

2. Einleitung

Das maligne Melanom ist eine Tumorerkrankung mit steigender Inzidenz. Seit Mitte der sechziger Jahre ist die Inzidenz in der kaukasischen Bevölkerung pro Jahr um 3-8% angestiegen (1). Zu den Risikofaktoren zählt UV-Licht, welches mutagen auf die DNA wirkt, Zellen in der Haut zur Bildung von Wachstumsfaktoren anregt, die Bildung radikaler Sauerstoffmoleküle hervorruft sowie die lokale Immunabwehr reduziert (2). Weitere Risikofaktoren stellen das Vorhandensein multipler Nävi (3) sowie eine positive Familienanamnese dar (4). Vor allem junge Menschen sind mit einer hohen durchschnittlichen Lebenszeiteinbusse von 18,6 Jahren pro am Melanom Verstorbenen von dieser Tumorerkrankung betroffen (5). Der Rückgang der Sterblichkeit trotz steigender Inzidenz von Melanomen ist hauptsächlich auf die verbesserte Früherkennung zurückzuführen (6). Durch frühere Erkennung der Primärtumoren konnte die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt auf über 85% gesteigert werden (7). Ein wichtiger Baustein in der medizinischen Betreuung ist deshalb die Primärprävention, also die Senkung des Risikoverhaltens, und die Sekundärprävention, mit einer Verbesserung der Früherkennung (8, 9). Die Prognose bei Diagnosestellung hängt nämlich vor allem von der Tumordicke und dem Vorhandensein von Metastasen ab. Weitere Einflussgrößen sind Geschlecht und Alter des Patienten, sowie Ulzeration, Mitoserate und das Vorhandensein von Regressionszonen beim Primärtumor. Die einzige Therapie, die in der adjuvanten Behandlung von Melanompatienten, also von Patienten ohne Fernmetastasen, bisher eine Verbesserung der Überlebenszeit zeigen konnte, ist Interferon- α (IFN- α) (10, 11). Patienten mit Metastasen der Haut, der Subkutis oder der Lymphknoten haben eine mediane Überlebenszeit von 12 Monaten, bei Patienten mit viszeralen Fernmetastasen beträgt diese nur etwa 5 Monate (12). Weniger als 5% der Patienten mit Fernmetastasen überleben länger als 5 Jahre (13, 14). Bei metastasierender Erkrankung steht jedoch immer noch keine kurative oder überlebensverlängernde Therapie zur Verfügung (15).

3. Therapie des metastasierenden Melanoms

Die Therapie des Melanoms erfolgt entsprechend dem Tumorstadium (Tab. 1). Deshalb soll zunächst ein kurzer Überblick über die Ausbreitung dieses Tumors und der Einteilung in Stadien gegeben werden, um dann auf die Therapieoptionen einzugehen.

Das Melanom wächst zunächst in der Epidermis (In situ Melanom) und kann per continuitatem fortschreiten oder In-transit-Metastasen bilden (> 2 cm Entfernung zum Primärtumor). Wird die Basalmembran durchbrochen, kann eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung erfolgen. Bei der hämatogenen Metastasierung erfolgt die Absiedelung von Metastasen am häufigsten in der Lunge, der Leber, der Haut, den Knochen und dem Gehirn. Im Stadium des lokalen Tumors (Stadium I/II) erfolgt die Exzision mit entsprechendem Sicherheitsabstand (In situ Melanom: 0,5 cm; bis 2 mm Tumordicke nach Breslow: 1 cm und > 2 mm Tumordicke nach Breslow: 2 cm Sicherheitsabstand). In einzelnen Fällen wie bei älteren Patienten beim Lentigo maligna Melanom in ungünstiger Tumorlokalisation z. B. im Gesichtsbereich kann mit Strahlentherapie behandelt werden. Bei Melanompatienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko (Tumordicke >1,5 mm; Stadium I/II) sollte eine adjuvante Therapie mit niedrigdosiertem IFN- α angeboten werden (16, 17). Ab einer Tumordicke von 1 mm wird zusätzlich eine Wächterlymphknotenbiopsie zur Detektion von Mikrometastasen empfohlen (18). Werden Mikrometastasen gefunden, soll eine Ausräumung der Lymphknotenstation durchgeführt werden (19). Sind die Lymphknoten bereits klinisch befallen (Stadium III), stellt die Lymphadenektomie die Standardtherapie dar (20). Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasierung konnte in einzelnen Studien ein Überlebensvorteil bei adjuvanter Therapie mit IFN- α gezeigt werden (11).

In der Therapie des Melanoms mit Fernmetastasen (Stadium IV) steht die operative Therapie von Metastasen, die Radiotherapie, oder die systemische Chemo- oder Immuntherapie zur Verfügung. Es gibt keine randomisierten kontrollierten Studien, die für ein Medikament oder eine Kombination von Medikamenten einen Überlebensvorteil bei Melanompatienten mit Fernmetastasen zeigen (21). Daher steht im Vordergrund, eine Rückbildung der Tumoren zu erreichen, um so die

beschwerdefreie Zeit zu verlängern oder die Beschwerdesymptomatik zu lindern (18).

Tab. 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms; adaptiert nach Balch et al. (13)

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknoten-metastasen (N)	Fern-metastasen (M)	Therapie
0	In situ Melanom	Keine	keine	Exzision
I	<ul style="list-style-type: none"> • Bis 2,0 mm ohne Ulzeration • Bis 1,0 mm mit Ulzeration 	Keine	keine	Exzision + ggf. niedrigdosiertes IFN- α
II	<ul style="list-style-type: none"> • > 2,0 mm ohne Ulzeration • > 1,0 mm mit Ulzeration 	Keine	keine	Exzision + ggf. niedrigdosiertes IFN- α
III		Regionäre Lymphknoten-metastasen	keine	Exzision, Lymphadenektomie + bei inkompletter Resektion ggf. Nachbestrahlung + ggf. hoch- oder niedrigdosiertes IFN- α
IV			Fern-metastasen	Chemotherapie, ggf. operative Therapie, Radiotherapie

Im Folgenden wird kurz auf die einzelnen Behandlungsoptionen beim Melanom mit Fernmetastasierung (Stadium IV) eingegangen. Eine lokale Tumorkontrolle kann mit der operativen Therapie und der Radiotherapie erreicht werden. Die operative Therapie wird eingesetzt, wenn die Metastasen komplett reseziert werden können, z. B. an der Haut oder in der Lunge (22). Ebenso können einzelne symptomatische Metastasen zur Verbesserung der Lebensqualität operativ entfernt werden, z. B. operable Hirnmetastasen oder Darmmetastasen bei Subileus (23). Da Melanomzellen strahlensensibel sind, können symptomatische Metastasen auch bestrahlt werden. Zur Behandlung einzelner Hirnmetastasen stellt die stereotaktische Behandlung mit dem Gamma-Knife eine gute Behandlungsoption dar (24). Bei multiplen Hirnmetastasen wird eine Ganzhirnbestrahlung empfohlen (25). Knochenmetastasen sprechen ebenfalls gut auf Bestrahlung an (26).

Bei den systemischen Therapien steht die Chemotherapie, eine Kombination von Chemotherapie mit Immuntherapie (Chemoimmuntherapie) und verschiedene Immuntherapien zur Verfügung. Dacarbazin (DTIC) ist die am besten untersuchte Monochemotherapie und zeigt in 5,3-28,6% eine Rückbildung der Tumormassen um mehr als 50%, was einer partiellen Remission (PR) entspricht (27, 28). Komplette Remissionen (CR) werden in bis zu 8% der Patienten erzielt, halten jedoch meistens nur kurz an (3-6 Monate) und werden vorwiegend bei Patienten mit subkutanen oder Lymphknotenmetastasen beobachtet (28). DTIC ist weiterhin die einzige beim Melanom zugelassene Chemotherapie. In keiner Studie wurde bisher die Überlegenheit anderer Chemotherapien wie mit dem Vincaalkaloid Vindesin (29) oder dem oral verfügbaren Temozolomid (30), einer Immuntherapie mit IFN- α und Interleukin-2 (IL-2; (31), oder einer Chemoimmuntherapie mit Cisplatin, Vinblastin, DTIC, IFN- α und IL-2 (32) gegenüber DTIC alleine gezeigt (27, 33). Bei Hirnmetastasen kann alternativ zum DTIC Temozolomid oder Fotemustin eingesetzt werden, da diese Substanzen besser ins Gehirn penetrieren. Temozolomid ist ein oral verabreichbares Alkylans mit vergleichbarer Ansprechrate, welches liquorgängig ist (34). Fotemustin, ein Nitrosoharnstoff, ist ein ebenfalls wirksames liquorgängiges Präparat (35).

Bei den Immuntherapien ist IL-2 in den USA bei Stadium IV Melanom zugelassen und führt bei etwa 6% der Patienten zu einer anhaltenden Remission (36, 37). Allerdings gibt es keine Phase III Studien, die eine Überlegenheit gegenüber einfacher Chemotherapie zeigen. Durch eine Kombination verschiedener Chemo- und Immuntherapeutika lässt sich eine Steigerung der objektiven Ansprechraten erzielen. Eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit wird jedoch nicht erreicht und die Toxizität ist erheblich höher. In Pilotstudien wurden weitere Immuntherapien untersucht, bisher jedoch nicht in prospektiv-randomisierten Studien erprobt. Spezifische Immuntherapien wie Peptid-Vakzinierung, Vakzinierung mit dendritischen Zellen und adoptiver Transfer von T-Zellen oder unspezifische Immuntherapien konnten bei wenigen Patienten eine Tumorrückbildung induzieren (38-43). Bei den spezifischen Immuntherapien spielt vor allem die Vakzinierung gegen tumorassoziierte Antigene wie z. B. Melan-A/MART-1 oder Tyrosinase eine Rolle (44). In einigen Untersuchungen erfolgte eine Kombination mit Zytokinen als

Adjuvantien, wie Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) oder IL-2 (45). Andere laufende Studien befassen sich mit der Wirkung von Molekülen, die die Proteinexpression verändern (z. B. BCL-2 antisense Moleküle, Histon Deacetylase Inhibitoren), in die Signaltransduktion eingreifen (Raf-Kinase Inhibitoren), immunmodulatorisch und anti-angiogenetisch wirken wie die Thalidomid-Analoga oder an Adhäsionsmoleküle binden (Antikörper gegen alpha V beta 3 integrin; (46)).

Die Therapie mit IL-12 kodierender Plasmid DNA ist ein neuer Behandlungsansatz für das Melanom, der in den hier vorgestellten Arbeiten untersucht wurde. Zunächst soll ein Überblick über die immunologischen Effekte von IL-12 und Ergebnisse vorangegangener präklinischer und klinischer Studien gegeben werden.

4. Interleukin-12 (IL-12)

4.1 Immunologische Wirkung

Das Heterodimer Interleukin-12 (IL-12) ist ein Schlüsselmediator sowohl der angeborenen als auch der zellulären Immunität und besteht aus zwei Untereinheiten, p40 und p35 (47). Dieses Zytokin induziert die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen zu T-Helfer 1 (Th1) Zellen und die Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) (48). Zusätzlich erhöht es die Aktivität natürlicher Killer (NK)-Zellen (49) und zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) (50). IL-12 verbessert die Tumorerkennung durch Induktion von HLA-Klasse-I- und -II-Molekülen und des Zelladhäsionsmoleküles Intercellular Adhesion Molecule-I (ICAM-I) auf Melanomzellen. Schließlich hat IL-12 anti-angiogenetische Wirkung (51-54). Diese Wirkung wird zum Teil durch den durch IL-12 induzierten Mediator IFN- γ sowie IFN-induzierbares Protein (IP-10) vermittelt (55).

IL-12 wird vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, Dendritischen Zellen) produziert, kann aber auch von anderen Zellen wie B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten und Mastzellen sezerniert werden (48). IL-12 wurde bereits als rekombinantes Protein bei Krebspatienten im Rahmen verschiedener Phase I und II Studien eingesetzt und zeigte Wirksamkeit

(56-59). Jedoch zeigte sich gleichzeitig schwerwiegende Toxizität mit zwei Todesfällen in einer Phase II Studie (60, 61).

4.2 Präklinische Studien zu Interleukin-12

Um einen Überblick über den Stand der Wissenschaft zur Therapie mit IL-12 zu gewinnen, wurden zu Beginn der hier vorgestellten Studien die Forschungsarbeiten zu IL-12 in der Krebstherapie zusammengestellt. In der präklinischen Anwendung wurde über den Einsatz von IL-12 (1) als Protein (rekombinantes IL-12, rIL-12), (2) in Form von IL-12 exprimierenden Zellen, (3) mittels IL-12 transfektierter viraler Vektoren und (4) als DNA berichtet. Die Untersuchungen dieser Applikationsformen werden im Folgenden in der Übersicht dargestellt.

4.2.1 Rekombinantes Interleukin-12

Rekombinantes murines IL-12 Protein (μ IL-12) wurde im Rahmen präklinischer Studien in verschiedenen Tumormodellen eingesetzt. Es wurde alleine und in Kombination mit anderen Zytokinen (Granulocyte colony stimulating factor, G-CSF, oder Monocyte colony stimulating factor, M-CSF) eingesetzt. Eine Übersicht der Studien liefert Tabelle 2.

Tab. 2: Übersicht über präklinische Studien mit Verwendung von rekombinantem murinen IL-12 (mu IL-12) in verschiedenen Tumormodellen, zum Teil in Kombination mit anderen Zytokinen wie Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) oder Monocyte colony stimulating factor (M-CSF).

Protein	Tumor	Tiermodell	Applikationsweg	Referenz
mu IL-12	B16F10 Melanom, Lungenmetastasen/ subkutane Tumoren M5076 Ovarialsarkom, Lebermetastasen/subkutane Tumoren RenCa Nierenzellkarzinom	C57BL/6 BALB/c Balb/c nude Mäuse	Intraperitoneal Intratumoral	Brunda 1993 (62)
mu IL-12	K1735 Melanom SCK Mammakarzinom	C3H/HeN A/J Mäuse	Intraperitoneal und einen Teil der Dosis subkutan	Coughlin 1995 (63)
mu IL-12	TSA Mamma-Adenokarzinom, IL-2 exprimierend	Balb/c Mäuse	Intraperitoneal	Vagliani 1996 (64)
mu IL-12 +/- M-CSF	B16 Melanom Lewis Lungenkarzinom Nierenzellkarzinom	C57BL/6 Mäuse	Intraperitoneal	Teicher 1996 (65)
mu IL-12 +/- G-CSF	B16 Melanom	C57BL/6 Mäuse	Intraperitoneal	Golab 1998 (66)
mu IL-12	K1735 Melanom SCK Mammakarzinom HKB Zelllinie	C3H/HeN A/J C57BL/6 Mäuse	Intraperitoneal	Kurzawa 1998 (67)
mu IL-12	SR Gliom, IL-2 exprimierend	B10 Mäuse	Intraperitoneal, intrazerebral	Kikuchi 1999 (68)

4.2.2. Interleukin-12 exprimierende Zellen

Um eine IL-12 Expression am Injektionsort zu erreichen und längeranhaltende Proteinspiegel zu induzieren, wurden Zellen so modifiziert, dass sie IL-12 exprimieren. Dies erfolgt durch Einbringung von DNA durch Viren (z. B. Retroviren, Vacciniaviren) oder mittels Plasmid DNA in eukaryotische Zellen, was als Transfektion bezeichnet wird. Die resultierenden mit IL-12 DNA transfektierten Tumorzellen bzw. mit IL-12 DNA transfektierten Fibroblasten wurden in präklinischen Studien eingesetzt. Nach Injektion exprimieren die so modifizierten Zellen in den Tieren IL-12 am Injektionsort. In den Tiermodellen wird zum einen die

Bildung von Tumoren durch die mit IL-12 transfektierten Tumorzellen im Vergleich von nicht transfektierten Tumorzellen untersucht. In anderen therapeutischen Ansätzen werden parallel zu der Injektion der Tumorzellen Fibroblasten, die entweder IL-12 transfektiert sind oder nicht IL-12 transfektiert sind, injiziert. Darüberhinaus werden in den Untersuchungen die IL-12 exprimierenden Zellen alleine, in Kombination mit Zytokinen wie dem Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) oder als Adjuvans in Kombination mit einer Tumorantigen-spezifischen Vakzinierung (humaner Folatrezeptor alpha) eingesetzt, um so die Wirkung zu steigern. Tabelle 3 liefert eine Übersicht über die präklinischen Studien unter Verwendung IL-12 exprimierender Zellen.

Tab. 3: Übersicht über präklinische Studien mit Verwendung von Zellen, die murines IL-12 (mu IL-12) exprimieren in verschiedenen Tumormodellen, zum Teil in Kombination mit anderen Zytokinen wie Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) oder Antigen (humaner Folatrezeptor-alpha, FR α). * indiziert, dass hier ein therapeutischer Ansatz untersucht wird.

Transfektierte Zellen	Kodierte Proteine	Tumor	Tiermodell	Applikationsweg	Referenz
3T3 Fibroblasten*	mu IL-12	BL-6 Melanom	C57BL/6 Mäuse	Subkutan	Tahara 1994 (69)
MCA 102 Sarkom MCA 207 Sarkom B16F10 Melanom TS/A Brustkrebs	mu IL-12	B16F10 Melanom MCA 102 Sarkom MCA 207 Sarkom TS/A Brustkrebs	C57BL/6 Mäuse	Peritumoral	Tahara 1995 (70)
NIH3T3 Fibroblasten*	mu IL-12	BL-6 Melanom	C57BL/6 Mäuse	Intradermal	Tahara 1996 (71)
MCA 101 Fibrosarkom PAN 02 Pankreastumor	mu IL-12	MCA 101 Fibro- sarkom PAN 02 Pankreastumor	C3HBA Mäuse	Subkutan	Meko 1996 (72)
D122 Klon des Lewis Lungen- karzinoms	mu IL-12	D122 Lewis Lungenkarzinom	C57BL/6 Mäuse	Intraperitoneal	Popovic 1998 (73)
D5 Klon des B16 Melanoms	mu IL-12 +/- GM-CSF	B16 Melanom	B6 Mäuse	Intravenös	Aruga 1999 (74)
3T3 Fibroblasten*	mu IL-12	C26 Kolon- Adenokarzinom	Balb/c Mäuse	Intradermal	Matsumoto 1999 (75)
C26 Kolon Adenokarzinom	mu IL-12 + Antigen (humaner Folatrezeptor alpha- FR α)	CD26 Kolon- Adenokarzinom, das FR α exprimiert, Lungen- metastasen	BALB-c/ cnAnCr Mäuse	Subkutan	Rodolfo 1999 (76)

4.2.3. Interleukin-12 transfektierte virale Vektoren

Anstelle der *ex vivo* Transfektion kann DNA auch mittels viraler Vektorsysteme *in vivo* in Zellen eingebracht werden. Virale Vektoren, die die IL-12 kodierende DNA enthalten, können diese auf Zielzellen übertragen, was auch mit Transduktion bezeichnet wird. Unter den für IL-12 DNA untersuchten Vektorsystemen sind Vaccinia-, Adeno-, Semliki Forest und Herpes simplex Virus (Tab. 4). Virale Vektoren können sehr effizient Genmaterial übertragen, jedoch bestehen für sie eine Reihe anderer Probleme (77). So besteht z. B. bei retroviralen Vektoren durch die Integration die Gefahr der Mutation vorhandener kodierender Sequenzen in den Zielzellen. Weiterhin rufen die Virusantigene eine Immunantwort hervor, wie z. B. bei Adenoviren (78). Diese Immunantwort kann zum einen zu Nebenwirkungen bei wiederholten Injektionen führen, zum anderen eine effiziente Übertragung und Expression der kodierenden Sequenzen verhindern. Schliesslich ist die Menge an übertragenen Sequenzen limitiert und die Produktion und Aufbereitung der Viren sehr aufwendig (78).

Tab. 4: Übersicht über präklinische Studien mit Verwendung von murinem IL-12 (mu IL-12) in viralen Vektoren zur Tumortherapie, zum Teil in Kombination mit anderen Zytokinen (Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Lymphotactin, IL-2), costimulatorischen Molekülen (B7-1) oder tumorassoziertes Antigen (gp75).

Vektor	Kodierte Proteine	Tumor	Tiermodell	Applikationsweg	Referenz
Vacciniavirus	mu IL-12	MCA Sarkom	C57BL/6 Mäuse	Intratumoral	Meko 1995 (79)
Adenovirus	mu IL-12	Brustkrebs Adenokarzinom	FVB/n Mäuse	Intratumoral	Bramson 1996 (80)
Adenovirus	mu IL-12 +/- costimula- torisches Molekül (B 7-1)	Brustkrebs Adenokarzinom	FVB/n Mäuse	Intratumoral	Pützer 1997 (81)
Semliki Forest virus	mu IL-12	B16 Melanom	C57BL/6 Mäuse	Intratumoral	Asselin- Paturel 1998 (82)
Defective herpes simplex virus	mu IL-12	CT26 Kolonkarzinom	Balb/c Mäuse	Intratumoral	Toda 1998 (83)
Adenovirus	mu IL-12	RenCa Nierenzellkarzinom, Lebermetastasen	Balb/c Mäuse	Intravenös	Siders 1998 (84)
Adenovirus	mu IL-12 +/- IL-2	Brustkrebs Adenokarzinom	FVB/n Mäuse	Intratumoral	Addison 1998 (85)
Adenovirus	mu IL12	MC38 Adenokarzinom MCA 205 Fibrosarkom	C57BL/6 Mäuse	Intratumoral	Gambotto 1999 (86)
Adenovirus	mu IL-12 +/- Lymphotactin	Brustkrebs Adenokarzinom	FVB/n Mäuse	Intratumoral	Emtage 1999 (87)
Adenovirus	mu IL-12 +/- Antigen (gp75)	B16 Melanom, Lungenmetastasen	C57BL/6 Mäuse	Intraperitoneal	Hirschowitz 1999 (88)
Adenovirus	mu IL12	Neuro-2a Neuroblastom	A/J Mäuse	Intratumoral	Davidoff 1999 (89)
Adenovirus	mu IL12	CT26 Kolonkarzinom	Balb/c Mäuse	Intratumoral	Mazzolini 1999 (90)

4.2.4. Interleukin-12 kodierende DNA

Um die durch die viralen Proteine ausgelöste Immunantwort zu umgehen, stehen neben den viralen Vektorsystemen nicht-virale Vektorsysteme unter Verwendung von DNA zur Verfügung. In präklinischen Studien wurde die Applikation von DNA auf kleinen Goldpartikeln (Gene gun) oder von Lipid-verpackter DNA (Lipofektion) untersucht (Tab. 5). Vorteil der hier untersuchten Therapieoption war die wesentlich bessere Verträglichkeit die -im Gegensatz zur Therapie mit rekombinantem IL-12- nicht mit Gewichtsverlust, Splenomegalie oder Allgemeinsymptomen der Mäuse wie struppigem Fell und Lethargie assoziiert war (91).

Tab. 5: Übersicht über präklinische Studien mit Verwendung von IL-12 DNA zur Tumorthherapie

Applikations- methode	Kodierte Proteine	Tumor	Tiermodell	Applikations- weg	Referenz
Gene gun	mu IL-12	MethA Sarkom, intradermal P815 Mastrozytom, intradermal B16F10 Melanom, intradermal	Balb/c DBA/2 C57BL/6 Mäuse	Peritumoral	Rakhmilevich 1997 (92)
Gene gun	mu IL-12	EOMA Hämangio- endotheliom	129/J Mäuse	Peritumoral	Wang 1999 (93)
Gene gun	mu IL-12 + Antigen (E6)	Zervixkarzinom	Balb/c Mäuse	Intradermal	Tan 1999 (94)
Gene gun	mu IL-12	B16F10 Melanom MethA Sarkom P815 Mastrozytom	C56BL/6 Balb/c DBA/2 Mäuse	Intradermal	Rakhmilevich 1997 (91)
Polyvinyl polymerisches Vektorsystem	mu IL-12	CT26 Kolonkarzinom RenCa Nierenzellkarzinom	Balb/c Mäuse	Intramuskulär	Mendiratta 1999 (95)
DNA-lipid- Komplex	mu IL-12	RenCa Nierenzellkarzinom, Lungenmetastasen	Balb/c Mäuse	Intratracheal	Blezinger 1999 (96)

Die hier dargestellten Studien repräsentieren den Stand der Forschung zu Beginn der selbst durchgeführten Studien. Dies verdeutlicht die Bedeutung der eigenen Arbeiten zu diesem Zeitpunkt, da keine Arbeiten zu unverpackter Plasmid DNA publiziert waren.

4.3 Klinische Studien zu Interleukin-12

Im Bereich klinischer Studien wurde bisher der Einsatz von rekombinantem IL-12 und von IL-12 exprimierenden Zellen untersucht. Dabei wurden Daten zur Wirksamkeit bei verschiedenen Tumorerkrankungen und zur Verträglichkeit gewonnen. Als Plasmid DNA wurde IL-12 erstmalig in einer von uns durchgeführten klinischen Studie eingesetzt (97). Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über das Ansprechen auf die Therapie mit (1) rekombinantem IL-12 und (2) IL-12 exprimierenden Zellen gegeben und dann (3) auf die Verträglichkeit bzw. Toxizität dieser Therapieformen eingegangen.

Die zitierten Studien sind meist experimentelle Pilotstudien oder kleine Phase I/II Studien. Das Ansprechen im Rahmen klinischer Studien wird meist mittels der folgenden Kategorien angegeben: Komplette Remission (complete remission-CR), partielle Remission (partial remission-PR), Stabilisierung der Erkrankung (stable disease-SD) oder progressive Erkrankung (progressive disease-PD). Dabei ist die CR definiert als das klinische Verschwinden aller Tumormanifestationen, die PR als mindestens 50% Rückbildung der Tumormassen über einen bestimmten Zeitraum, die SD als weniger als 50% Rückgang und weniger als 25% Fortschreiten der Erkrankung. In einigen Studien wird darüberhinaus von ‚minor response‘ gesprochen, wenn es zu einem Rückgang von Metastasen kam, die aber nicht mehr als 50% der Gesamttumorlast erreichte. Als ‚mixed response‘ wird die gute Rückbildung mancher Metastasen bei gleichzeitigem Fortschreiten anderer Metastasen dokumentiert.

4.3.1 Wirksamkeit von rekombinantem Interleukin-12

Als rekombinantes Protein wurde IL-12 bei Krebspatienten in verschiedenen Phase I und II Studien eingesetzt (56, 57, 59, 98, 99). Die Ansprechraten der Studien zu rekombinantem IL-12 in der Krebstherapie variierten stark zwischen der verschiedenen Studien und sind in Tabelle 6 angegeben.

Tab. 6: Übersicht über klinische Studien mit Verwendung von rekombinantem humanem IL-12 bei Patienten mit Krebserkrankung und das Ansprechen auf die Therapie (CR=komplette Remission, PR=partielle Remission, SD=Stabilisierung der Erkrankung; Prozentzahlen stehen für das Gesamtansprechen, wenn nicht anders angegeben).

Tumor	Applikationsweg	Ansprechen (Prozent der Patienten mit Ansprechen)	Referenz
Metastasierendes Melanom (n=12) Nierenzellkarzinom (n=20) Kolonkrebs (n=5) Andere Krebsart (n=3) (Insgesamt n=40)	intravenös	1 PR (3%; Nierenzellkarzinompatient) und 1 transiente CR (3%; Melanompatient) - beide in nicht vorbehandelten Patienten; 4 SD (10%) Ansprechen Melanom: 8%	Atkins 1997 (98), Leonard 1997 (60)
Metastasierendes Melanom (n=10)	subkutan	3 ‚minor response‘ (30%)	Bajetta 1998 (59)
Nierenzellkarzinom (n=51)	subkutan	1 CR (2%) 34 SD (67%)	Motzer 1998 (56)
Nierenzellkarzinom (n=28)	subkutan	1 PR (4%) 7 SD (25%)	Portielje 1999 (100)
Nierenzellkarzinom (n=20) Metastasierendes Melanom (n=8) (Insgesamt n=28)	intravenös	2 PR (10%; Nierenzellkarzinompatient) 1 SD (5%; Nierenzellkarzinompatient) Ansprechen Melanom: 0%	Gollob 2000 (101)

4.3.2. Wirksamkeit von Interleukin-12 exprimierenden Zellen

Bei Melanompatienten wurden Studien mit IL-12 exprimierenden Fibroblasten bzw. IL-12 exprimierenden autologen Melanomzellen durchgeführt (102-105), während bei Patienten mit Brustkrebs oder Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals nur die

Therapie mit IL-12 exprimierenden Fibroblasten untersucht wurde (103, 105). In den Studien zeigten sich Tumorregressionen von injizierten Tumoren und Fernmetastasen (Tab. 7).

Tab. 7: Übersicht über klinische Studien mit Verwendung von humanen IL-12 exprimierenden Zellen bei Patienten mit Krebserkrankung und das Ansprechen auf die Therapie (SD=Stabilisierung der Erkrankung; Prozentzahlen stehen für Gesamtansprechen, wenn nicht anders angegeben).

Transfektierte Zellen	Tumor	Applikationsweg	Ansprechen (Prozent der Patienten mit Ansprechen)	Referenz
Fibroblasten	Metastasierendes Melanom Kopf und Hals, Karzinom Brustkrebs (Insgesamt n=32)	Intratumoral	Regression injizierter Läsionen, davon 3 Melanom-, 1 Kopf und Hals-Karzinom-, 2 Brustkrebs-Patienten (Ansprechen: 19%)	Lotze 1997 (103)
Autologe Melanomzellen	Metastasierendes Melanom (n=6)	Subkutan, in der Nähe der Lymphknoten	1 ‚minor response‘ (17%), 3 SD (50%)	Sun 1998 (104)
Fibroblasten	Metastasierendes Melanom (n=2) Kopf und Hals Karzinom (n=1) Brustkrebs (n=5) Sarkom (n=1) (Insgesamt n=9)	Peritumoral	Lokale Remission in 4 von 9 Patienten (1 Melanom-, 1 Kopf und Hals-Karzinom-, 2 Brustkrebspatienten; 44%); Ansprechen von Fernmetastasen bei 1 von 9 Patienten (11%; Melanompatient); Ansprechen Melanom: 1 von 2 (50%)	Kang 2001 (105)

4.3.3. Toxizität von rekombinantem Interleukin-12 und IL-12 exprimierenden Zellen

In Bezug auf die Verträglichkeit wurden bei den Studien unter Verwendung von rekombinantem IL-12 ausgeprägte Nebenwirkungen dokumentiert. Dosis-limitierende Nebenwirkungen bestanden vor allem in Fieber, Schüttelfrost und Abgeschlagenheit, transienter Myelosuppression, einer Erhöhung der Lebertransaminasen, neurologischen Nebenwirkungen, Blutdruckabfall, Arrhythmien und Niereninsuffizienz (Tab. 8; (98)).

Tab. 8: Übersicht über die Toxizität von rekombinantem IL-12 in klinischen Studien bei Patienten mit Krebserkrankung

Patienten	Dosis, Applikationsweg	Nebenwirkungen (Prozent der Patienten, bei denen Nebenwirkung beobachtet wurde)	Referenz
Fortgeschrittene Krebserkrankung (n = 40) 20 Patienten mit Nierenzellkarzinom 12 Patienten mit Melanom 5 Patienten mit Kolonkarzinom 3 Patienten mit anderer Krebserkrankung	Intravenöser Bolus 3 ng/kg 10 ng/kg 30 ng/kg 100 ng/kg 250 ng/kg 500 ng/kg 1000 ng/kg täglich über 5 Tage alle 3 Wochen, dosisescalierend	<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch: Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Stomatitis • Blutbild: Anämie, Neutropenie, Lymphopenie, Thromopenie, • Labor: Erhöhung von Transaminasen, Laktat-Dehydrogenase, alkalischer Phosphatase und Hyperbilirubinämie, Hypertriglyzeridämie, Hypoalbuminämie 	Atkins 1997 (58)
Wie oben	Wie oben	<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch: Fieber und Schüttelfrost • Blutbild: Lymphopenie 	Robertson 1999 (57)
Fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom (n=17)	Intravenös 500 ng/kg an 5 aufeinanderfolgenden Tagen ohne Prädosierung	<p>12 Hospitalisationen, davon 2 mit letalem Ausgang</p> <ul style="list-style-type: none"> • Klinisch: Müdigkeit (35%), Dyspnoe (29%), Stomatitis (24%), Azidose (18%), gastrointestinale Blutungen (12%) • Blutbild: Leukopenie (65%), Thrombopenie (24%) • Labor: Hyperbilirubinämie (47%), Erhöhung von Aspartat-Aminotransferase (47%), Alanin-Aminotransferase (35%), Kreatinin (18%) und alkalischer Phosphatase (12%) 	Leonard 1997 (60)
Metastasierendes Melanom (n=10)	Subkutan 0.5 µg/kg an den Tagen 1, 8 und 15 alle 28 Tage	<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch: Grippe-ähnliche Symptome mit Schüttelfrost, Müdigkeit und Gelenksbeschwerden (100%), Stomatitis (10%), Lungentoxizität mit Abnahme der Diffusionskapazität (20%) • Blutbild: Anämie (20%), Neutropenie und Thrombopenie (10%), Verringerung von CD8+, CD16+ Zellen • Labor: Erhöhung von Transaminasen und Laktat-Dehydrogenase (60%), Hypertriglyzeridämie (80%), Hyperfibrinogenämie (10%) 	Bajetta 1998 (59)
Fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom (n=51)	Subkutan 0.5 µg/kg 0.75 µg/kg 1.0 µg/kg 1.25 µg/kg 1.5 µg/kg 24 Patienten-feste Dosis 27 Patienten-Hochtitration	<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch: Fieber, Müdigkeit, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Husten, Übelkeit, Erbrechen, Lungentoxizität • Blutbild: Leukopenie, Lymphopenie und Neutropenie • Labor: Erhöhung der Transaminasen 	Motzer 1998 (56)

Im Rahmen der Dosisfindungsstudien wurde 500 ng/kg rIL-12 als maximal tolerierte Dosis etabliert. Bei der Phase II Studie (durchgeführt von Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts, in Zusammenarbeit mit Wyeth-Ayerst) kam es überraschender- und tragischerweise zu massiver Toxizität bei Dosen, die in der vorangegangenen Phase I Studie vertragen wurden (61). Die Nebenwirkungen, die alle Organsysteme betrafen, führten zum Tod von 2 der 17 Studienpatienten (siehe (60); Angaben in Tab. 8). Alle klinischen IL-12 Studien wurden abgebrochen und Untersuchungen zu den aufgetretenen Nebenwirkungen eingeleitet (61).

In Tierexperimenten war schon lange über die Toxizität von rekombinantem IL-12 berichtet worden (63, 91, 106, 107). Dabei wurden unter anderem die Effekte auf das hämatopoetische System mit Leukopenie, Thrombopenie und Anämie in der Maus (66) und in Primaten (108) untersucht. Vergleichende Untersuchungen hatten in der Maus bereits eine bessere Verträglichkeit der Plasmid DNA-Injektionen bei vergleichbarer Anti-Tumorwirkung zeigen können (91). Bei den mit rIL-12 behandelten Tieren kam es zu Gewichtsverlust, Splenomegalie und Allgemeinsymptomen, wie struppigem Fell und Lethargie, während die Unverträglichkeitsreaktionen in der mit Plasmid behandelten Gruppe nicht auftraten. Dabei wurden vor allem die durch IL-12 induzierten erhöhten Spiegel von IFN- γ für die Toxizität verantwortlich gemacht. Diese systemischen IFN- γ Spiegel können durch lokale Applikation z. B. auch durch IL-12 exprimierende Zellen, bereits wesentlich reduziert werden, wodurch sich auch die bessere Verträglichkeit erklären lässt.

Bei den klinischen Studien mit IL-12 exprimierenden Zellen sind die Nebenwirkungen z. T. nicht sehr umfassend dokumentiert. Mehrere Autoren berichten von lokalen Nebenwirkungen im Sinne von Schmerzen an der Injektionsstelle und hämorrhagischer Nekrose der injizierten Läsion (104, 105). Systemische Nebenwirkungen mit Grippe-ähnlichen Symptomen und Fieber werden dagegen nur in einer Studie bei 2 von 6 Patienten angegeben (104). Zusammenfassend zeigte der Vergleich die Anwendung von IL-12 exprimierenden Zellen eine deutlich bessere Verträglichkeit, als die des rekombinanten IL-12.

Im Anschluss an die Todesfälle, die im Rahmen der Phase II Studie mit rekombinantem IL-12 aufgetreten waren, wurden dezidierte Untersuchungen zu deren Ursachen eingeleitet. Dabei stellte sich heraus, dass neben der Dosis das

Behandlungsschema eine entscheidende Rolle für die Verträglichkeit spielt. Durch eine einmalige Applikation von IL-12 in niedriger Dosierung (Prädosis), werden die darauffolgenden höheren Dosierungen besser toleriert (60). Dieser Effekt wurde bei Mäusen und Affen untersucht und konnte auf die verminderte IFN- γ Ausschüttung nach einer vorherigen Prädosis zurückgeführt werden. Retrospektiv zeigte sich auch, dass die IFN- γ Spiegel der mit rekombinatem IL-12 behandelten Studienpatienten der Phase II wesentlich höher waren, als die der Studienpatienten der Phase I Studie (60).

Die klinische Wirksamkeit von IL-12 konnte bei verschiedenen Tumorerkrankungen und mit verschiedenen Applikationsmethoden gezeigt werden. Hinsichtlich einer klinischen Anwendung sind neben der Toxizität weitere Überlegungen bezüglich der Applikationsform wichtig. Nachteil bei der Applikation von rekombinatem IL-12 sind - neben der Toxizität - die häufigen, z. T. täglichen Injektionen. Nachteil bei der Verwendung von IL-12 exprimierenden Zellen ist die Notwendigkeit eines Zellkulturlabors in der Nähe der Behandlungsräume zur jeweils frischen Aufbereitung des Therapeutikums, was sehr aufwendig ist. Bei der klinischen Anwendung von IL-12 exprimierenden Fibroblasten werden fremde Zellen mit IL-12 transduziert und den Patienten injiziert, was mit einer Immunreaktion gegen das Fremdgewebe einhergeht (109). Bei der Verwendung autologer Tumorzellen besteht die Notwendigkeit zunächst Tumorzellen gewinnen, kultivieren und *ex vivo* transfizieren zu müssen, bevor eine Therapie möglich wird. Dies gelingt bei natürlichen Tumoren nur bei einem Teil der Patienten und ist mit erheblichem Aufwand und Wartezeiten bis zum Therapiebeginn verbunden. Virale Vektoren rufen eine Immunantwort hervor und führen bei mehrfacher Anwendung zur Bildung neutralisierender Antikörper (77). Diese können zum einen das Therapeutikum neutralisieren, zum anderen sind mit den Immunreaktionen nicht unwesentliche Nebenwirkungen verbunden. Darüberhinaus haben virale Vektoren eine limitierte Kapazität für Gensequenzen, weisen das Risiko der Integration ins Genom auf und sind teuer in der Herstellung und Anwendung (77).

Nicht-virale Transfektionssysteme wie nackte DNA induzieren im Gegensatz zu viralen Vektoren keine Immunantwort gegen den Vektor, zeigen ein sehr viel geringeres Risiko der Insertion und bieten eine weit grössere Kapazität für kodierende Sequenzen (78, 110). Schliesslich sind in der IL-12 kodierenden Plasmid DNA immunstimulatorische CpG Oligodeoxynucleotide enthalten, die zusätzlich zu

einer unspezifischen Immunstimulation führen (111). Diese Oligodeoxynucleotide (ODN) mit unmethylierten Deoxycytidyl-Deoxyguanosin (CpG) Dinucleotiden (CpG ODN) werden durch Toll-like Rezeptor 9 erkannt und imitieren die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA (112). Für eine Applikation von IL-12 als Plasmid DNA spricht weiterhin die einfache Handhabung und die bessere Verträglichkeit. Andererseits wurde Plasmid DNA in verschiedenen Publikationen eine unzureichende Transfektionseffizienz und zu niedrige Expression der kodierten Proteine zugeschrieben (113). Aber obwohl aufgrund dieser postulierten niedrigen Expression eine Wirksamkeit von Plasmid DNA ausser bei Nagetieren bezweifelt wurde (114), konnten wir in unseren Studien in einem Grosstier (115) und im Menschen (97) gute Wirksamkeit zeigen. Aktuell wird IL-12 wieder vermehrt im Rahmen klinischer Studien als rekombinantes Protein (101, 116) und unter Nutzung viraler Vektorsysteme (117) untersucht. Nach wie vor ist jedoch unsere klinische Studie zu IL-12 kodierender Plasmid DNA die erste und einzige zu Zytokin-kodierender Plasmid DNA bei Patienten mit Tumorerkrankung.

5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es eine wirksame, gut verträgliche Therapieoption für das metastasierende Melanom zu finden, welche als Monosubstanz oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen im Rahmen einer klinischen Studie erprobt werden könnte. Um die wirksamste Option zu finden, wurden im Mausmodell verschiedene immunologische Therapieansätze unter Verwendung von Zytokin- und Antigen-kodierender DNA untersucht. Dabei stellte sich IL-12 kodierende Plasmid DNA als wirkungsvollste Option heraus. Um den Therapieansatz für die klinische Anwendbarkeit tauglich zu machen, wurde der Applikationsweg optimiert und der Wirkmechanismus charakterisiert. Um die Zulassung zur Prüfung im Rahmen einer klinischen Studie zu erhalten, wurden umfangreiche Untersuchungen zur Toxizität durchgeführt und eine investigator's brochure verfasst. Zur Erlangung von Daten über die Sicherheit und Verträglichkeit der neuen Therapieform wurde eine Phase I/II Studie durchgeführt und ausgewertet. Zusätzlich konnte in dieser ersten klinischen Studie unter Verwendung von IL-12 kodierender Plasmid DNA Erkenntnisse über die Wirksamkeit bei Patienten mit metastasierendem Melanom gewonnen werden.