



(19) REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: AT 412 145 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1375/2002

(51) Int. Cl.⁷: A61K 35/14

(22) Anmeldetag: 13.09.2002

A61K 38/19

(42) Beginn der Patentdauer: 15.03.2004

(45) Ausgabetag: 25.10.2004

(56) Entgegenhaltungen:

WO 01/39600A1 WO 01/09288A1
WO 02/34887A2 WO 01/51077A1
WANG, Y. ET AL., ZHONGHUA XUEYEXUE
ZAZHI. 21 (7), 2000, S. 345-348

(73) Patentinhaber:

FORSCHUNGSIINSTITUT FÜR
KREBSKRANKE KINDER
A-1090 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FELZMANN THOMAS DR.
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES ZELLULÄREN IMMUNTHERAPEUTIKUMS AUF BASIS
VON IL-12-FREISETZENDEN DENDRITISCHEN ZELLEN

AT 412 145 B

(57) Die vorliegende Erfindung offenbart die Verwendung von Interleukin 12 (IL-12) freisetzenden aktiven dendritischen Zellen (DCs), die mit einem Antigen gegen ein spezifisches Pathogen oder einen spezifischen Tumor beladen sind und aufgrund der Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon-gamma (IFN- γ) IL-12 freisetzen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Patienten mit einer Infektion mit diesem spezifischen Pathogen oder zur Behandlung eines Patienten mit diesem spezifischen Tumor.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Interleukin 12 (IL-12) exprimierenden dendritischen Zellen (DCs).

Während bei der Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen erhebliche Fortschritte erzielt wurden, sind die herkömmlichen Verfahren zur Lieferung dieser Antigene in vielen Fällen unausgegoren und unzulänglich. Die meisten Adjuvanzien, die prinzipiell erhältlich sind, wurden empirisch entdeckt, und ihr Mechanismus der immunstimulierenden Wirkung ist noch kaum verstanden. Darüber hinaus lassen vorklinische Studien darauf schließen, dass die meisten konventionellen Adjuvanzien zwar die Bildung einer gewissen Immunantwort unterstützen, doch andere wichtige Zweige des Immunsystems wie CTL-Aktivität nicht anregen können. Insbesondere war die Generierung einer zytolytischen, tumorhemmenden Immunität mit solchen Adjuvanzien nicht möglich.

Das führte zur Anwendung von DCs als Adjuvanzien. Bei derartigen Versuchen bewirkten DCs, die *in vitro* mit Tumor-assoziiertem Antigenen gepulst wurden, eine Tumorabwehr in experimentellen Mäuse-Tumorsystemen und erhöhten die tumorhemmende Immunität bei Patienten. DCs fangen Antigene an der Peripherie ein und verarbeiten diese, wandern zu lymphatischen Organen, exprimieren Lymphozyten costimulierende Moleküle und sekretieren Zytokine zur Initiierung und Steuerung von Immunantworten.

Das Antigen wird durch DCs an MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen präsentiert, die Peptide während ihrer biosynthetischen Reifung binden, wodurch eine ständig aktualisierte Anzeige der intrazellulären und umgebenden Proteinzusammensetzung möglich ist. T-Zellen-Rezeptoren an zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkennen antigene Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind, während MHC Klasse-II-Peptidkomplexe von Helper-T-Lymphozyten (HTL) erkannt werden.

Manche Reifestimuli führen zu Typ-1-HTL-Polarisierung, die durch eine IL-12-Freisetzung gekennzeichnet ist [Cella, 1996], welche in der Folge die Entwicklung von zytolytischer Immunität unterstützt. Andere tun das nicht und begünstigen Typ-2-HTL-Polarisierung, die die humorale Immunität fördert. Lipopolysaccharid (LPS) ist ein klassischer Reifestimulus, der zu einer IL-12-Sekretion aus DCs führt [Hilkens, 1997]. Es wurde jedoch gezeigt [Langenkamp, 2000], dass DCs nach der Reifung mit LPS IL-12 nur vorübergehend erzeugen und gegen eine weitere Stimulation höchst beständig sind. Die Erschöpfung der Zytokinproduktion wirkte sich auf den T-Lymphozyten-Polarisierungsprozess aus. Bald nach der Stimulation „primten“ DCs starke Typ-1-HTL-Antworten, wohingegen dieselben Zellen zu einem späteren Zeitpunkt vorzugsweise als Primer für Typ-2-HTLs fungierten.

In der WO 01/39600 A1 wird die Verwendung von Hsp27 als antiinflammatorisches Agens beschrieben, welches zur Ausreifung von DCs verwendet wird. Diese DCs werden jedoch nicht mit einem Tumorantigen beladen, sondern der Antigenkontakt findet erst nach der Ausreifung statt. Eine Antigenbeladung vor der Ausreifung kann demgemäß in diesem Dokument nicht stattfinden.

In der WO 01/09288 A1 werden DCs unter anderem durch Zugabe von TNF-alpha im Kultivierungsmedium erzeugt. Es ist aber bekannt, dass TNF-alpha nicht das komplette heterodimere IL-12-Molekül stimuliert, sondern nur einen der beiden Untereinheiten. Weiters wirkt gemäß der WO 01/09288 A1 der Antigen-Kontakt erst nach Ausreifung der DCs, so dass die dort beschriebenen Zellen jedenfalls nicht gegen ein spezifisches Pathogen oder einen spezifischen Tumor beladen sind.

In der WO 02/34887 A2 werden zwei verschiedene Klassen von Nukleinsäuren-Adjuvantien, nämlich CpGs auf der einen Seite und Poly-I:Cs auf der anderen Seite zur Anregung von DCs verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass Poly-I:C und CpG in humanen DCs nur mit sehr geringer Effizienz IL-12 freisetzen können. Außerdem wird gemäß diesem Dokument keine Pathogen- oder Tumor-spezifische „Beladung“ der DCs in Kombination mit IL-12-Freisetzung beschrieben.

In der WO 01/51077 A1 werden Verfahren zur Regulierung der IL-12-Produktion durch CCR5-Agonisten und Antagonisten beschrieben, jedoch wurde hierbei wiederum von spezifisch „beladenen“ DCs ausgegangen.

WANG et al. (Zhonghua xue ye xue za zhi, 21 (7), (2000), Seiten 345-348) wird beschrieben, dass die Proliferation von CD (4) (+)-Zellen nach der Kultivierung mit DCs ein guter Indikator als ein Kontrollinstrument für den Verlauf einer Immuntherapie darstellen soll. Dabei wurden DCs von PBMCs mit einem Tumorantigen der XG-7-Zelllinie beladen welche dann mehr CD (4) (+)-Zellen

stimulieren konnten als DCs. Es wird allerdings in diesem Dokument nichts über die Verabreichung eines Ausreifungsstimulus beschrieben.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, verbesserte Mittel zur Behandlung von Virusinfektionen und Tumoren unter Verwendung von DCs zur Verfügung zu stellen.

5 Die vorliegende Erfindung ermöglicht daher die Verwendung von Interleukin 12 (IL-12) freisetzenden dendritischen Zellen (DCs), die mit einem Antigen gegen ein spezifisches Pathogen oder einen spezifischen Tumor beladen sind und aufgrund der Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon-gamma (IFN- γ) IL-12 freisetzen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Patienten mit einer Infektion mit diesem spezifischen Pathogen oder zur Behandlung eines Patienten mit diesem spezifischen Tumor.

10 Es war zwar bekannt, dass es möglich ist, eine IL-12-Freisetzung in DCs zu induzieren, doch wurde dieses Konzept nicht für zweckmäßig und notwendig zur Behandlung von Tumorpatienten oder zur Behandlung von Patienten mit schweren Virusinfektionen erachtet. Das war in erster Linie darauf zurückzuführen, dass die Freisetzung von IL-12 durch DCs vorübergehend und daher zur 15 Induktion einer ausreichenden zellulären Immunantwort gegen den Tumor oder das Pathogen nur während eines begrenzten Zeitfensters geeignet ist. Auf überraschende Weise konnte mit der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, dass die Anwendung dieses Konzepts zur Auslösung einer Sekretion von großen Mengen an IL-12 aus DCs, z.B. durch Einwirken einer Kombination von LPS und IFN- γ unter Kulturbedingungen frei von fötalem Kälberserum, zu einer Stabilisierung der Krankheit über einen längeren Zeitraum ohne größere toxische Nebenwirkungen führte. Es ist jedoch 20 wichtig, die erfindungsgemäßen DCs in einem Zustand abzugeben, wo eine Freisetzung von IL-12 nach wie vor stattfindet, d.h. unmittelbar nach der Herstellung der Tumor- und Krankheitserregerspezifischen IL-12-freisetzenden DCs oder zumindest innerhalb von 1 bis 10, insbesondere innerhalb von 2 bis 6 Stunden danach, idealerweise etwa 2 Stunden nach Fertigstellung der Präparation. 25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Verabreichung der erfindungsgemäßen DCs in einer wirksamen Menge an einen Tumorpatienten oder einen Patienten, der mit dem spezifischen Pathogen infiziert ist.

30 Die durch die vorliegende Erfindung ermöglichte Behandlung wird nämlich gut vertragen. Es konnte daher anhand der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, dass derartige aktive DCs im Gegensatz zu erschöpften DCs, die kein IL-12 mehr produzieren, zytolytische Immunität bei einem menschlichen in-vitro-Modell und Tumorabwehr in einem Mäuse-Tumormodell induzieren konnten. Über erste Vorergebnisse einer klinischen Phase I der vorliegenden Erfindung wird im Beispielteil der vorliegenden Anmeldung berichtet, wo die Eignung und fehlende Toxizität eines IL-12-sekretierenden DC-ATIT-(Antitumor-Immuntherapie)-Immuntherapeutikums zur Behandlung von 35 Krebs demonstriert wird.

40 Ein anderes Verfahren zur Auslösung von IL-12-Freisetzung aus DCs ist die Abgabe eines Signals, das durch die Wechselwirkung der CD40-Moleküle auf der Oberfläche von DCs mit dem Liganden CD40L vermittelt wird. Die Kombination von LPS und IFN- γ zeigt die beste IL-12-Stimulation im vorliegenden therapeutischen Rahmen für die erfindungsgemäße Phase-I-Studie.

45 Die Verwendung oder das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung wird auch für Patienten bevorzugt, die sich einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben und an einer Virusinfektion leiden, die aufgrund eines Immunmangels im Verlauf der Knochenmarktransplantation vor der Behandlung mit den erfindungsgemäßen DCs aufgetreten ist.

50 Die vorliegende Erfindung kann für eine Vielzahl von Pathogenen oder Tumoren verwendet werden. Vorzugsweise ist der mit den erfindungsgemäßen DCs zu behandelnde spezifische Tumor ein solides fortgeschrittenes Malignom. Im Prinzip kann jeder Tumor in jedem Stadium das Ziel einer zytolytischen Immunantwort sein, die mit erfindungsgemäßen DCs induziert wird.

55 Die vorliegende Erfindung wird vorzugsweise unter Verwendung von autologen DCs durchgeführt. Es werden daher bevorzugt DCs oder Vorläuferzellen von DCs verwendet, die dem Patienten mit einer Infektion mit dem spezifischen Pathogen oder dem Patienten mit dem spezifischen Tumor oder im Rahmen einer Knochenmarktransplantation dem Knochenmarkspender entnommen wurden. Diese autologen DCs sind mit den geringsten Negativantworten behaftet, weil sie vom Immunsystem des Patienten als „Selbst“ erkannt werden.

Das Laden der DCs kann mit jedem Antigen oder jeder Antigenmischung, die spezifisch für den Tumor bzw. das Pathogen ist, z.B. mit isolierten oder chemisch oder gentechnisch erzeugten

Polypeptiden, vorgenommen werden. Vorzugsweise werden die DCs jedoch mit einem Antigen aus einem Tumorzellen-Lysat vom Patienten mit dem spezifischen Tumor beladen. Solche autologen Tumorpräparationen zeigen bedeutende Erfolge in erfindungsgemäßen klinischen Studien.

Für eine entsprechende Verfolgung und Kontrolle der Verabreichung der DCs und der immuno-
5 logischen Antwort des Patienten auf dieselbe werden die DCs vorzugsweise zusätzlich mit einem Tracer-Antigen, insbesondere einem „Keyhole-Limpet“-Hämocyanin (KLH) beladen. Im Prinzip eignet sich jedes Neoantigen, d.h. ein Antigen, mit dem das menschliche Immunsystem noch nie zuvor konfrontiert worden ist, als Tracer-Antigen.

Um die Immunantwort für die vorliegende Erfindung noch weiter zu verbessern, können die
10 DCs vorzugsweise zusätzlich mit einem Adjuvans, insbesondere mit Tetanustoxoid, beladen werden. Im Prinzip eignet sich jedes Recall-Antigen, d.h. ein Antigen, gegen welches eine starke Immunantwort aufgrund früherer Routineimpfungen erwartet werden kann, als Adjuvans-Antigen.

Die Quelle für DCs ist nicht kritisch. Da die Herstellung von DCs aus mononuklearen peripheren Blutzellen (PBMCs) eine Standardtechnik ist, wird auch bevorzugt, die erfindungsgemäß einzusetzenden DCs aus mononuklearen peripheren Blutzellen (PBMCs), insbesondere PBMCs vom Patienten, dem die DCs dann nach dem Beladen transferiert werden sollen, zu erzeugen.

Die erfindungsgemäß aktivierten Zellen sind Interleukin 12 (IL-12) freisetzende DCs, die mit einem Antigen gegen ein spezifisches Pathogen oder einen spezifischen Tumor beladen sind.

Die erfindungsgemäß aktivierten DCs können vorzugsweise mit einem Antigen aus einer Tu-
20 morzelle beladen sein. Dieses Antigen kann durch eine Lyse von Tumorzellen oder Tumorgewebe erzeugt werden, das Tumor-Antigen kann in jedem rekombinannten Expressionssystem erzeugt werden, oder es können vom Tumor-Antigen abgeleitete kleine Peptide durch chemische Synthese hergestellt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäß aktivierten DCs zusätz-
25 lich mit einem Tracer-Antigen beladen.

Die Erfindung wird genauer durch die folgenden Beispiele und Zeichnungsfiguren beschrieben,
ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Figur 1: Immunphänotyp von unreifen und reifen DCs. Es ist ein typischer Immunphänotyp von DCs vor (offene Histogramme) und nach (geschlossene Histogramme) der Behandlung mit einem LPS/IFN- γ -Reifestimulus gezeigt.

Figur 2: Gemischte Leukozytenreaktion. DCs wurden mit LPS/IFN- γ reifen gelassen und zur Auslösung einer Vermehrung bei allogenen Lymphozyten verwendet. Als positive Kontrolle wurden die Superantigene SEA und SEB verwendet. Es ist die mittlere \pm -SEM von 18 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Figur 3: Erzeugung des Heterodimers IL-12 p70 mittels DCs. DC-Kulturen wurden mit LPS/IFN- γ reifen gelassen, und nach 24 Stunden wurde die IL-12-Sekretion bestimmt. Es sind die einzelnen Daten (linke Seite) und die mittlere \pm -SEM (rechte Seite) von 23 unabhängigen Experi-
35 menten gezeigt.

Figur 4: Antigen-spezifische Expansion von autologen T-Lymphozyten. Aktive (volle Kreise, n = 10) und erschöpfte (freie Kreise, n = 10) DCs, die mit einem autologen löslichen Lysat von LCLs beladen waren, wurden für die Antigen-spezifische Expansion von T-Lymphozyten verwen-
40 det. Gezeigt ist die absolute Anzahl von Zellen als mittlere \pm -SEM an den Tagen der Restimulation auf einer logarithmischen Skala.

Figur 5: Untergruppenverteilung von DC3-positiven T-Lymphozyten während der Antigen-
45 spezifischen Expansion. Aktive DCs (obere Tafel, n = 10) und erschöpfte DCs (untere Tafel, n = 10), die mit einem autologen LCL-abgeleiteten Lysat chargiert waren, wurden zur Stimulation von autologen T-Lymphozyten vier Wochen lang einmal die Woche verwendet. Die Untergruppenverteilung von DC3-positiven T-Lymphozyten wurde wöchentlich durch Immunphänotypisieren bestimmt (CD4-positive HTLs, volle Balken; CD8-positive CTLs, freie Balken). Der Prozentanteil an Unterpopulationen ist als mittlere \pm -SEM an den Tagen der Restimulation angegeben.

Figur 6: Zytolytische Aktivität von T-Lymphozyten nach Antigen-spezifischer Expansion. Aktive DCs (volle Kreise, n = 3) und erschöpfte DCs (freie Kreise, n = 5), die mit einem autologen LCL-
50 abgeleiteten Lysat beladen waren, wurden zur Stimulation von autologen T-Lymphozyten vier Wochen lang einmal pro Woche verwendet. Am Tag 28 wurde die zytolytische Aktivität der expan-
dierten T-Lymphozytenpopulation analysiert. Gezeigt ist der Prozentanteil an spezifischer Lyse als

mittlere \pm -SEM zu den angeführten Effektor/Target-Verhältnissen.

Figur 7: Immunphänotyp von unreifen und reifen Mäuse-DCs. Es ist ein typischer Immunphänotyp von DCs vor (offene Histogramme) und nach (volle Histogramme) der Behandlung mit einem LPS/IFN- γ -Reifestimulus gezeigt. Es sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs angeführt.

Figur 8: Konzentration des Heterodimers IL-12 p70 in den Kulturüberständen nach verschiedenen LPS/IFN- γ -Stimulationsperioden. Die DCs wurden nach der PS/IFN- γ -Stimulation 2 Stunden lang gewaschen und 24 Stunden lang in DC-Kulturmedium rekultiviert oder 24 Stunden lang im Medium stehen gelassen, ohne LPS und IFN- γ zu entfernen. Die Daten von drei Experimenten sind als mittlere \pm -SEM gezeigt.

Figur 9: Schutz von Mäusen vor Tumor-exprimierendem NPT als Modellantigen. Gruppen von 5 Mäusen wurden mit aktiven bzw. erschöpften DCs bzw. Kontrollreagenzien immunisiert wie angegeben. Die DCs wurden mit K-Balb-NPT-Lysat (voller Balken), rekombinantem NPT-Protein (schraffierte Balken) oder NPT-abgeleiteten synthetischen Peptiden (freie Balken) beladen. Für die Tumor-„Challenge“ wurden K-Balb-Wildtyp-Tumorzellen und K-Balb-NPT-Tumorzellen verwendet. Die Kontrollen wurden mit K-Balb-NPT-Tumorzellen „gechallenged“. Es ist ein repräsentativer Versuch dargestellt.

BEISPIEL

VERFAHREN

Erzeugung von menschlichen dendritischen Zellen

Mononukleare periphere Blutzellen (PBMC) werden durch Leukapharese gesammelt (Amicus, Baxter, Wien, Österreich). Das Leukapherese-Produkt wird mit PBS 1:5 verdünnt und eine Ficoll-Hypaque-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) darunter geschichtet. Der Gradient wird 30 min lang mit 2200 U/min, 18° bis 20°C, ohne Bremsen zentrifugiert. Die PBMC-Schicht wird in ein anderes Zentrifugenrörchen transferiert, und die Zellen werden mit überschüssigem PBS gewaschen. Die PBMCs werden auf einem Sysmex F820-Gerät (Sysmex, Kobe, Japan) gezählt und in entsprechenden Aliquoten eingefroren. Für die Erzeugung von DC wird ein Aliquot von PBMCs aufgetaut und gezählt. Eine Million DCs/ml werden in AIM-V-Medium (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) mit 1% gepooltem menschlichem AB-Plasma (Octaplas, Octapharm, Wien, Österreich) 2 Stunden lang bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator kultiviert. Nicht anhaftende Zellen werden durch sorgfältiges Spülen der Platte entfernt. Die anhaftenden Zellen werden 5 Tage lang in AIM-V-Medium, versetzt mit 2% Humanplasma, 400 E/ml IL-4 (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) und 1000 E/ml GM-CSF (Roche, Basel, Schweiz), kultiviert. Am Tag 5 werden die Zellen gewonnen, mit PBS gewaschen und in AIM-V ohne Plasma resuspendiert. Eine Million DCs/ml werden mit 1-10 µg Antigen 2 Stunden lang bei 37°C behandelt. Ohne Waschen wird die DC-Kultur auf eine Endkonzentration von 200 E/ml LPS (US Pharmacopeia, Rockville, MD), 50 ng/ml IFN- γ (Boehringer Ingelheim, Wien, Österreich), 400 E/ml IL-4, 1000 E/ml GM-CSF und menschlichem Plasma auf eine Endkonzentration von 2% versetzt. Die Zellen werden 2 Stunden lang bei 37°C zur Anwendung als aktive, IL-12 freisetzende DCs und 48 Stunden lang zur Anwendung als erschöpfte DCs inkubiert. Nach Beendigung des Reifeschritts werden die DCs zweimal mit PBS gewaschen.

Erzeugung von dendritischen Zellen der Maus

Im Gegensatz zu menschlichen DCs werden Mäuse-DCs aus Knochenmarkstammzellen hergestellt. Ansonsten ist das Verfahren ähnlich wie beim humanen System. Stammzellen aus dem Knochenmark von Balb/c-Mäusen werden aus den Röhrenknochen durch Abschneiden der Enden der Knochen und Spülbohren der Schäfte mit einer kleinen Spritze gesammelt. Die Knochenmarkzellen werden in RPMI-Medium (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) mit 10% fötalem Kälberserum (PAA Laboratories, Linz, Österreich) 6 Tage lang in Anwesenheit von 5 ng/ml Mäuse-IL-4 und 3 ng/ml Mäuse-GM-CSF (beide von Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) auf einer Platte mit 24 Vertiefungen in einer Dichte von 10^6 DCs/Vertiefung kultiviert. Das Laden mit Antigen erfolgt auf die gleiche Weise wie bei menschlichen DCs (siehe oben). Zur Reifung wird LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml und Mäuse-IFN- γ (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Der Tiersicherheitsausschuss der medizinischen Fakultät der Univer-

sität Wien genehmigte alle Tierversuche.

Immunphänotypisieren

Der Immunphänotyp wird vor und nach der Reifung gemäß Standardverfahren analysiert. IgG-Fc-Rezeptoren werden durch Zugabe von 50 µl einer 4%igen IgG-Lösung in jedes Teströrchen blockiert. Zur Analyse von menschlichen DCs werden die folgenden MAB-Paare verwendet: IgG FITC - IgG PE; CD45 FITC - CD14 PE; MHCII FITC - MHCI PE; CD1a FITC - CD83 PE; CD86 FITC - CD80 PE. Für die Analyse von Mäuse-DCs werden die MABs CD11b PE, CD11c FITC, MHC II PE, CD80 PE, CD40 FITC, CD86 PE verwendet. Die MABs wurden bei DAKO, Glostrup, Dänemark, Immunotech, Marseille, Frankreich bzw. Invitrogen Corporation, Bethesda, MD gekauft.

Die Flusszytometrie erfolgte unter Verwendung eines FAC-Scan-Geräts (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Gemischte Leukozytenreaktion

PBMCs werden mittels Gradientzentrifugation aus peripherem Blut wie oben beschrieben isoliert und in AIM-V/2% Humanplasma resuspendiert. Die DCs (10.000, 2.000 bzw. 400) werden dreifach (100 µl pro Vertiefung) auf einer Platte mit rundem Boden und 96 Vertiefungen angeordnet, und in jede Vertiefung werden 10^5 allogene MNCs in 100 µl Medium gegeben. Für eine positive Referenz werden 10^5 MNCs in 100 µl Medium mit Staphylokokken-Enterotoxin A/B (SEA/SEB, Toxin Technologies Inc., Sarasota, FL) auf 100 ng/ml Endkonzentration stimuliert. Die gemischten Zellen werden 4 Tage lang inkubiert. Am Tag 4 werden 25 µl Tritiumthymidin-Lösung (NEN Life Science Products, Boston, MA) in jede Vertiefung gegeben und die Zellen weitere 18 Stunden inkubiert. Schließlich werden die Zellen mit einem Skatron-Erntegerät (Skatron, Lier, Norwegen) geerntet, und das inkorporierte Tritiumthymidin wird auf einem Trilux-Beta-Zähler (Wallac Oy, Turku, Finnland) gezählt.

IL-12-ELISA

Die entsprechende Anzahl von Vertiefungen wird mit IL-12-Antikörper (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) in PBS beschichtet und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte gewaschen, 250 µl Blockierlösung (2% Rinderserumalbumin in PBS) zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur 3 Stunden lang inkubiert. Die Platte wird neuertlich gewaschen, und die Proben und IL-12-Standards (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) werden in der entsprechenden Verdünnung zugegeben. Standardkonzentrationen sind 2500, 500, 100, 20, 4 pg/ml. Die Platte wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem neuertlichen Waschschritt werden 75 µl biotinylierte IL-12-Antikörperlösung (Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) zugegeben, die Platte wird 4 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert, neuertlich gewaschen, und es werden 75 µl Streptavidin-Alkaliphosphatase-Lösung (Chemicon, Temecula, CA) zugesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur werden 100 µl PNPP (Sigma, St. Louis, MO) in Diethanolamin-Puffer (48 ml 10 M Diethanolamin, 0,25 ml 1 M MgCl₂, 20 ml 3 M HCl, eingestellt auf 500 ml Wasser und pH = 9,8) zugesetzt, und die Platte wird 50 min lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich werden 50 µl 3 M NaOH zugegeben, um die Reaktion zu stoppen, und die Platte wird mit einem ELISA-Plattenleser (Anthos, Salzburg, Österreich) bei 405 nm unter Verwendung von 690 nm als Referenz-Wellenlänge gemessen.

In-vitro-Induktion einer zytolytischen Immunantwort

EBV-transformierte Lymphoblastoid-B-Zelllinien (LCL) wurden durch Infizieren von B-Lymphozyten mit EBV, hergestellt durch B95.8-Zellen, erzeugt. Die LCLs wurden in RPMI-Medium (Life Technologies, Grand Island, NY), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (PAA Laboratories, Linz, Österreich) und L-Glutamin, gezüchtet. Ständig wachsende Kulturen wurden auf RPMI-Medium, versetzt mit 4% Humanplasma, transferiert. Lysate von LCLs wurden durch fünf Gefrier-Aufzüge in sterilem Wasser hergestellt. Teilchenförmige Bestandteile wurden durch Zentrifugieren aus der Proteinlösung entfernt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung eines Bio-Rad-Protein-Assays (Bio-Rad, München, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Autologe Lymphozyten wurden in einem zuvor optimierten Verhältnis von 5:1 mit mit LCL-abgeleitetem löslichem Protein beladen DCs kontaktiert. Als Negativkontrolle wurden unbeladene DCs verwendet. Die Kulturen wurden in X-VIVO-15-Medium (Bio-Whittaker, Waukesha, WI), versetzt mit 1% Humanplasma, und 10 ng/ml IL-2 ("Proleukin", Chiron, Emeryville, USA) in einer Ausgangskonzentration von 1×10^6 Lymphozyten/ml stehen gelassen. Die Lymphozyten wurden

einmal pro Woche vier Wochen lang restimuliert. Es wurde die Anzahl an Zellen unter Verwendung eines Coulter-Z2-Geräts (Coulter, Hialeah, FL) bestimmt. Die Lymphozyten-Untergruppenverteilung wurde mittels Fluss-Zytometrie unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 (alle von Invitrogen Corporation, Bethesda, MD) gemäß Standardverfahren analysiert.

Es wurde die in den T-Lymphozytenkulturen generierte zytolytische Aktivität gegen frische autologe und allogene Zielzellen ermittelt. LCLs wurden in Medium gewaschen und in 1 ml Puffer enthaltend 80 µM EuCl₃ (Fluka, Buchs, Schweiz), 400 µM DTPA-Na₂, 250 µg/ml Dextransulfat (MG 500.000), 50 mM Hepes (pH 7,4), 93 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 5 mM KCl (alle von Merck, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert und nicht länger als 15 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 20 µl CaCl₂ zugesetzt und die Inkubation weitere 5 min fortgesetzt und dreimal in einem Puffer enthaltend 50 mM Hepes (pH 7,4), 93 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂ und 10 mM Glucose gewaschen. Das Pellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und auf einer Schüttelplattform in 75 cm² Gewebekulturfälschchen 40 min lang bei 37°C vorinkubiert. Schließlich wurden die Zellen nochmals gewaschen, in Medium resuspendiert und auf 5 × 10⁴/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurde in eine entsprechende Anzahl von Vertiefungen auf einer Platte mit rundem Boden und 96 Vertiefungen transferiert. Zusätzliche Vertiefungen wurden zur Bestimmung der spontanen und maximalen Freisetzung (letztere durch Lysisieren der Zellen in 1% Triton X-100) von Eu aus LCLs eingerichtet. Die vorstimulierten T-Lymphozyten wurden gesammelt, einmal gewaschen und auf ein Effektor/Target-Verhältnis von 25/1, 12,5/1 und 6,25/1 (Endvolumen 200 µl) eingestellt. Die Platte wurde mit 500 U/min 5 min lang ohne Bremsen zentrifugiert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Platte neuerlich zentrifugiert, und 25 µl der Überstände wurden in eine Platte mit flachem Boden und 96 Vertiefungen transferiert und bei 4°C aufbewahrt. Vor der Messung wurden 200 µl Verstärkerlösung zugesetzt, und die Platte wurde vorsichtig geschüttelt und die Fluoreszenz mittels zeitaufgelöster Fluorimetrie auf einem Wallac 1420 VICTOR Mehrfachmarkierungszähler (Wallac, Turku, Finnland) analysiert. Die Ergebnisse wurden als prozentspezifische Lyse mit der folgenden Formel berechnet: % Lyse = (experimentelle Zählungen - spontane Freisetzung) × 100 / (maximale Freisetzung - spontane Freisetzung).

30 Mäuse-Tumormodell

Es wurde die mit Balb/c-Mäusen syngene Mäusetumor-Zelllinie K-Balb verwendet. Diese Zelllinie wurde konstruiert, um Neomycinphosphotransferase (NPT) durch retroviralen Gentransfer zu exprimieren. Dieses xenogene Protein diente als künstliches Tumor-Antigen bei Immunisierungsversuchen. Es wurden drei Antigenquellen verwendet. Zuerst wurde rekombinantes NPT-Protein in einem handelsüblichen Bakterien-Expressionssystem (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Histidin-Markierung zur Proteinreinigung gemäß den Empfehlungen des Herstellers generiert. Zweitens wurde die Sequenz von NPT auf nonamere Peptide untersucht, die eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit an H2b-Moleküle haben und von DCs von Balb/c-Mäusen präsentiert werden. Für diese Analyse wurde die "SYFPEITHI-Datenbank von MHC-Liganden und Peptidmotiven" (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>) verwendet. Es stellte sich heraus, dass die beiden Peptide GYDWAQQTI und PVLFVKTDL die größte Bindungswahrscheinlichkeit aufweisen. Die dritte Antigenquelle war das Zellen-Lysat des ganzen Tumors, das durch fünf Gefrier-Auftau-Zyklen mit anschließendem Zentrifugierschritt zur Entfernung von teilchenförmigen Bestandteilen aus dem Lysat erhalten wurde. Die Proteinkonzentration dieser Lysate wurde auf die gleiche Weise wie die Proteinkonzentration von LCL-abgeleiteten Lysaten bestimmt (siehe oben).

DCs wurden mit 1 µg/ml synthetischen NPT-abgeleiteten Peptiden, rekombinantem NPT-Protein bzw. 10 µg/ml K-Balb-NPT-Lysat durch Inkubation der DCs 2 Stunden lang in serumfreiem Medium beladen. Danach wurde ohne vorheriges Waschen Serum zu den Kulturen gegeben, und die DCs erhielten das LPS/IFN-γ-Reifestimulus 2 bzw. 24 Stunden lang. Nach der Reifung wurden die DCs zweimal in PBS gewaschen und in NaCl in einer Konzentration von 10⁷ DCs/ml gewonnen. Eine Million Antigen-beladene und gereifte DCs wurden am Rücken von rasierten Balb/c-Mäusen in Gruppen zu fünf Mäusen subkutan injiziert. Die Immunisierung wurde nach 1 Woche wiederholt, und nach 2 weiteren Wochen wurden die Mäuse mit 10⁶ K-Balb- bzw. K-Balb-NPT-Zellen "gechallengt", die in Serum frei von fötalem Kälberserum mindestens eine Woche vor der Injektion gezüchtet wurden. Die Tumorzellen wurden auf der gegenüberliegenden Flanke der

Mäuse subkutan injiziert, und das Tumorwachstum wurde überwacht.

Klinisches Studiendesign

Es wurden pädiatrische Patienten mit soliden kindlichen Tumoren, die schon sämtliche konventionellen Behandlungsmöglichkeiten ausgeschöpft hatten, rekrutiert. Tumorgewebe wurde operativ entnommen und mechanisch zerstört, um eine Einzellen-Suspension zu erzeugen. Das Verhältnis von Tumor- und Stromazellen wurde in einem Diagnostiklabor mittels in-situ-Fluoreszenzhybridisierung (FISH) gemäß Standardverfahren unter Verwendung von informativen Markern hinsichtlich zytogenen Anomalien der Tumorzellen ausgewertet. Die Einzellen-Suspensionen enthielten 50-90% Tumorzellen. Die Ethikkomission des St. Anna Kinderspitals, Wien, Österreich, genehmigte diese klinischen Studie.

Monoklonare periphere Blutzellen wurden Patienten mittels Leukapherese entnommen, und DCs wurden auf die oben beschriebene Weise generiert. Die DCs wurden mit $10 \mu\text{g}/10^6 \text{ DCs/ml}$ autologen Tumorzellen-Lysaten beladen, die durch fünf Gefrier-Auftau-Zyklen und Entfernen von teilchenförmigen Bestandteilen mittels Zentrifugation erzeugt worden waren. Die Konzentration an löslichem Protein wurde bestimmt wie für LCL-abgeleitete Lysate beschrieben. Darüber hinaus wurden DCs mit „Keyhole-Limpet-Hämocyanin“ (KLH), das als Tracer-Antigen im Test über Hypersensibilität vom verzögerten Typ (DTH) verwendet wurde, und mit Tetanustoxoid (TT) als Adjuvans (beide Substanzen von Calbiochem, San Diego, CA) beladen. Danach erhielten die DCs 2 Stunden lang einen LPS/IFN- γ -Reifestimulus. Die mit Antigen beladenen DCs wurden dreimal gewaschen und in einem Verhältnis von 1:1 mit bestrahlten autologen Tumorzellen gemischt. DCs ($1-10 \times 10^6/\text{m}^2$) wurden nahe bei tumorfreien Lymphknoten in wöchentlichen Intervallen drei Wochen lang mit einer Ruheperiode von drei Wochen nach drei Injektionen injiziert. Dieses Verfahren wurde dreimal wiederholt. Weiters erhielten Patienten eine Behandlung mit IFN- γ zur Verbesserung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, was zur Verhinderung eines Entkommens aus der zytolytischen Immunität beitrug. IFN- γ wurde während der drei Wochen Tumorkinse-Anwendung durch drei subkutane Injektionen pro Woche in Standarddosen verabreicht.

Eine Basisauswertung von klinischen und Laborparametern sowie die Überwachung der Krankheit erfolgten vor und nach der Behandlung durch entsprechende Verfahren. Eine weitere Diagnose erfolgte nach klinischem Bedarf. Nebenwirkungen der Behandlung wurden gemäß WHO-Standards evaluiert. DTH-Tests gegen KLH und gegen bestrahlte Tumorzellen wurden zur Bestimmung der Effizienz des Immunisierungsverfahrens verwendet. Das Tumorzellen-Lysat (1 μg in 100 μl NaCl), KLH (1 μg in 100 μl NaCl), 100 μl DC-Kulturmedium bzw. 100 μl NaCl wurden intradermal injiziert. Die Schwellung und Rötung an der Injektionsstelle wurde als Maß für die Induktion einer Immunantwort verwendet.

ERGEBNISSE

1. Analyse von menschlichen dendritischen Zellen

1.1. Immunphänotyp

Unreife DCs wurden generiert und mit LPS/IFN- γ -Reifestimulus kontaktiert. Der Immunphänotyp wurde vor und nach der Reifung auf Aufwärtsregulierung der DC-Marker CD83, Aufwärtsregulierung der costimulierenden Moleküle CD80 und CD86, Aufwärtsregulierung von MHC-Molekülen der Klasse I und II und Niederregulierung des monozytären Markers CD14 analysiert. Ebenfalls enthalten war eine Analyse des CD1a-Moleküls, von dem angenommen wird, dass es auf unreifen DCs aufwärtsreguliert wird, des üblichen Leukozyten-Markers DC45 und von isotypischen Kontrollen. Sämtliche Marker zeigten die typischerweise erwartete Modulation mit Ausnahme von CD1a, was ein Merkmal von DCs zu sein scheint, die in Medium kultiviert werden, das mit menschlichem Plasma und nicht mit fötalem Kälberserum versetzt ist (Fig. 1).

1.2. Gemischte Leukozytenreaktion

Reife DCs wurden gemeinsam mit allogenen PBMCs kultiviert, um das Stimulationsvermögen von DCs zu analysieren. Es zeigte sich übereinstimmend, dass mit LPS/IFN- γ -Reifestimulus kontaktierte DCs eine Vermehrung von allogenen Lymphozyten auslösen konnten, die vergleichbar mit jener bei Verwendung der Superantigene SEA und SEB als Vermehrungsstimulus war (Fig. 2).

1.3. IL-12-Sekretion

Der DC-Kulturüberstand 24 Stunden nach der Behandlung mit LPS/IFN- γ -Reifestimulus wurde gesammelt und die Konzentration an heterodimeren Molekülen IL-12 p70. Die mittlere IL-12-

Konzentration lag bei $2,4 \pm 0,4$ ng/10⁶ DCs/ml (Fig. 3). DCs, die 2 Stunden lang reifen gelassen und 24 Stunden rekultiviert wurden, erzeugten nahezu die gleichen Mengen des Heterodimers IL-12 p70 wie DCs, die 24 Stunden reifen gelassen wurden.

2. In-vitro-Generierung von zytolytischer Immunität

DCs wurden mit von LCL-Lysat abgeleitetem löslichem Protein beladen und zur Stimulation von autologen T-Lymphozyten verwendet. Die Stimulation wurde in wöchentlichen Intervallen viermal wiederholt. Am Tag der Stimulation wurde die Zellenanzahl aufgezeichnet und der Prozentanteil von HTLs und CTLs bestimmt. Die zytolytische Aktivität der Kulturen wurde in einem CTL-Versuch am Tag 28 untersucht. Das Stimulationsvermögen von IL-12 sekretierenden „aktiven“ DCs wurde mit dem Stimulationsvermögen von „erschöpften“ DCs verglichen, die IL-12 nicht mehr freisetzen.

2.1. Antigen-spezifische Expansion von T-Lymphozyten

Bei Verwendung von aktiven DCs zur Stimulation wurde eine annähernd gleiche Antigen-spezifische Expansion von T-Lymphozyten, nämlich 531 ± 198 Millionen T-Lymphozyten, beobachtet, und bei Verwendung von erschöpften DCs zur Stimulation wurden 318 ± 228 Millionen T-Lymphozyten beobachtet (Fig. 4). Auch zu früheren Zeitpunkten wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Wachstumskinetik von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten beobachtet, auch wenn T-Lymphozyten, die aktiven DCs ausgesetzt wurden, die Tendenz hatten, siehe besser zu vermehren, als wenn sie erschöpften DCs ausgesetzt wurden.

2.2. Verteilung von T-Lymphozyten-Unterpopulationen während Antigen-spezifischer Expansion

Zu jedem Zeitpunkt der Restimulation wurde die Untergruppenverteilung von DC3-positiven T-Lymphozyten durch Immunphänotypisierung bestimmt (Fig. 5). Bei Verwendung von IL-12 sekretierenden, aktiven DCs ($n = 10$) wurde ein allmählicher Rückgang des Prozentanteils an CD4-positiven HTLs (von $77 \pm 4\%$ auf $44 \pm 7\%$) gleichzeitig mit einem relativen Anstieg von CD8-positiven CTLs (von $23 \pm 6\%$ auf $56 \pm 7\%$) beobachtet. Im Gegensatz dazu blieben bei Verwendung von erschöpften DCs ($n = 10$) zur Stimulation von T-Lymphozyten sowohl der Prozentanteil von HTLs ($79 \pm 4\%$ am Tag 7 und $73 \pm 3\%$ am Tag 28) als auch der Prozentanteil von CTLs (21 ± 4 am Tag 7 und $27 \pm 3\%$ am Tag 28) stabil. Das führte zu einem signifikant höheren Prozentanteil von HTLs bei einem Vergleich von mit erschöpften DCs stimulierten Kulturen mit mit aktiven DCs stimulierten Kulturen ($p = 0,0016$ am Tag 28). Die gegenteilige Wirkung wurde bei einem Vergleich des Prozentanteils an CTLs gefunden, der nach einer Stimulation mit aktiven DCs signifikant höher war als bei einer Stimulation mit erschöpften DCs ($p = 0,0016$ am Tag 28).

2.3. Zytolytische Aktivität von T-Lymphozyten nach Antigen-spezifischer Expansion

T-Lymphozyten würden mit LCL-Lysat behandelt, das mit IL-12 sekretierenden, aktiven DCs ($n = 3$) bzw. mit erschöpften, IL-12 nicht freisetzenden DCs ($n = 5$) beladen war. Die Kulturen wurden 4 Wochen lang wöchentlich restimuliert und am Tag 28 einer Analyse der zytolytischen Aktivität unterzogen. Die spezifische Lyse erreichte $55 \pm 9\%$ nach der Stimulation mit aktiven DCs im Vergleich zu $12 \pm 5\%$ nach der Stimulation mit erschöpften DCs ($p = 0,0034$) beim höchsten Effektor/Target-Verhältnis von 25/1. Dieselbe Tendenz zeigte sich bei einem Effektor/Target-Verhältnis von 12,5/1 ($27 \pm 7\%$ vs. $7 \pm 2\%$, $p = 0,0125$) und 6,25/1 ($30 \pm 8\%$ vs. $4 \pm 1\%$, $p = 0,0047$).

3. Analyse von dendritischen Zellen der Maus

3.1. Immunphänotyp

Mäuse-DCs wurden mit LPS/IFN- γ reifen gelassen, und es wurde der Immunphänotyp der unreifen und reifen DCs analysiert. MABs, die gegen CD11b, CD11c, MHC II, CD80, CD40, CD86 gerichtet waren, wurden zur Charakterisierung des Reifestatus der DCs verwendet. Der typische CD11b/CD11c-Phänotyp von reifen DCs wurde übereinstimmend nachgewiesen. Auch eine Aufwärtsregulierung der co-stimulierenden Moleküle CD80 und CD86 sowie von CD40- und MHC-II-Molekülen wurde gefunden.

3.2. IL-12-Sekretion

Der Gehalt an DC-Kulturüberstand wurde einen Tag nach der Behandlung mit LPS/IFN- γ -Reifestimulus auf die Anwesenheit von IL-12 untersucht. Die DCs wurden 2 Stunden nach der LPS/IFN- γ -Stimulation gewaschen und 24 Stunden lang in DC-Kulturmedium rekultiviert (aktive DCs) bzw. 24 Stunden im Medium ohne Entfernen von LPS und IFN- γ stehen gelassen (erschöpfte

DCs). Im Allgemeinen wurden etwa $2 \text{ ng}/10^6 \text{ DCs/ml}$ nachgewiesen (Fig. 8). DCs, die 2 Stunden gereift waren, erzeugten fast dieselbe Anzahl der Heterodimere IL-12 p70 wie DCs, die 24 Stunden gereift waren.

4. Induktion von tumorhemmender Immunität im Mäuse-Tumormodell

Aufgrund der erhaltenen Resultate, die auf die bedeutende Rolle von IL-12 bei der Induktion einer zytolytischen Immunantwort *in vitro* schließen lassen, wurde versucht, diese Daten *in vivo* zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurde ein Mäuse-Tumormodell konzipiert, das eine Immunisierung gegen ein spezifisches Modellantigen gestattete. Die Mäusetumor-Zelllinie K-Balb wurde konstruiert, um das Bakterienprotein NPT zu exprimieren, das dem Neomycin-Analog G418 Resistenz verleiht. Auch wurde rekombinantes NPT-Protein in einem Bakterien-Expressionssystem erzeugt und affinitätsgereinigt. Schließlich wurde eine Epitop-Vorhersage-Software zur Identifizierung von NPT-abgeleiteten nonameren Peptiden mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit an die Antigen-aufweisenden H-2b-Moleküle von DCs aus Balb-/Mäusen verwendet.

Unreife DCs wurde mit den synthetischen NPT-abgeleiteten nonameren Peptiden, rekombinantern NPT-Protein oder löslichem Protein beladen, das aus K-Balb-NPT-Zellen durch wiederholte Gefrier/Auflau-Verfahren erhalten worden war. Die beladenen DCs wurden 2 Stunden mit LPS/IFN- γ behandelt und Tieren in Gruppen zu 5 Mäusen als IL-12 sekretierende aktive DCs injiziert oder 24 Stunden mit LPS/IFN- γ reifen gelassen, gewaschen und als erschöpfte DCs, die ihr IL-12-Freisetzungsvermögen verloren hatten, injiziert. In Kontrollgruppen wurden Mäusen bestrahlte K-Balb-NPT-Tumorzellen, rekombinantes NPT-Protein, NPT-abgeleitete synthetische Peptide oder unbeladene DCs injiziert. Die immunisierten Mäuse wurden mit NPT-transgenen K-Balb-NPT-Zellen bzw. von K-Balb-Wildtyp-Zellen „gechallenged“, und das Tumorwachstum wurde überwacht (Fig. 9).

Unabhängig vom Immunisierungsschema entwickelten die von Wildtyp-K-Balb-Tumorzellen „gechallengten“ Mäuse progressiv wachsende Tumore. Dasselbe geschah bei den Kontrollgruppen mit Ausnahme von einer Maus nach der Immunisierung mit unbeladenen DCs. Von großer Bedeutung war, dass in den Gruppen von Mäusen, die mit IL-12 sekretierenden, aktiven DCs immunisiert und von K-Balb-NPT-Tumorzellen „gechallengt“ wurden, die meisten Mäuse den Tumor abwehren konnten (3/5 immunisiert mit DCs beladen mit K-Balb-NPT-Lysat, 5/5 immunisiert mit DCs beladen mit rekombinantern NPT-Protein, 4/5 immunisiert mit DCs beladen mit synthetischem Peptid). Im Gegensatz dazu waren fast alle Mäuse, die mit erschöpften DCs immunisiert waren, nicht in der Lage, K-Balb-NPT-Tumore abzuwehren (1/5 immunisiert mit DCs beladen mit K-Balb-NPT-Lysat, 0/5 immunisiert mit DCs beladen mit rekombinantern NPT-Protein, 1/5 immunisiert mit DCs beladen mit synthetischem Peptid). Sämtliche mit K-Balb-Wildtyp-Tumor-Zellen „gechallengte“ Mäuse entwickelten progressiv wachsende Tumore, was beweist, dass eine Antigen-spezifische Abwehr-antwort vorlag, die auf das von K-Balb-NPT-Tumorzellen exprimierte NPT-Protein abzielten.

Phase-I-Studie zum Nachweis der Eignung und fehlenden Toxizität eines Immuntherapeutiks mit IL-12 sekretierenden DCs

Für diesen Studie wurden an soliden pädiatrischen Malignomen leidende Patienten, die keine konventionellen Behandlungsmöglichkeiten mehr hatten, aufgenommen. Die Hauptziele waren die Bestimmung der Eignung und Toxizität von DC-ATIT. 20 Patienten stellten sich für diese Studie zur Verfügung und 12 beendeten die Behandlung. Die einzelnen DC-ATIT-Immuntherapeutika erfüllten alle Qualitätskriterien einschließlich eines für die Freisetzung von unreifen bzw. reifen DCs zu 1 bis $5 \text{ ng IL-12}/10^6 \text{ DCs/ml}$ typischen Immunphänotyps und eines guten Stimulationsvermögens in einer gemischten Leukozytenreaktion. Das DC-ATIT-Immuntherapeutikum konnte in ausreichender Menge generiert werden, um den Behandlungsplan zu vollenden.

Tabelle 1
Patienten bei der klinischen Phase I-DC-ATIT-Studie

50	Patient	Diagnose	Alter	Geschlecht	Zyklen
	SH001	Hepatozelluläres Karzinom	15	M	3
	TM002	Osteosarkom	21	M	3
55	JS003	Hepatozelluläres Karzinom	10	F	1

	Patient	Diagnose	Alter	Geschlecht	Zyklen
5	BG004	Osteosarkom	17	F	1
	AE005	Osteosarkom	8	M	3
	MR006	Renalzellenkarzinom	7	M	3
	SiH007	Ewing-Sarkom	22	F	3
10	SA008	Hepatozelluläres Karzinom	13	M	2
	LS009	Non-Hodgkin-Lymphom	14	M	0
	BT010	Neuroblastom	20	F	0
	AR011	Wilms-Tumor	11	F	3
15	JS012	Renalzellenkarzinom	16	F	3
	SH(2)013	Hepatozelluläres Karzinom	15	M	3
	RC014	Wilms-Tumor	12	F	3
	JS(2)015	Renalzellenkarzinom	16	F	3
20	NH016	Ewing-Sarkom	13	F	0
	TP017	Ewing-Sarkom	22	M	0
	GK018	Osteosarkom	15	M	0
	MK019	Osteosarkom	10	F	3
	LS020	Osteosarkom	13	F	3

25 Die Behandlung wurde gut vertragen und konnte ambulant durchgeführt werden. Es wurden keine größeren toxischen Nebenwirkungen der Behandlung beobachtet. Schwaches Fieber, am ehesten aufgrund der einhergehenden IFN- γ -Behandlung, die mit der Absicht einer in-situ-Aufwärtsregulierung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen angewendet wurde, konnte mit Antipyretika unter Kontrolle gebracht werden. Jucken an der Injektionsstelle der DCs wurde lokal mit Antihistaminika behandelt.

30 Als in-vivo-Untersuchung hinsichtlich der Antwort auf die DC-ATIT wurde ein Test zur Hypersensibilität vom verzögerten Typ durchgeführt. Patienten wurden intradermal bestrahlte autologe Tumorzellen oder das Tracer-Antigen KLH sowie eine Mediumkontrolle und eine Negativkontrolle injiziert. Alle Patienten, die die Behandlung zu Ende führten, zeigten eine positive Antwort auf KLH. 35 Das liefert überzeugende Beweise, dass die DC-ATIT sehr wohl Immunität auslösen kann. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch keine tumorhemmende Immunität detektiert werden. Die Kontrollinjektionen führten zu keiner Antwort.

40 Sämtliche Patienten befanden sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und hatten eine Krankengeschichte mit umfangreichen Chemo- und Radiotherapien sowie wiederholten operativen Eingriffen. Es wurde also kein objektiver Tumorrückgang bei diesem Test beobachtet. Bei mehreren Patienten stabilisierte sich die Krankheit jedoch über einen längeren Zeitraum.

DISKUSSION

45 Die erfolgreiche Induktion von IL-12-Sekretion durch DCs scheint eine Schlüsselrolle bei der Generierung einer Typ-1-HTL-Antwort zu spielen, die die tumorhemmende CTL-Aktivität unterstützt [Cella, 1996]. Als Antwort auf LPS erzeugen DCs IL-12 nur vorübergehend bis etwa 18 bis 20 Stunden nach der Reifung [Langenkamp, 2000]. DCs, die zu frühen Zeitpunkten nach der Reifeinduktion entnommen werden, induzieren somit eine starke Typ-1-HTL-Polarisation, wohingegen die gleichen Zellen, zu einem späteren Zeitpunkt entnommen, Typ-2-HTL-polarisierte Zellen „primen“. 50 Diese Erkenntnisse weisen auf eine dynamische Regulierung der Generierung einer Effektorzellfunktion hin.

55 Es wurde beobachtet, dass IL-12 sekretierende, aktive DCs in der Lage waren, die Expansion von CTLs und HTLs gleichermaßen zu triggern. Im Gegensatz dazu bewirkten erschöpfte DCs, die ihre Fähigkeit, IL-12 freizusetzen, verloren hatten, in erster Linie die Expansion von HTLs. Daher erlangten T-Lymphozyten, die durch Behandlung mit aktiven DCs, nicht aber mit erschöpften DCs

- „geprämt“ wurden, die Fähigkeit der Antigen-spezifischen Lyse von Zielzellen. Zwei Modellsysteme wurden zum Nachweis dessen verwendet. Das eine war ein menschliches in-vitro-Modell, bei dem mit löslichem Protein aus EBV-transformierten LCLs beladene DCs zur Stimulation von autologen T-Lymphozyten verwendet wurden. In diesem System konnte die Antigen-spezifische Lyse von LCLs gezeigt werden. Das zweite Modell war ein Mäuse-Tumormodell. Es wurde gefunden, dass Mäuse nach der Immunisierung mit aktiven, nicht aber mit erschöpften Antigen-beladenen DCs gegen Tumor-“Challenge“ geschützt waren. Weiters wurde eine klinische Phase-I-Pilotstudie gestartet, um den Nachweis der Eignung von IL-12 sekretierenden DCs und ihrer fehlenden Toxizität zu erbringen.
- 10 Zytolytische Immunantworten, die durch CTLs vermittelt werden, hängen von einer Antigen-Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle ab, die ihre antigenen Peptide von Zytoplasmabproteinen ableiten, u.zw. entweder von endogen synthetisierten Selbst-Proteinen oder von Nichtselbst-Proteinen während einer intrazellulären Infektion. Geht es nach aktuellen Paradigmen, so können nur professionelle Antigen-präsentierende DCs eine primäre Immunantwort induzieren. DCs müssen somit Nichtselbst-Antigene aus infizierten Körperzellen aufnehmen, um diese an CTLs zu präsentieren, wenn sie selbst nicht infiziert sind und diese Antigene endogen synthetisieren müssen oder können. Eine Fülle von Beweismitteln unterstützen jedoch die Auffassung, dass in DCs exogen abgeleitete und gesampelte Antigene in erster Linie in den Präsentationspfad von MHC-Klasse-II-Antigenen eingeleitet werden. Um diesen offensichtlichen Widerspruch zu beseitigen, wurde das Konzept der Kreuzpräsentation erstellt. Unterstützt durch Resultate in vitro und in vivo impliziert es die Präsentation von exogen abgeleiteten Antigenen im Präsentationspfad vom MHC-Klasse-I-Antigen durch DCs. In neuester Zeit wird die Bedeutung der Kreuzpräsentation aber kontroversiell diskutiert.
- 15 Jüngst wurden DCs, die ex vivo mit Tumor-assoziierten oder Virus-abgeleiteten Antigenen beladen wurden, für therapeutische Zwecke in der tumorhemmenden Immuntherapie oder adoptiven Immuntherapie für Virusinfektionen bei immungeschädigten Patienten verwendet. In diesem Zusammenhang ist die Kreuzpräsentation von zentraler Bedeutung, da häufig Antigene als lösliche Proteine angewendet werden. DCs, die diesen Antigenen ausgesetzt werden, nehmen sie durch Phagozytose auf, und ohne Kreuzpräsentation würden sie ausschließlich im MHC-Klasse-II-Pfad verarbeitet werden und somit keine zytolytische Immunität bewirken. Die Bedingungen, die eine Kreuzpräsentation begünstigen, sind jedoch kaum definiert, und das meiste Beweismaterial für die Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen an CTLs, die zu einer zytolytischen tumorhemmenden oder virushemmenden Immunität führt, ist indirekt.
- 20 Bei der tumorhemmenden und virushemmenden Immunität wurde der Rolle von CTLs die meiste Aufmerksamkeit gewidmet, weil die meisten mit Tumoren oder Viren infizierten Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle, nicht aber MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren. Darüber hinaus können CTLs-Zellen direkt bei der Erkennung von Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen lysieren, und es wurde ihre Fähigkeit nachgewiesen, große Massen in vivo zu zerstören. Diese Bevorzugung wurde durch adoptive Transferstudien bestärkt, bei denen CTL-Linien und -Klone, die spezifisch für MHC-Klasse-I-restringierte Antigene sind, welche in vitro stimuliert wurden, tumorhemmende oder virus-hemmende Immunität vermitteln können, wenn sie in Tumore aufweisende Wirts zurück transferiert werden. Weiters deuten jüngste Berichte darauf hin, dass eine Immunisierung unter Verwendung von auf DCs geladenen Tumorpeptiden zu einer produktiven tumorhemmenden [Nestle, 2001] sowie virushemmenden Immunität [De-Bruijn, 1998] führen können.
- 25 Eine Schlussfolgerung, die durch die vorliegende Erfindung nahegelegt wird, ist, dass aktive DCs zu frühen Zeitpunkten nach der Reifung mit LPS/IFN γ die Voraussetzungen für eine Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen an CTLs erfüllen. Im Gegensatz dazu scheinen erschöpfte DCs diese Fähigkeit verloren zu haben. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Freisetzung von IL-12 als Marker für aktive DCs verwendet [Langenkamp, 2000]. Es ist jedoch denkbar, dass die Wirkung von IL-12 auf CTLs durch Typ-1-polarisierte HTLs vermittelt wird, die ihrerseits Kreuzpräsentation, CTL-Expansion und zytolytische Aktivität unterstützen. Eine erfolgreiche Antwort von T-Lymphozyten gegen intrazelluläre Antigene wie Virus-abgeleitete Antigene oder Tumor-assoziierte Antigene beruht sowohl auf CTLs als auch auf HTLs. HTLs wurde jedoch weniger Aufmerksamkeit geschenkt, was angesichts der zentralen Rolle dieser Zellen bei der Regulierung der meisten Antigen-spezifischen Immunantworten bemerkenswert ist. Man dachte zwar schon

lange daran, dass die Hilfe von HTLs bei der Entwicklung von CTLs über die Entstehung von Lymphokinen erfolgt, doch zeigen jüngere Resultate, dass ein kritischer Pfad zur Bereitstellung von Hilfe für CTLs, die von HTLs abhängig ist, DC als Mittler verwendet. Insbesondere Wechselwirkungen zwischen DC40L und CD40 an HTL und an DCs erscheinen kritisch bei der Aktivierung der DCs, Antigene an CTL-Vorläufern zu präsentieren und ihr „Priming“ zu stimulieren. Bei diesem Szenario stellen die DCs die kritischen Leitungen zwischen HTLs und CTLs dar, die spezifisch für Epitope sind, welche mit MHC Klasse II bzw. MHC Klasse I restriktiv werden. Diesbezüglich erscheint die Erkenntnis einer annähernd äquivalenten Amplifikation von HTLs und CTLs nach der Stimulation mit aktiven, nicht aber mit erschöpften DCs besonders bedeutungsvoll.

Aufgrund überzeugender Resultate in beiden Modellsystemen, die gemäß der vorliegenden Erfindung zum Einsatz gelangten, wurde eine klinische Phase-I-Pilotstudie gestartet. Patienten, die an fortgeschrittenen soliden kindlichen Malignomen litten, wurden mit aktiven, IL-12 freisetzenden autologen DCs behandelt, die mit vom Tumor des Patienten abgeleitetem löslichem Protein beladen waren. Klinische Studien unter Verwendung von mit Tumor-Antigen beladenen DCs wurden für verschiedene neoplastische Erkrankungen durchgeführt. Die bei diesen Studien verwendeten DCs waren jedoch entweder unreif oder mit TNFa gereift. Solche DCs sind nicht in der Lage, IL-12 freizusetzen. Somit sind diese DCs angesichts der vorliegenden vorklinischen Versuche als den IL-12 sekretierenden DCs unterlegen anzusehen, die bei der vorliegenden Studie verwendet wurden. Sämtliche Patienten dieser Studie hatten eine fortgeschrittene Krankheit und eine Krankengeschichte mit umfangreichen Chemo- und Radiotherapien. Es wurde also kein objektiver Tumerrückgang bei diesen Patienten beobachtet. Bei mehreren Patienten stabilisierte sich die Krankheit jedoch über einen längeren Zeitraum. Die Toxizität der Behandlung mit dem vorliegenden DC-Immuntherapeutikum war minimal.

Zusammenfassend wurde sowohl in einem menschlichen in-vitro-Modell als auch in einem Mäuse-in-vivo-Tumormodell gefunden, dass IL-12 sekretierende, aktive DCs kurz nach der Reifung im Gegensatz zu erschöpften DCs, die ihre Fähigkeit, IL-12 zu späteren Zeitpunkten freizusetzen, verloren hatten, die Generierung von zytolytischen Immunantworten in vitro unterstützen. Aktive DCs sind zu einer Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen an CTLs fähig, wohingegen erschöpfte DCs diese Fähigkeit nicht haben. Die Expansion und zytolytische Aktivität von CTLs hängt kritischerweise von der Anwesenheit von IL-12 ab. Die mit der vorliegenden Erfindung gelieferten Ergebnisse sind von Bedeutung für die adoptive Behandlung von Virusinfektionen bei immungeschädigten Patienten mit ex-vivo-expandierten Antigen-spezifischen T-Lymphozyten. In einer klinischen Phase-I-Pilotstudie wurde die Eignung und fehlende Toxizität einer Behandlung von neoplastischen Erkrankungen mit dem vorliegenden DC-Immuntherapeutikum aufgezeigt.

Quellenangaben:

- Cella M et al., J. Exp Med 184:747, 1996
- Hilkens CM et al., Blood 90:1920, 1997
- Langenkamp A et al., Nat Immunol 1:3116, 2000
- Nestle FO et al., Nat Med 7:7615, 2001
- De-Bruijn ML et al., Cancer Res 58:724, 1998

45

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verwendung von Interleukin 12 (IL-12) freisetzenden aktiven dendritischen Zellen (DCs), die mit einem Antigen gegen ein spezifisches Pathogen oder einen spezifischen Tumor beladen sind, und aufgrund der Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon-gamma (IFN- γ) IL-12 freisetzen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Patienten mit einer Infektion mit diesem spezifischen Pathogen oder zur Behandlung eines Patienten mit diesem spezifischen Tumor.
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Behandlung nach einer Knochenmarktransplantation durchgeführt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der spezifische

- Tumor ein fortgeschrittenes Malignom ist.
- 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DCs DCs sind, die dem Patienten mit einer Infektion mit dem spezifischen Pathogen oder dem Patienten mit dem spezifischen Tumor oder dem Knochenmarkspender entnommen sind.
 - 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DCs mit einem Antigen aus einer Tumorzelle vom Patienten, der diesen spezifischen Tumor hat, beladen sind.
 - 6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DCs zusätzlich mit einem Tracer-Antigen beladen sind.
 - 10. 7. Verwendung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Tracer-Antigen „Key-hole-Limpet“-Hämocyanin (KLH) ist.
 - 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DCs zusätzlich mit einem Adjuvans, insbesondere Tetanustoxoid, beladen sind.
 - 15. 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die DCs in vitro aus mononuklearen peripheren Blutzellen (PBMCs) hergestellt sind.

HIEZU 9 BLATT ZEICHNUNGEN

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

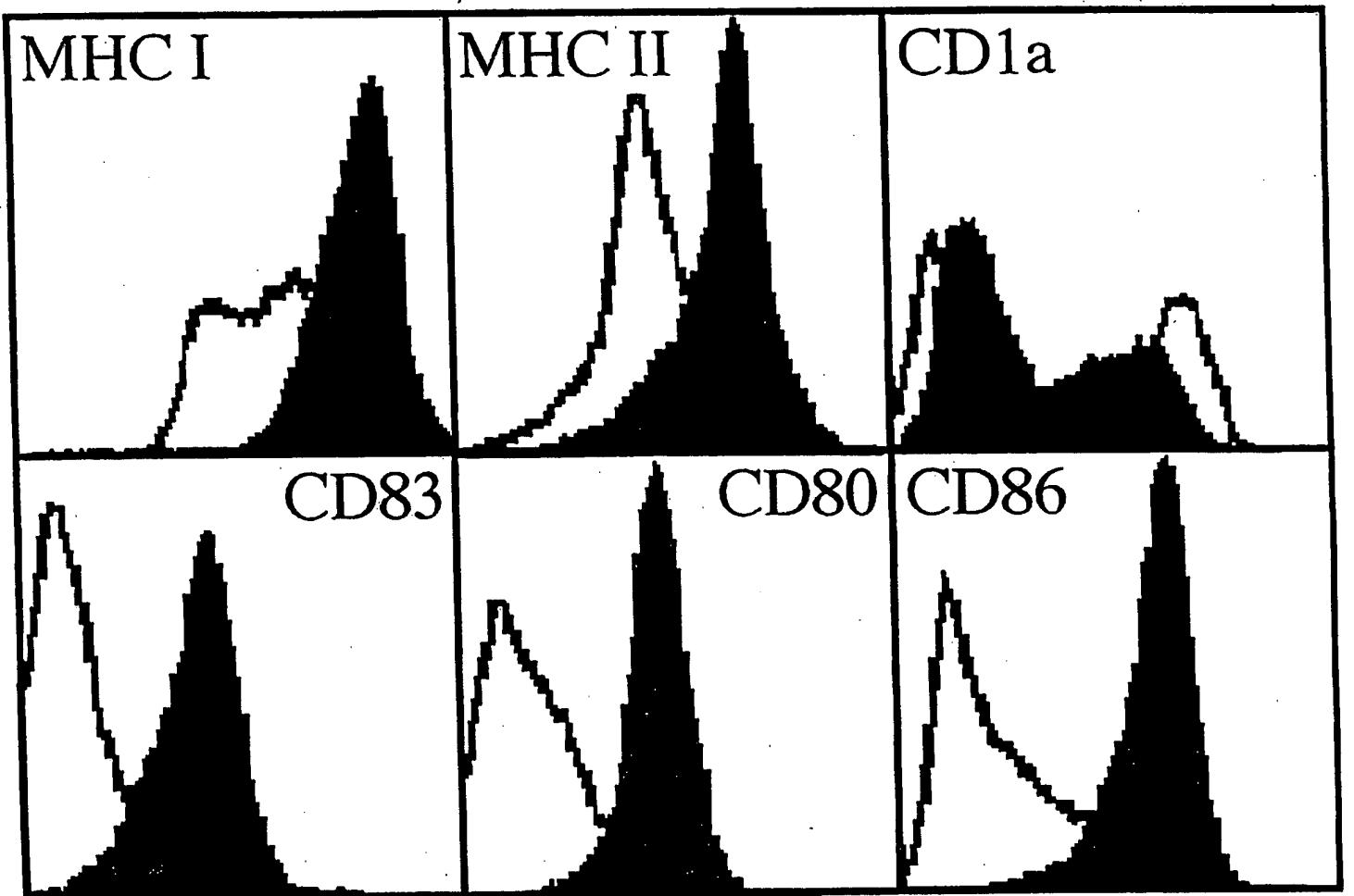


Fig. 2

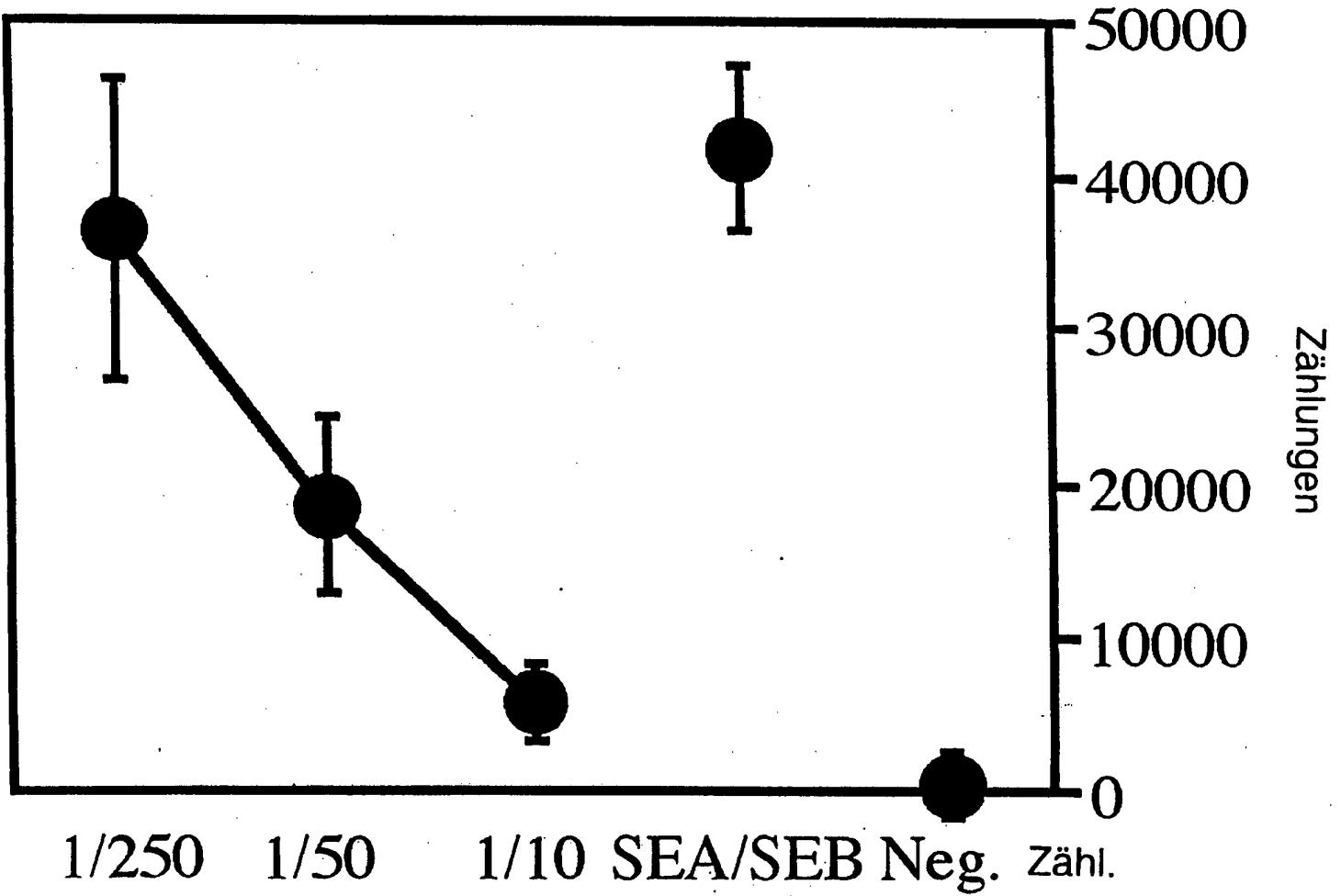


Fig. 3

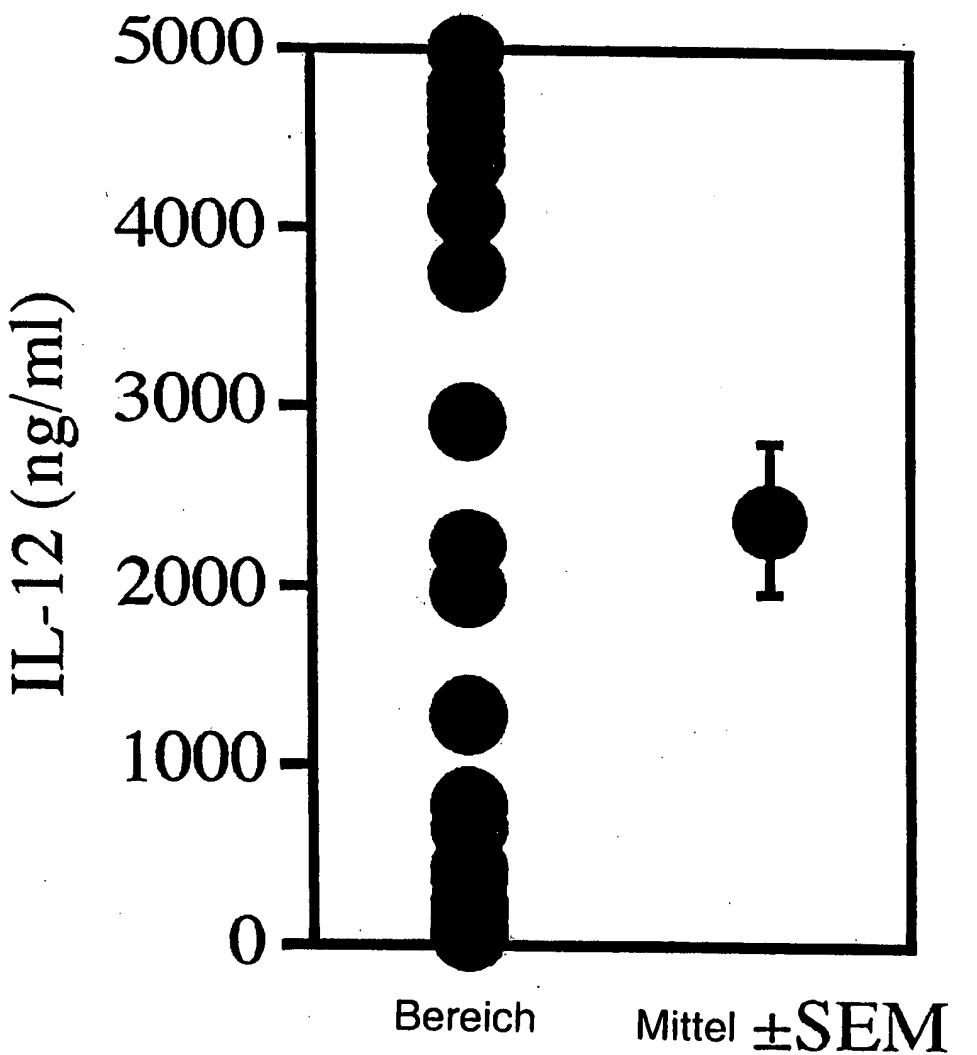


Fig. 4

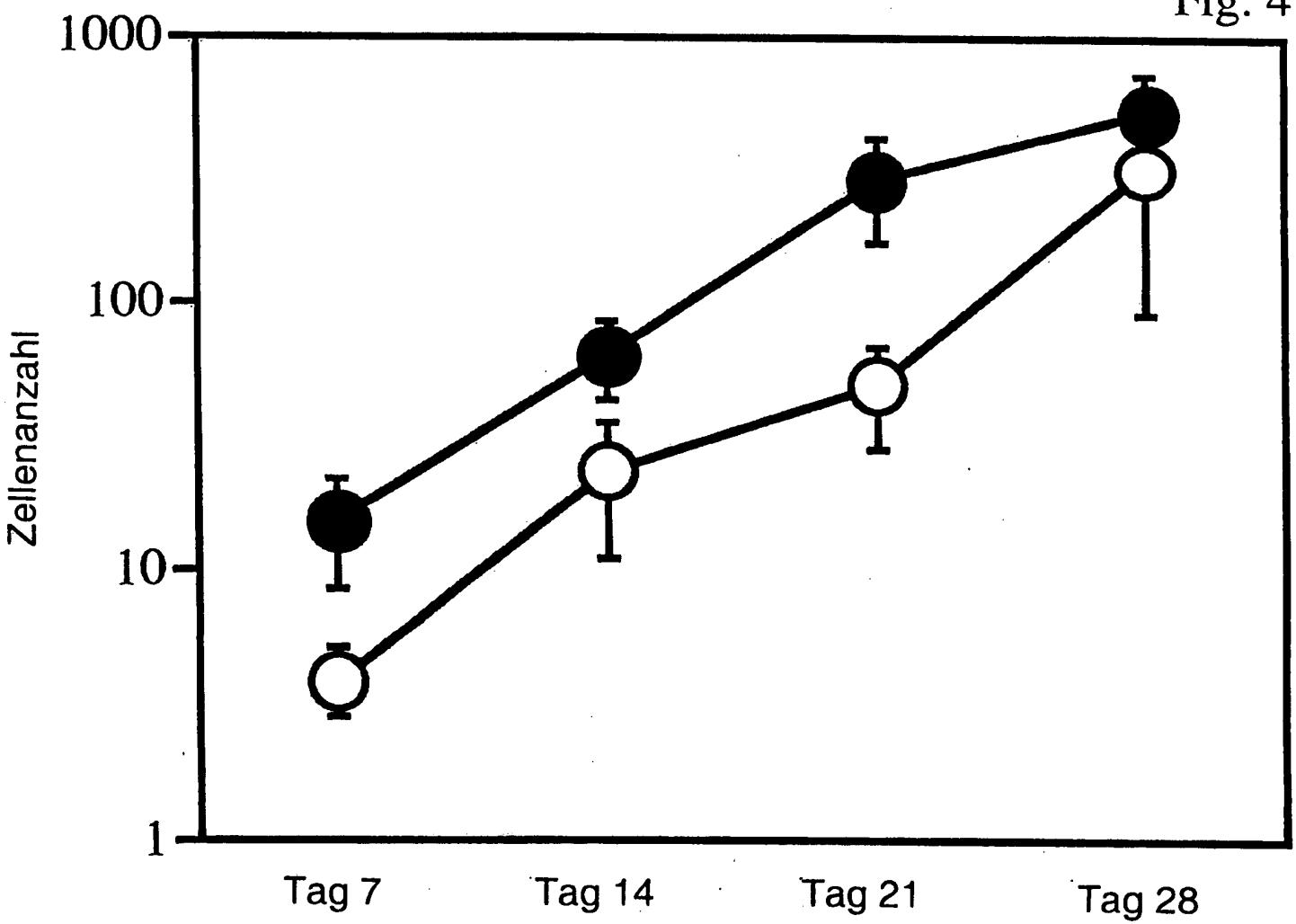


Fig. 5

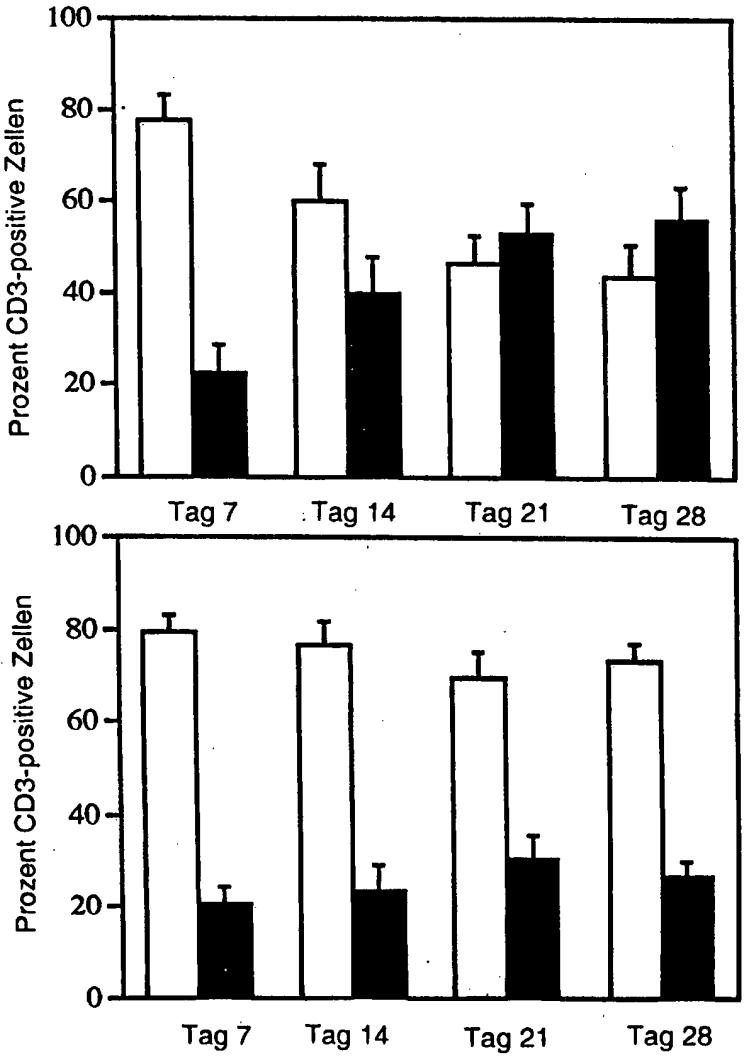


Fig. 6

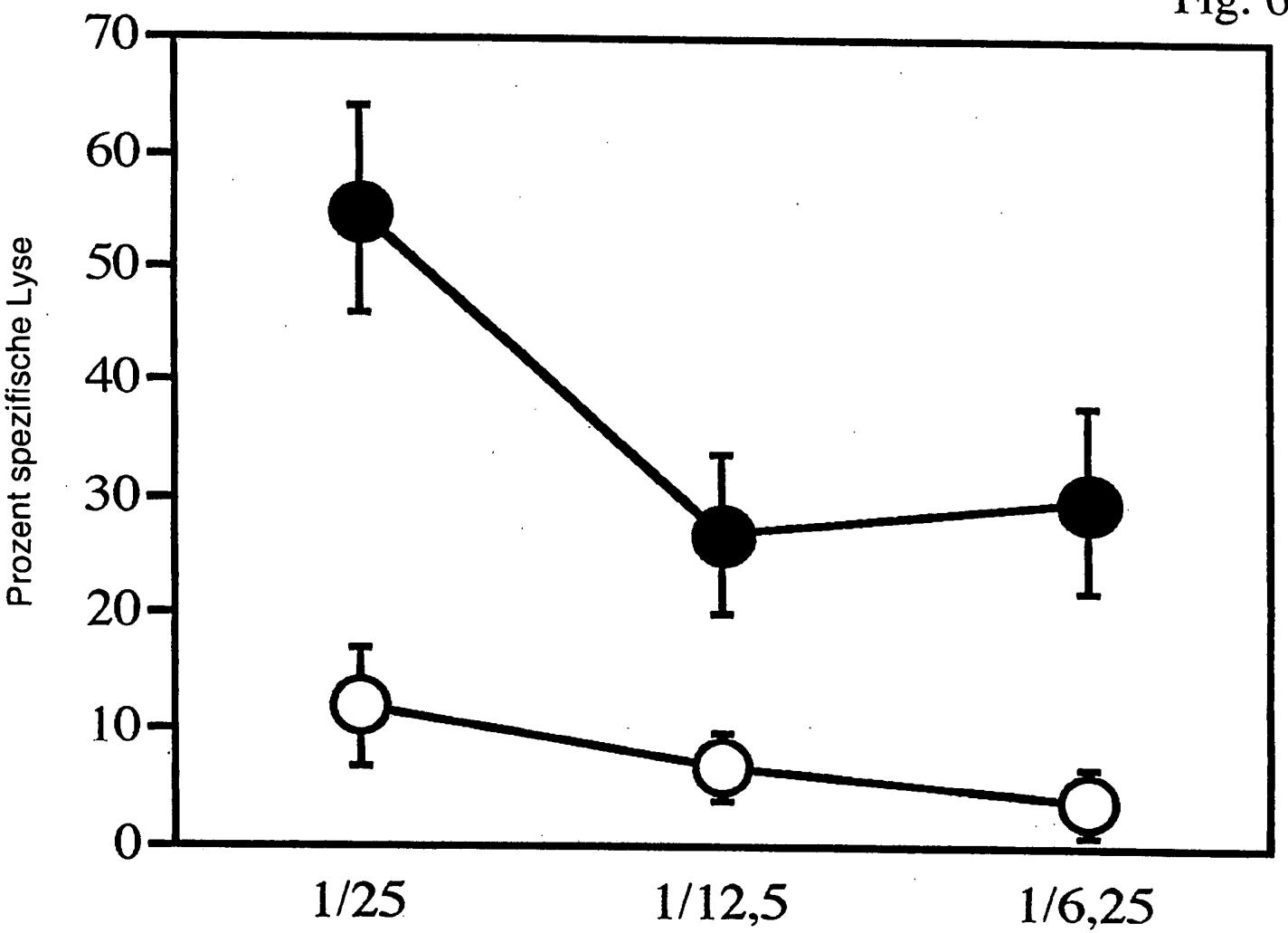


Fig. 7

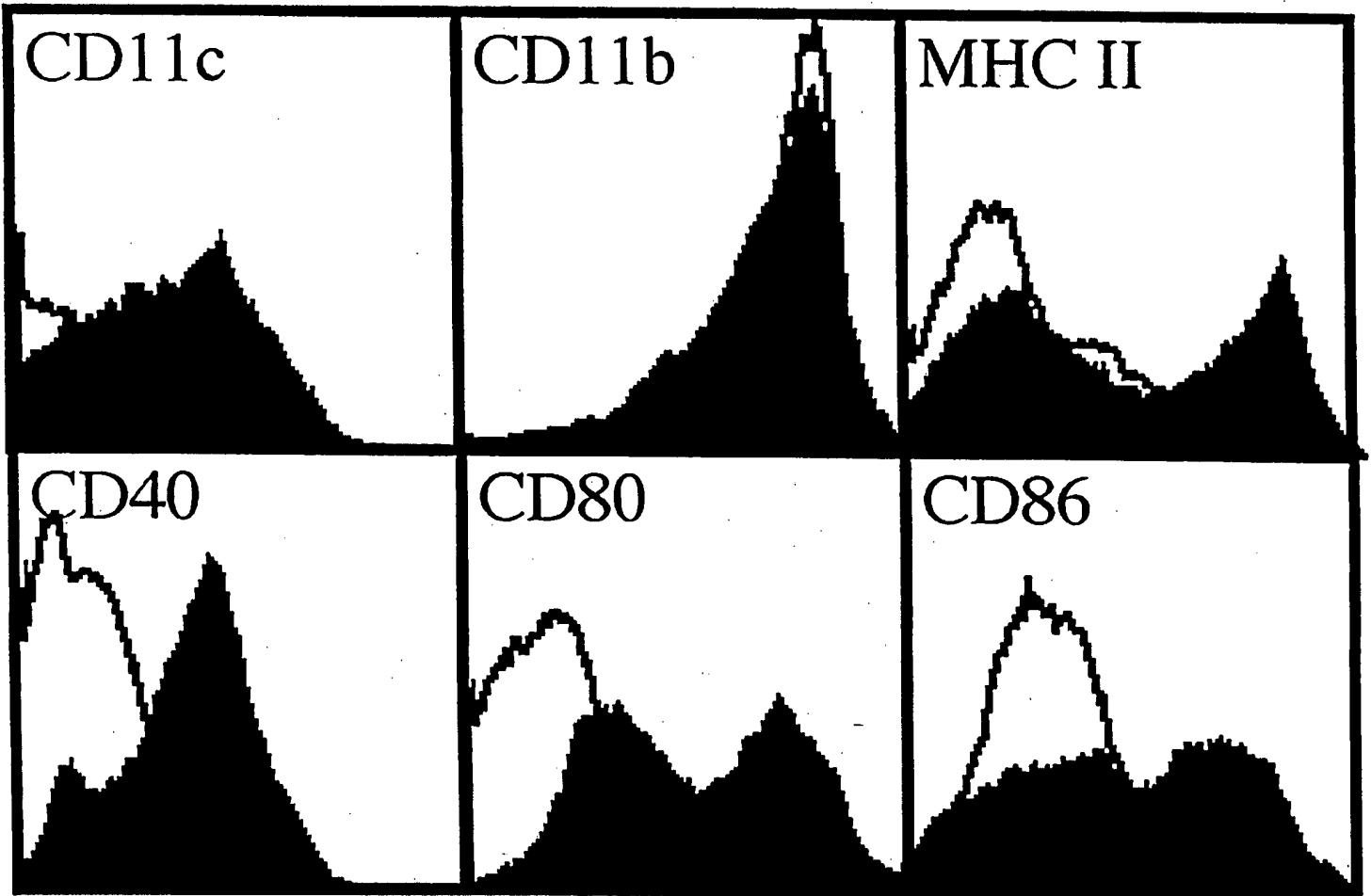


Fig. 8

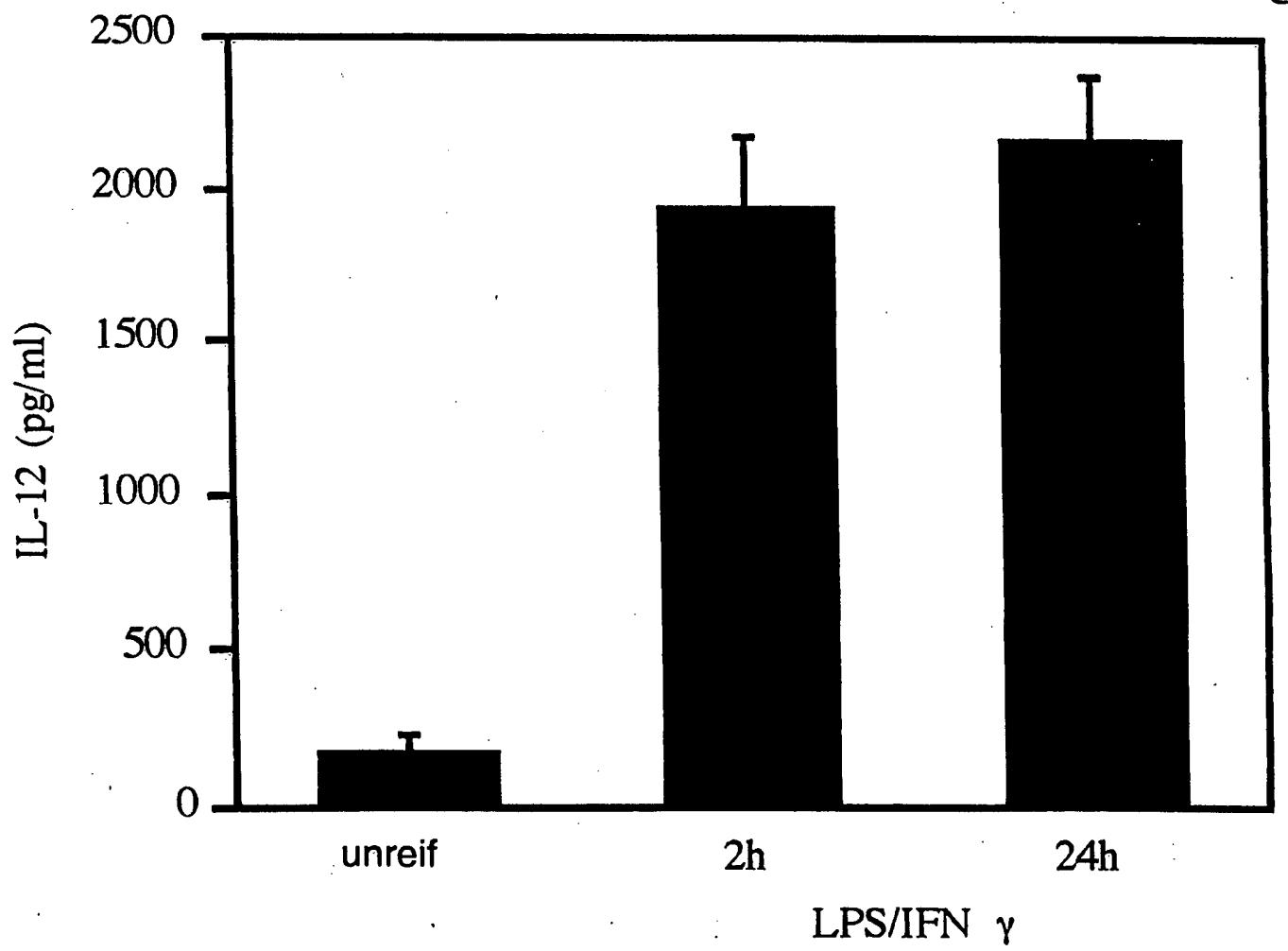


Fig. 9

