

Tumorimmuntherapie

Genetische Immuntherapie solider Tumoren

REINHARD WÄHLER², HARALD ITTRICH³, LARS MÜLLER⁴, HANSJÖRG FORSTER⁵, FRANK SCHNIEDERS^{1,5}

¹INSTITUT FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF, ²DIVISION OF HUMAN GENE THERAPY, UNIVERSITY OF ALABAMA, BIRMINGHAM AL, USA, ³ZENTRUM RADIOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF, HAMBURG, ⁴KLINIK FÜR HEPATOBILIÄRE CHIRURGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF, HAMBURG

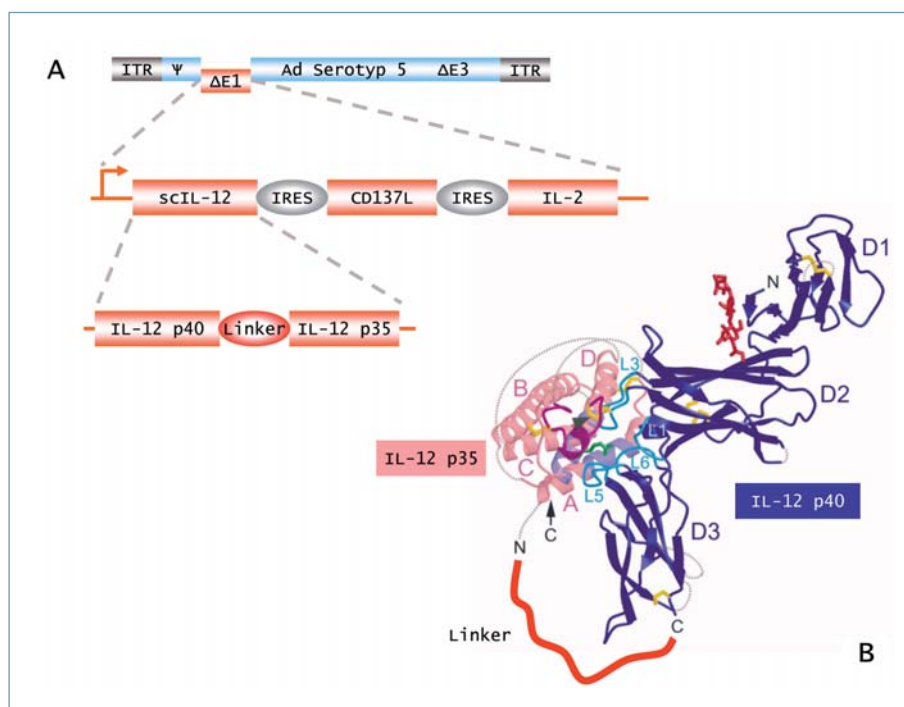
Tumorzellen entgehen durch verschiedene Mechanismen der Erkennung durch das Immunsystem. Daher ist die körpereigene immunologische Kontrolle des Tumorwachstums nicht in der Lage, Tumorerkrankungen langfristig einzudämmen. In dem hier vorgestellten Projekt ist es gelungen, durch adenovirale Expression dreier Immunstimulatoren, IL-12, IL-2 und CD137L (4-1BBL), eine effiziente Immunantwort zur Zerstörung der Tumorzellen zu initiieren.

■ Eine einmalige Injektion mit dem Vektor führte zur Abstoßung syngener transplantierte Lebertumoren in Buffalo-Ratten. In diesem Modell wurden injizierte Ersttumoren und hepatische unbehandelte Zweittumoren mit vergleichbarer Effizienz abgestoßen. Des

Weiteren wurde durch die Therapie eine Immunisierung der Tiere gegen die transplantierten Tumoren erreicht, da eine wiederholte Injektion von Tumorzellen nicht zu erneuter Tumorbildung führte. Die hier vorgestellte Technologie wird derzeit durch ein

ausgegründetes biopharmazeutisches Unternehmen, namens Provecs, in Hamburg für den klinischen Einsatz weiterentwickelt.

Das Immunsystem gegen Tumorzellen zu aktivieren, stellt eine Idealstrategie in der Krebsbekämpfung dar. Bei der Erforschung dieser Strategie stehen die hohe Spezifität immunologischer Prozesse und eine systemische, also körperweite Abwehr von Tumorzellen als Ziele im Vordergrund^[1]. Als Immunbotenstoffe nehmen Zytokine in diesen Prozessen eine Schlüsselrolle ein, ihr therapeutischer Einsatz als rekombinante Proteine ist jedoch bislang mit zu geringer Wirksamkeit und hoher Toxizität verbunden^[2, 3]. Aus diesem Grund werden Strategien gesucht, um eine räumlich auf den Tumor eingegrenzte Anwendung der Zytokine zu erreichen. Lokale Applikationstechniken für rekombinante Proteine wie Einkapseln in Trägermaterialien erlauben zwar diese Eingrenzung^[4], es bleibt jedoch die kostspielige Herstellung sowie die aufwändige Aktivitäts- und Stabilitätsprüfung. Diese Nachteile lassen sich elegant durch gentherapeutische Verfahren umgehen. Das Einbringen der genetischen Information für die Bildung der Zytokine direkt in den Tumor lässt sich durch heute verfügbare Gentransfersysteme (Vektoren) erreichen und sowohl Expressionsdauer als auch -höhe steuern^[5]. Hierbei wurden bisher sowohl einzelne als auch Kombinationen verschiedener Zytokine per Gentransfer zum Einsatz gebracht^[6].



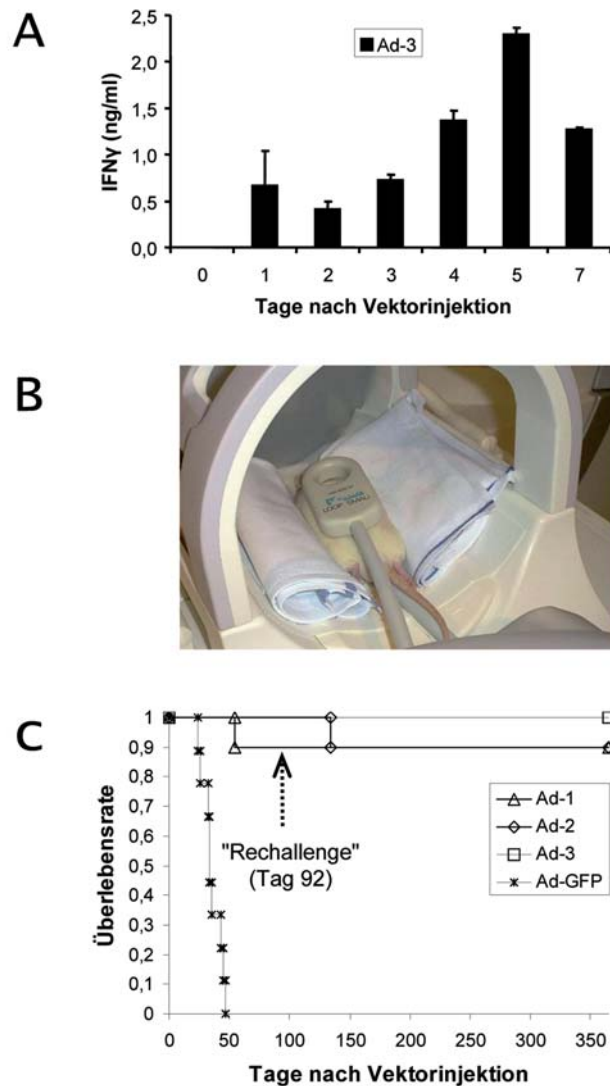
◀ **Abb. 1:** Vektor zur genetischen Immunstimulation und Interleukin-12-Fusionsprotein. Ein adenoviraler Vektor, Serotyp 5 (Ad5), der ersten Generation mit Deletionen in der E1- und der E3-Region ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) wurde verwendet. **A**, Eine tricistronische Expressionskassette mit den cDNAs für scIL-12, CD137L (4-1BBL) und IL-2, unter der Kontrolle des CMV-Promotors und verbunden durch Interne Ribosomale Eintrittsstellen (IRES) erlaubt die Expression aller drei Immunstimulatoren. **B**, Das hier verwendete scIL-12 ist ein Fusionsprotein, bei dem die Untereinheiten p35 (Rosa) und p40 (Blau) durch einen Polypeptidlinker (Linker, Rot) verbunden sind. Modifiziert nach Yoon et al. (2000).

Multigenttransfer mit adenoviralen Vektoren

Auf diesem Hintergrund haben wir eine Strategie entwickelt, immunstimulatorische Proteine am Ort des Tumors in therapeutisch effektiven, jedoch systemisch unkritischen Dosierungen zu exprimieren. Dazu haben wir adenovirale Vektorsysteme entwickelt, die die drei Immunstimulatoren IL-12, IL-2 und CD137L (4-1BBL) in einem Vektorgenom exprimieren. Dies gelang durch die Konstruktion einer tricistronischen Expressionskassette (**Abb. 1A**) und der Verwendung einer Fusionsvariante des IL-12 (scIL-12). Bei dieser Modifikation des IL-12 sind die p40- und die p35-Untereinheit durch einen Polypeptidlinker verbunden^[7, 8] (**Abb. 1B**).

Immuntherapie beim HCC der Ratte

Expressionsanalysen in Tumorzelllinien zeigten, dass therapeutisch relevante Mengen der Zytokine gebildet werden und der Kostimulator CD137L als Oberflächenprotein auf den Tumorzellen präsentiert wird (Daten ohne Abbildung). Bei der *in vivo*-Testung des Vektors wurde besonderer Wert auf den Einsatz eines möglichst authentischen Tumormodells der Leber gelegt. Für Tumoren der Leber besteht hoher medizinischer Bedarf für neue Therapieoptionen, da es für Patienten mit inoperablen und metastasierten Tumoren keine Therapie gibt. Unser Vektor wurde zu diesem Zweck im hepatozellulären Karzinom der Ratte getestet, erzeugt durch intrahepatische Transplantation der Morris-Hepatomlinie MH-7777a, die in Buffalo-Ratten syngen ist und daher nicht spontan abgestoßen wird. In dem vorliegenden Modell wurden jeweils zwei Tumoren in die Leber transplantiert, und zwar 1 Mio. Zellen in den linken (**Abb. 3**, roter Pfeil) und 0,65 Mio. Zellen in den rechten Leberlappen (**Abb. 3**, rosa Pfeil). Nach 14 Tagen wurde nur der linksseitige Tumor durch eine einmalige Injektion behandelt. Im Therapieverlauf wurde dann Interferon- γ (IFN γ), ein durch Interleukin-12 in T-Zellen und Dendriten induziertes sekundäres Zytokin, gemessen (**Abb. 2A**). Ein Anstieg der IFN γ -Werte wurde bis

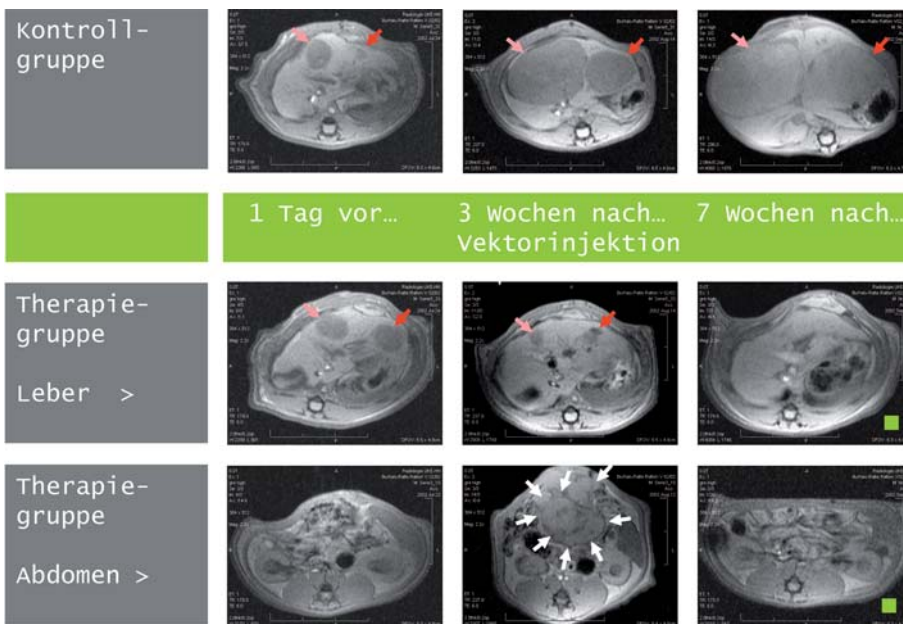


◀ **Abb. 2:** Genetische Immuntherapie beim hepatozellulären Karzinom in Buffalo-Ratten. Lebertumoren wurden induziert durch Implantation von MH-7777a-Zellen in die Leber von Buffalo-Ratten. Nach 14 Tagen wurden die Tiere in Gruppen aufgeteilt und mit folgenden Vektoren behandelt: Ad-1 (Ad CMV-scIL-12) Ad-2 (Ad CMV-scIL-12 IRES CD 137L) und Ad-3 (Ad CMV-scIL-12 IRES CD 137L IRES IL-2) und Kontrollvektor Ad CMF-GFP (Green Fluorescent Protein). **A**, Interferon- γ -Werte, bestimmt im ELISA, über fünf Tage nach Vektorinjektion in Ratten, die mit 1×10^9 infektiösen Partikeln. Ad-3 behandelt wurden. Am Tag 5 findet sich ein behandlungsbedingter Anstieg, der auf die biologische Aktivität des Vektors hinweist. **B**, Magnetresonanztomographie, MRT, bei Ratten. **C**, Überlebenskurve nach Behandlung mit jeweils 5×10^7 infektiösen Partikeln der genannten vier Vektoren. Alle Tiere der Ad-3-Gruppe überlebten tumorfrei, jeweils 90 % der Tiere in der Ad-1- und Ad-2-Gruppe überlebten. Alle überlebenden und tumorfreien Tiere stießen am Tag 92 nochmals in die Leber transplantierte Tumorzellen („Rechallenge“, 1 Mio. Zellen pro Tier) ab und blieben für den Beobachtungszeitraum von einem Jahr tumorfrei. Alle Tiere der Kontrollgruppe verstarben binnen 49 Tagen.

zum Tag 5 festgestellt und zeigt, dass der Vektor biologisch wirksam ist. Am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bestehen durch das Engagement von Harald Ittrich die exklusiven Möglichkeiten, das Tumorumfängen an lebenden Tieren mittels Magnetresonanztomographie (MRT) zu messen (**Abb. 2B**). Die Überlebenskurve aufgenommen über einen Zeitraum von einem Jahr und bei einer Dosierung von 5×10^7 infektiösen Partikeln (i. P.) des Vektors zeigt, dass mehr als 90 % der Tiere ihre Tumoren, initiiert durch die Behandlung, abstießen, während alle Tiere, die mit einem Kontrollvektor behandelt wurden, nach spätestens sieben Wochen verstarben (**Abb. 2C**). Zur Überprüfung eines immunologischen Memory-Effektes, also der andauernden Immunisierung gegen die implantierten Zellen, wurden ca. drei Monate nach Implantation erneut 1 Mio. MH-7777a Zellen in die Leber der Tiere implantiert (**Abb. 2C**, „Rechallenge“). Keines der so behandelten Tiere bildete neue Tumoren. Alle diese Tiere überlebten tumorfrei die gesamte Studiendauer von 12 Monaten.

Therapieverlauf der genetischen Immuntherapie

Die Verlaufskontrollen mittels MRT zeigten, dass in vielen Fällen bereits binnen zwei Monaten eine völlige Abstoßung der Tumorzellen induziert werden konnte. Alle erfolgreich behandelten Tiere waren spätestens nach drei Monaten tumorfrei. Die Analysen zeigten jedoch auch, dass sich in dem hier eingesetzten Tumormodell unbeabsichtigt intraperitoneale Tumormetastasen bildeten. **Abbildung 3** zeigt repräsentativ den Verlauf des Tumorwachstums je eines Tieres aus der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe. Das gezeigte mit Kontrollvektor behandelte Tier entwickelte bis zum Zeitpunkt des Versterbens nach sieben Wochen große Tumoren im Bereich der Leber. Das Tier aus der Behandlungsgruppe zeigte bereits nach drei Wochen stagnierendes Tumorwachstum und nach sieben Wochen vollständige Tumorabstoßung im Bereich der Leber. Drei Wochen nach Behandlung fand sich eine große Peritonealmetastase, die nach weiteren vier Wochen ebenfalls vollständig abgestoßen war.



▲ **Abb. 3:** Therapieverlauf dargestellt mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Dargestellt ist der Therapieverlauf über einen Zeitraum von sieben Wochen nach Behandlung mit den genannten Vektoren. **Oben,** Verlauf nach Behandlung mit dem Kontrollvektor (Ad CMV-GFP). Zwei Tumoren werden implantiert, nur ein Tumor wird mit dem Vektor injiziert (roter Pfeil). Es bilden sich große Tumoren, an denen dieses Tier verstirbt. **Mitte,** In der Therapiegruppe bilden sich sowohl der injizierte (roter Pfeil) als auch der nicht injizierte Tumor (rosa Pfeil) binnen sieben Wochen vollständig zurück. Sie blieben tumorfrei in der gesamten Lebenszeit von einem Jahr (tumorfrei: grünes Quadrat). **Unten,** Dieses Tier bildete in der Bauchhöhle (Abdomen) eine große Metastase, die im Verlauf weiterer vier Wochen ebenfalls abgestoßen wird.

Die Tumorabstoßung konnte in dem verwendeten Tiermodell bei sehr geringen Dosierungen der adenoviralen Vektoren erzielt werden. Dosis-limitierende Nebenwirkungen wurden bei den behandelten Tieren nicht festgestellt. Weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus und zu Fragen nach unerwünschten Wirkungen wurden in weiteren Tierstudien untersucht.

Fazit und Ausblick

Offenbar schaffen es die drei eingesetzten Faktoren, in sehr kurzer Zeit eine starke Immunantwort zu initiieren. Vorausgegangen eigene Studien mit einem Vektor, der nur das scIL-12 exprimiert, zeigten bereits, dass diesem Zytokin eine zentrale Rolle bei diesem Wirkmechanismus zukommt^[9]. Die

Kombination dreier synergistisch agierender Faktoren, exprimiert durch einen gemeinsamen Vektor, soll hohe biologische Aktivität erzeugen. Speziell die Kombination mit CD137L (4-1BBL) soll den Effekt der Immunisierung gegen die Tumorzellen unterstützen^[10] und somit eine langfristige Wirksamkeit der systemisch wirksamen Immuntherapie gewährleisten.

Aufgrund des günstigen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils wird diese neue Therapie nun für den klinischen Einsatz an Patienten mit Tumoren und Metastasen der Leber weiterentwickelt. Um die dazu notwendigen finanziellen Mittel zu akquirieren und das genetische Immuntherapeutikum darüber hinaus zur Marktreife zu entwickeln, wurde von zwei der Autoren (H. F. und F. S.)

das biopharmazeutische Unternehmen Provecs gegründet. ■

Literatur

- [1] Butterfield, L. H. (2004): Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127(5 Suppl 1): 232-241.
- [2] Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., Ryan, J. L. (1997): Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90(7): 2541-2548.
- [3] Atkins, M. B., Regan, M., McDermott, D. (2004): Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 6342-6346.
- [4] Hill, H. C., Conway, T. F., Sabel, M. S., Jong, Y. S., Mathiowitz, E., Bankert, R. B., Egilmez, N. K. (2002): Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptive antitumor immunity and cure of disseminated disease. *Cancer Res.* 62(24): 7254-7263.
- [5] Block, A., Puls, F., Müller, J., Milasinovic, D., Igelmann, D., Schafer, P., Kupfermann, N., Schmoldt, A., Ameis, D., Greten, H. (2003): Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system. *J. Gene Med.* 5(3): 190-200.
- [6] Pützer, B. M., Hitt, M., Müller, W. J., Emtage, P., Gaudie, J., Graham, F. L. (1997): Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(20): 10889-10894.
- [7] Lieschke, G. J., Rao, P. K., Gately, M. K., Mulligan, R. C. (1997): Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15(1): 35-40.
- [8] Yoon, C., Johnston, S. C., Tang, J., Stahl, M., Tobin, J. F., Somers, W. S. (2000): Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J.* 19(14): 3530-3541.
- [9] Waehler, R., Ittrich, H., Mueller, L., Krupski, G., Ameis, D., Schnieders, F. (2005): Low-dose adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12. *Hum. Gene Ther.* 16(3): 307-317.
- [10] Bertram, E. M., Dawicki, W., Sedgmen, B., Bramson, J. L., Lynch, D. H., Watts, T. H. (2004): A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J. Immunol.* 172(2): 981-988.

Korrespondenzadresse:

Dr. Frank Schnieders
Institut für Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52
D-20246 Hamburg
Tel.: 040-42803-9325
Fax: 040-42803-4592
schnieders@uke.uni-hamburg.de

AUTOREN



Frank Schnieders

Jahrgang 1963. 1985–1991 Biochemiestudium an der Universität Hannover, 1989 Studienaufenthalt in Toronto, Canada. 1996 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover in Humangenetik. 1996–1999 Postdoc am MDC Berlin für Molekulare Medizin im Bereich Gentherapie. Seit 2001 eigene Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 2005 Gründung des biomedizinischen Unternehmens Provecs.



Reinhard Wähler

Jahrgang 1972. 1991–1997 Biochemiestudium an der Universität Hannover, 2003 Promotion an der Universität Hamburg. 2003–2004 Postdoc am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Seit 2005 Postdoc im Labor von Prof. Curriel am Genterapiezentrum der University of Alabama at Birmingham, USA.