasen (117). Bei der Studie mit rekombinantem IL-12 beobachtete man bei einem von sieben Patienten eine partielle Remission, allerdings bei weit ausgeprägteren Nebenwirkungen (116). In unserer Studie waren keine nennenswerten Nebenwirkungen aufgetreten.

IL-12 kodierende Plasmid DNA induziert IFN- γ in vivo, führt zu einer Tumorinfiltration durch Lymphozyten und zu einer veränderten Tumorangiogenese

Bezüglich des Wirkmechanismus der IL-12 DNA Therapie zeigten sich immunologische Veränderungen im Sinne einer Induktion von Zytokinen, wie z. B. IFN- γ , und einer Infiltration der Metastasen mit Lymphozyten. Das Muster der Vaskularisierung in den Metastasen änderte sich und zeigte sich mit thrombosierten Gefäßen, Fibrosierung der Gefäßwände sowie einer Verminderung der Gefäßdichte. Diese Wirkungen der Injektion von IL-12 kodierender Plasmid DNA können auf die endogene IL-12 Produktion mit langanhaltender Expression und auf die Induktion von IFN- γ und IP-10 in den Metastasen, die wir mittels RT-PCR nachwiesen, zurückgeführt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Effekten, die wir in präklinischen Arbeiten bereits zeigen konnten (115, 119). IFN- γ könnte wiederum die Tumorregression induziert haben, da IFN- γ eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr durch Aktivierung von Effektorzellen wie T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, der Induktion weiterer Mediatoren, wie IP-10 oder Monokine induced by IFN- γ (Mig), sowie eines direkten Einflusses auf die Tumorzellen durch z. B. Hochregulation von MHC-Molekülen spielt (120, 121). In

Übereinstimmung mit präklinischen Ergebnissen anderer Gruppen (122) und unseren eigenen (53, 115, 123, 124) zeigten sich in unserer klinischen Studie anti-angiogenetische Effekte der Therapie mit IL-12 kodierender Plasmid DNA, die ebenfalls zur Antitumorwirkung beitragen. Diese Effekte werden zum Teil durch IP-10 vermittelt (125). Dies bestätigt Studien, in denen die durch IL-12 induzierten Chemokine Mig und IP-10 anti-angiogenetische Wirksamkeit zeigten (55, 126).

Intratumorale Applikation zeigt systemische Wirksamkeit

Da die Relevanz des lokalen Zytokinmilieus am Ort der Induktion einer Immunantwort gezeigt wurde (127), wurde neben der subkutanen (101, 128) und intravenösen Gabe von rekombinanten IL-12 (101, 116, 128, 129) inzwischen in neueren Studien auch die intratumorale IL-12 Applikation untersucht, wie z. B. als rekombinantes Protein zur Therapie bei Kopf und Hals-Karzinom (118). In präklinischen Studien war bereits eine Überlegenheit der intratumoralen Applikation für IL-12 Plasmid DNA (123) und IL-12 in langsam freisetzender Applikationsform als Microsphaeren (130) gezeigt worden. Dabei konnte deutlich die Induktion einer systemischen Immunantwort nach lokaler Applikation von IL-12 dokumentiert werden (130). Auch in unserer Studie mit intratumoral injizierter IL-12 kodierender Plasmid DNA konnten wir gute Wirkung sowohl lokal als auch systemisch bei guter Verträglichkeit beobachten. So ging der Antitumoreffekt über die injizierten Metastasen hinaus mit Wirkung unter anderem auf Lymphknotenmetastasen und vereinzelt Fernmetastasen. Bei einem der Patienten mit Rückgang von Fernmetastasen wurde die systemische Immunantwort auch durch den Nachweis einer Antikörperantwort gegenüber tumorassoziierten Antigenen bestätigt. Das Auftreten von toxischen Nebenwirkungen bei systemischer Therapie mit rekombinantem IL-12 vor dem Erreichen von wirksamen lokalen Konzentrationen am Tumor könnte eine stärkere Wirksamkeit von rekombinantem IL-12 verhindert haben (60, 98). Die durch die lokale Applikation geringeren Serumspiegel (127) bedingen hingegen eine bessere Verträglichkeit dieser Applikationsform. Da in unserer Studie bei der lokalen Applikation bereits geringe Dosen einen guten Antitumoreffekt induzierten, konnten die Nebenwirkungen ganz wesentlich reduziert werden. Bei der lokalen Applikation ist hierbei die langanhaltende

Zytokinfreisetzung, wie sie durch einmalige Plasmid DNA Injektion erreicht wird, der einmaligen Behandlung mit rekombinantem Protein hinsichtlich der Antitumorwirkung überlegen (130).

IL-12 kodierende Plasmid DNA ist sehr gut verträglich

Die Therapie mit der IL-12 kodierenden Plasmid DNA war sehr gut verträglich. Die Nebenwirkungen beschränkten sich auf leichte Symptome am Ort der Injektion wie Spannungsgefühl und auf einen diskreten diffusen Haarausfall bei zwei von neun Patienten. Dies steht völlig im Gegensatz zu den Studien mit rekombinanten IL-12, in welchen von gravierender Toxizität berichtet wurde (56, 101, 131). Die subkutane Applikation zeigte ähnliche Nebenwirkung wie die intravenöse (98, 100). Nach schwersten Nebenwirkungen und zwei Todesfällen im Rahmen einer Phase II Studie mit rekombinantem IL-12 wurde durch intensive Untersuchungen die Relevanz der Applikation einer Prädosierung evident (60). Inzwischen wurden die Protokolle entsprechend adaptiert. Die subkutane Gabe von rekombinantem IL-12 bei Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom oder Melanom zeigte trotzdem sehr viel stärkere dosislimitierende Nebenwirkungen (Hepatotoxizität, Neutropenie und Leukopenie; (116)), als die Applikation von IL-12 kodierender Plasmid DNA. Bei einer Studie mit intratumoraler Anwendung von IL-12 exprimierenden Adenoviren, bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren traten Abgeschlagenheit, Fieber, Lymphopenie und Nachtschweiß auf (132). Diese Symptome wurden auf das Vektorsystem zurückgeführt, da sie sich bei Folgeinjektionen verstärkten (132). Dosislimitierende Toxizitäten wurden bei dieser Studie in Übereinstimmung mit unserer Untersuchung nicht beobachtet. Bei der Studie mit IL-12 exprimierenden Canarypoxvirus, welches ebenfalls intratumoral bei Melanompatienten injiziert wurde, traten Nebenwirkungen wie Schüttelfrost, Muskelschmerzen und Abgeschlagenheit auf. Darüberhinaus entwickelten die Patienten neutralisierende IgG-Antikörper gegen das Canarypoxvirus (117). Erste Berichte einer jetzt angelaufenen Studie mit IL-12 kodierendem Semliki forest virus bei Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom oder Melanom zeigten bei IL-12 Spiegeln von bis zu den 10-fachen Normalwerten Juckreiz, grippeähnliche Symptome, Fieber und Hautausschläge (133). In den Ergebnissen einer präklinischen Toxizitätsstudie, die

nach Abschluss unserer klinischen Studie veröffentlicht wurde, zeigte sich in Übereinstimmung mit unseren Toxizitätsuntersuchungen beim Schimmel exzellente Verträglichkeit von IL-12 Plasmid DNA bei Affen (134). Die Therapie mit IL-12 kodierender Plasmid DNA im Menschen war hervorragend verträglich. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da sowohl die Therapie mit rekombinantem Protein als auch mit viralen Vektorsystemen stark mit Nebenwirkungen behaftet ist.

Zusammenfassend stellt die Therapie mit IL-12 kodierender DNA aufgrund ihrer guten Wirkung und überlegenen Verträglichkeit einen hoffnungsvollen Therapieansatz für die Tumorthherapie dar. Dabei könnte IL-12 DNA auch in Kombination mit Antigen-spezifischer Immuntherapie eingesetzt werden. Hierzu sind weitere Studien notwendig. Der Einsatz bei anderen Krebserkrankungen, wie z. B. dem kutanen Lymphom, wo es als rekombinantes Protein bereits erprobt wurde (135), ist eine potentiell sehr attraktive Indikation. Hierzu ist eine klinische Phase I/II Studie bereits in der Planung.