

4 Diskussion

MODC-basierte Immuntherapien

Dendritische Zellen (DC) sind die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie können Immunreaktionen auslösen und modulieren, entweder durch Stimulation von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern oder T-Zellen zur Kontrolle der zellvermittelten Immunität (Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998). Die Kultur von humanen DC kann aus CD 34⁺ Knochenmarkstammzellen, Monozyten oder lymphoiden Vorläuferzellen erfolgen (Inaba et al., 1992; Shortman et al., 1997; Sallusto et al., 1994; Romani et al., 1996; Ardavin et al., 1993). Insbesondere die Herstellung von MODC aus isolierten Monozyten durch GM-CSF- und IL-4-Zugabe bietet eine praktikable Methode, um DC für eine klinische Anwendung in ausreichender Menge herzustellen. Der therapeutische Einsatz dieser Zellen wäre vielfältig, scheinen MODC doch die Möglichkeit zu bieten, selektiv die T_{H1}- und T_{H2}- Aktivierung zu manipulieren, spezifische T-Zell-Immunität gegen virusinfizierte Zellen oder Tumoren hervorzurufen oder Toleranz zu induzieren (Suss und Shortman, 1996; Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998; Lanzavecchia, 1998). Die klinische Anwendung setzt jedoch ein standardisiertes, einfaches und verlässliches Protokoll zur Isolierung großer MODC Mengen voraus.

Gegenwärtig existieren mehrere Protokolle, die eine Kultur von MODC aus adhärennten Monozyten durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 zur Grundlage haben, jedoch in wichtigen Detailfragen Unterschiede aufweisen (Romani et al., 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Alijagic et al., 1995; Romani et al., 1996 und Thurnher et al., 1997). Daher wurde in dieser Arbeit versucht, ein optimiertes Protokoll für die Kultur von MODC mit GM-CSF und IL-4 zu erarbeiten. Es sollte in Hinblick auf einen klinischen Einsatz der MODC möglichst sicher (geringe Kontaminationsgefahr), standardisiert, einfach in der Handhabung sein sowie gleichzeitig eine hohe Reinheit und Ausbeute an MODC gewährleisten. So konnte ein optimierter Waschschrift nach der Anheftungsphase für die mononukleären Zellen als mitentscheidend für die Qualität der Präparation identifiziert werden, während sich durch Veränderungen der Medienwechsel und Zytokinzugaben oder die Verwendung verschiedener Oberflächenmaterialien im Anheftungsschritt keine signifikante Verbesserung der Präparation erreichen ließ. Ohne Qualitätseinbußen konnte im Vergleich zu anderen Protokollen mit einer

Reduzierung des Arbeitsaufwandes für die Zellkultur zusätzlich die Kontaminationsgefahr verringert werden. Enorme Bedeutung für den Reinheitsgrad und die Ausbeute der isolierten MODC hatte der Waschschrift, bei dem durch die Standardisierung eine gute Reproduktion der Ergebnisse erreicht wurde. Das vorliegende Protokoll zur MODC-Präparation bietet somit im klinischen Alltag eine verlässliche Grundlage für qualitativ und quantitativ hochwertige MODC-Präparationen mit 70% - 95% CD 1a⁺ Zellen.

Die DC wurden aufgrund ihrer typischen Morphologie und dem Muster ihrer Oberflächenantigene identifiziert. Unreife MODC sind durch die Expression von CD 1a, costimulierenden (CD 80 / CD 86) und antigenpräsentierenden Molekülen sowie die Abwesenheit spezifischer Lymphozyten- und Makrophagenmarker gekennzeichnet (Romani et al., 1996). Mit dem vorliegenden Protokoll konnte eine vergleichsweise hohe Reinheit (70% - 95% CD 1a⁺ Zellen) der MODC-Präparationen bei sehr geringer Kontamination (< 10%) mit Lymphozyten und Makrophagen erreicht werden. Die Zahl der isolierten MODC (5 - 10 x 10⁶ MODC / 100 ml Blut) lag jedoch etwas unter den in anderen Protokollen beschriebenen Werten. Ein wichtiger Grund hierfür ist in der umfangreichen Waschprozedur nach dem Anheftungsschritt zu suchen, da ein hoher Reinheitsgrad der Präparationen auch eine erhöhte Anzahl von Waschschriffen zur Entfernung kontaminierender Zellen erforderte.

Mit der Möglichkeit, humane MODC aus peripherem Blut zu kultivieren, stehen ausreichende Zellzahlen für eine klinische Anwendung zur Verfügung. Gegenwärtig verfolgt ein großer Teil der Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der DC das Ziel, die außergewöhnlichen Fähigkeiten dieser Zellen für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen einzusetzen. Eine Auslösung spezifischer T-Zell-Antworten durch Immunisierung mit Tumorantigen-beladenen DC und resultierender Tumor-Regression oder Eradikation konnte bereits im Tiermodell und mehreren Phase I / II Studien beim Menschen nachgewiesen werden. Bei Immunisierungen mit humanen DC gegen maligne Melanome (Turner et al., 1999; Mackensen et al. 2000), Prostatakarzinome (Tjoa et al., 1998; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000), Kolonkarzinom-Metastasen (Specht et al., 1997), Nierenzellkarzinome (Rieser et al., 2000; Holtl et al., 1999), Zervixkarzinome (Santin et al., 1999) und Mammakarzinome (Alters et al., 1997) liegt der Focus hauptsächlich auf Neoplasien, für die definierte Tumorantigene bekannt sind.

Über den optimalen Applikationsweg antigenbeladener MODC in der Immuntherapie herrscht gegenwärtig noch Uneinigkeit. Subkutane und intralymphatische DC-Applikationen lösten in der Therapie humaner Karzinome suffiziente Immunreaktionen in vitro und in vivo aus. Auch

die hohe Effektivität einer intravenösen Injektion konnte demonstriert werden (Hsu et al., 1996). DC können nach Migration in das lymphatische Gewebe naive T- und B-Zellen durch Zytokinsekretion anlocken (Adema et al., 1997) und die Lebensfähigkeit rezirkulierender Lymphozyten erhalten (Brocker, 1997). Subkutane und intralymphatische Injektionen führten zur Ansammlung der DC vorwiegend in den regionären Lymphknoten, während eine intravenöse Gabe von DC eine Ansammlung zuerst in der Lunge und anschließend in Leber, Milz und Knochenmark bewirkte (Morse et al., 1999a; Eggert et al., 1999). Neuere Erkenntnisse belegen für die intradermale Injektion eine rasche Migration der DC in regionäre Lymphknoten, die der subkutanen Injektionsform überlegen war (Morse et al., 1999). Zukünftige Konzepte der Immuntherapie könnten somit die intradermale Injektion favorisieren. Die aktive Immuntherapie mit DC stützt sich im wesentlichen auf die regionären Lymphknoten als primären Ort der spezifischen Erkennung des Antigens und der nachfolgenden Aktivierung des Immunsystems. Die große Bedeutung der regionären Lymphknoten für eine DC-Immuntherapie wird durch Ergebnisse unterstrichen, die für eine radikale chirurgische Entfernung der Lymphknoten bei Tumoroperationen einen merklich negativen Einfluss auf eine postoperative Immuntherapie nachgewiesen haben (Santin, 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verteilung von DC in verschiedene Bereiche des lymphatischen Gewebes maßgeblich durch die Art der Applikation bestimmt wird. Unklar verbleibt, ob die Anreicherung der DC in verschiedenen lymphatischen Geweben auch eine Beeinflussung ihrer funktionellen Aktivität bewirkt. In der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Fallstudie (Immuntherapie eines NSD-Karzinoms) erfolgte aufgrund der bei Therapiebeginn vorliegenden Erkenntnisse die Applikation der MODC zu gleichen Teilen subkutan und intralymphatisch (als Injektion in einen lokalen Lymphknoten oder den lymphknotennahen Bereich).

Für die antigenspezifische Immuntherapie mit MODC ist eine effektive Beladung der Zellen mit dem Antigen eine wichtige Voraussetzung. Während unreife DC eine starke phagozytische Aktivität für lösliche Antigene aufweisen, beenden ausgereifte DC die Antigenaufnahme (Reis e Sousa et al., 1993; Inaba et al., 1993). Ausgereifte DC können phagozytiertes Antigen über HLA Klasse I und II-Moleküle präsentieren und haben sich als potente Stimulatoren von CD 4⁺ und CD 8⁺ T-Zellen erwiesen (Sauter et al., 2000). Während der Mechanismus der Antigenpräsentation mit HLA Klasse II-Molekülen über den Weg der MIICs (MHC class II-rich compartments) gut dokumentiert ist (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997), herrscht bisher Unklarheit über den Mechanismus, der DC die Präsentation

exogener Antigene mit HLA Klasse I-Molekülen erlaubt (Bender et al., 1995; Albert et al., 1998).

Die aus Antigenfragmenten und HLA-Molekülen gebildeten Komplexe bleiben über Tage stabil und können im Zusammenspiel mit costimulierenden Molekülen und Zytokinsekretion die Auslösung einer antigenspezifischen Immunantwort bewirken (Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997).

Eine DC-basierte Immuntherapie fordert eine möglichst wirksame Beladung der Zellen mit Antigen. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit zeitabhängige Antigenbeladung und die Auswirkungen auf die Reaktion verschiedener T-Zell-Subpopulationen bestimmt werden. Eine Verlängerung der Zeitspanne für die Phagozytose des zugefügten Antigens um 24 oder 48 Stunden hatte im Vergleich zur simultanen Applikation von Antigen und Ausreifungsstimulus keine Auswirkung auf die T-Zell-stimulatorische Wirkung der MODC. Der Versuch, die endozytotischen Vesikel mit dem zugefügten Antigen aufzusättigen, um nach Ausreifung der MODC eine erhöhte Anzahl von HLA-Molekül / Antigen Komplexen zu erhalten, konnte somit keine verstärkte T-Zell-Stimulation bewirken. Die MODC bewirkten auch keine direkte Stimulation von CD 8⁺ T-Zellen. Hierfür scheint eine vorhergehende Aktivierung der MODC durch CD 4⁺ T-Zellen erforderlich zu sein (Baxevanis et al., 2000), um eine „Lizenzierung“ der MODC zur autonomen Auslösung zytotoxischer Immunantworten zu erreichen (Lanzavecchia, 1998).

Die Resultate unterstreichen erneut die äußerst effektive Aufnahme und Präsentation kleinster Antigenmengen durch MODC (Sallusto et al., 1995). In der Entwicklung des Immuntherapie-schemas für die vorgestellte Fallstudie ermöglichte diese schnelle Antigenprozessierung die gleichzeitige Applikation von Antigen und Ausreifungsstimulus zu den MODC, ohne daß hierdurch deren Stimulationskapazität tangiert wurde.

In ihren Anfängen hat die DC-basierte Immuntherapie vor allem bei malignen Erkrankungen bereits beeindruckende Erfolge vorzuweisen, obwohl die angewendeten Therapiekonzepte noch am Anfang eines wahrscheinlich langen Optimierungsprozesses stehen. Mit *in vitro* Versuchen zur Antigenbeladung und einem abgeänderten Protokoll zur MODC-Isolierung möchte sich die vorliegende Arbeit an der Suche nach einem verbesserten Therapiekonzept zur Immuntherapie beteiligen.

IS-Plasmid DNA-ausgereifte MODC induzieren eine zytotoxische Immunantwort in vitro - Chancen für zukünftige in vivo Immuntherapien

Die DC-basierte Immuntherapie ist auf hochgradig ausgereifte und aktivierte MODC angewiesen, um eine effektive Immunantwort auslösen zu können. Im Rahmen von DC-basierten Anti-Tumorvakzinierungen konnte dies bisher nur durch die Behandlung der Zellen mit dem Ausreifungsstimulus TNF- α erreicht werden.

Obwohl in mehreren Tiermodellen (Maus) eine Aktivierung von DC durch CpG-Motive demonstriert wurde, gab es bisher nur wenig Erkenntnisse über den Effekt von IS-DNA Sequenzen auf die Ausreifung und Aktivierung von humanen DC. In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals auch die ausreifende Wirkung von IS-Plasmid-DNA auf humane MODC gezeigt werden.

Bei der Behandlung mit IS-Plasmid-DNA induzierte IS-PL eine konzentrationsabhängige Ausreifung unreifer humaner MODC, die sich in einer verstärkten Expression des Ausreifungs-markers CD 83 (~ 10-fach), der kostimulierenden Moleküle CD 80 (~ 4-fach) und CD 86 (~ 11-fach) sowie von HLA Klasse I (~ 4-fach) und HLA Klasse II-Molekülen (~ 2-fach) zeigte. Dieser Effekt war DNA-Sequenz-spezifisch, da eine Zerstörung der IS-PL Sequenz durch einen vorherigen DNase-Verdau mit einem Verlust der Reaktivität einherging. C-PL, dem stark immunstimulierende Sequenzen fehlten, konnte mit seinen schwachen IS-Sequenzen nur eine vergleichsweise geringe Ausreifung der MODC hervorrufen. Dieser Effekt trat erst bei höheren Konzentrationen von C-PL auf und ließ sich gleichfalls durch einen DNase-Verdau des Plasmids verhindern. Kontrollmessungen mit dem LAL-Assay schlossen eine Verunreinigung der Plasmidpräparationen mit Endotoxinen aus.

Diese Ergebnisse belegen die Ausreifung humaner MODC durch IS-Plasmid-DNA und deuten darauf hin, daß immunstimulatorische DNA als unspezifisches Erkennungsmuster (z.B. für Infektionen) zur Förderung einer Immunantwort dienen könnte. So konnte auch kürzlich die starke Aktivierung humaner MODC durch doppelsträngige RNA nachgewiesen werden (Cella et al., 1999).

Überraschenderweise löste keines der getesteten immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide (IS-ODN) eine Ausreifung und Aktivierung humaner MODC aus, obwohl die eingesetzten ODN Konzentrationen äquivalent zu wirksamen Mengen von IS-PL waren. Für einige der IS-ODN war zuvor die Induktion einer starken T_{H1}-Immunantwort in der Maus (IS-

1585, IS-1668) (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Sato et al., 1996; Roman et al., 1997; Chu et al., 1997) oder die Aktivierung humaner Monozyten (IS-1760) (Hartmann et al., 1999) gezeigt worden. Auch ODN IS-4Z mit dem starken immunstimulatorischen CpG-Motiv aus dem Ampicillinresistenzgen des IS-PL blieb bei humanen MODC ohne Effekt.

Die Wirksamkeit aller verwendeten ODN konnte durch die signifikante Aktivierung von murinen BMDC belegt werden. Bei dem CpG-Motiv aus dem Ampicillinresistenzgen (IS-4Z) wurde die hohe stimulatorische Potenz auch im murinen System durch eine starke BMDC-Aktivierung nachgewiesen. Die vorliegenden differierenden Ergebnisse zur Wirkung von IS-ODN auf humane und murine DC könnten durch Unterschiede in der Erkennung von CpG-Motiven begründet sein. Hartman et al. (1999a) konnten für ein IS-ODN mit einem 5'-TCGTCGTT-3' CpG-Motiv zeigen, daß es zwar humane DC des peripheren Blutes, nicht aber humane MODC aktivierte. Obwohl in dieser Arbeit differierende ODN verwendet wurden, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse das Fehlen einer MODC-Antwort auf IS-ODN, die im murinen System wirksam sind.

Zusätzlich wurden bei humanen MODC Untersuchungen mit einem ODN durchgeführt, für das eine Hemmung der Plasmid-DNA-induzierten Wirkung auf murine Lymphozyten beschrieben wurde (ODN INHIB; Rykova et al., 1999).

Für murine BMDC gibt es bereits erste Erkenntnisse über den Signaltransduktionsmechanismus. So scheint IS-DNA ihre Wirkung nach Aufnahme über einen nicht-sequenzspezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche auszuüben, gefolgt von der Bindung an eine endosomale CpG-DNA-spezifische rezeptorähnliche Struktur, von der die Signaltransduktion vermittelt wird (Häcker et al., 1998). Bei Lymphozyten aus der murinen Milz konnte die Bindung von ODN INHIB an ein IS-DNA-spezifisches Rezeptorprotein mit nachfolgender Inhibierung einer Plasmid-DNA-induzierten Lymphozytenproliferation gezeigt werden (Rykova et al., 1999).

ODN INHIB vermochte aber in der vorliegenden Arbeit keine Wirkungsabschwächung der IS-PL vermittelten MODC Ausreifung hervorzurufen. Das Fehlen dieser Inhibitionswirkung auch bei 10-fachem Überschuß von ODN INHIB im humanen System ist daher ein weiteres Indiz, das auf differierende DNA-Rezeptoren oder sogar einen unterschiedlichen Wirkmechanismus von IS-DNA im murinen System hindeutet.

Die beginnende Charakterisierung muriner MODC in Kombination mit einem Protokoll zur Anzucht dieser Zellen (Schreurs et al., 1999) lässt für die Zukunft eine genauere Klärung der

Frage nach differierenden Wirkungen im Vergleich zu humanen MODC erhoffen, als dieses durch Versuche mit murinen BMDC geschehen könnte.

In dieser Arbeit konnte damit die starke immunstimulierende Wirkung von Plasmid-DNA auf humane MODC nachgewiesen werden. Die durchflußzytometrische Untersuchung zeigte phänotypisch eine gleichwertige MODC-Ausreifungswirkung für IS-PL und den konventionellen Ausreifungsstimulus $\text{TNF-}\alpha$. Der Einfluss dieser beiden verschiedenen Ausreifungsmethoden auf die Aktivierung der MODC zur T-Zell-Stimulation und die Art der ausgelösten Immunantwort sollte weiter untersucht werden:

Die immunstimulierende Kapazität von DC beruht nicht allein auf einer vermehrten Expression von HLA Klasse II- und costimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche, sondern bedingt auch die Produktion wichtiger Zytokine (Trinchieri und Scott, 1994). Um die funktionelle Aktivität der MODC zur Stimulation einer zytotoxischen Immunantwort zu erfassen, wurden an der Entwicklung einer T_{HI} -Immunantwort beteiligte Zytokine gemessen. Durch Stimulation mit IS-PL konnte neben der Ausreifungswirkung eine erhebliche Aktivierung der MODC zur Produktion von IL-6 und IL-12 ausgelöst werden. Einhergehend mit dieser Zytokinproduktion zeigte sich in antigenspezifischen T-Zell-Proliferationsassays mit IS-PL stimulierten MODC eine starke Polarisierung in die Richtung einer T_{HI} -Immunantwort.

In Übereinstimmung mit Arbeiten an murinen DC (Sparwasser et al., 1998) konnte bei der IS-PL-Aktivierung der humanen MODC eine hohe Sekretion von IL-6 beobachtet werden, das sowohl zur Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten als auch zur Produktion von Immunglobulinen bei B-Lymphozyten führt (Akira et al., 1993). Im Vergleich zu unreifen MODC führt IS-PL zu einer dramatisch gesteigerten IL-6 Sekretion (~ 260-fach), der konventionelle Ausreifungsstimulus $\text{TNF-}\alpha$ hingegen nur zu einem signifikant schwächeren Anstieg (~ 7-fach).

Mehrere Arbeiten dokumentierten einen signifikanten IL-12-Anstieg nach CpG-ODN-Stimulation von murinen Splenozyten, kutanen DC und murinen DC (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Cella et al., 1999). Bioaktives IL-12 fördert die Differenzierung naiver T_{H0} -Zellen in T_{HI} -Zellen (Manetti et al., 1993; Hsieh et al., 1993), (co)-stimuliert bereits differenzierte T_{HI} -Zellen zur Proliferation und $\text{IFN-}\gamma$ -Sekretion (Murphy et al., 1994), verstärkt die lytische Aktivität unspezifischer NK-Zellen (Kobayashi et al., 1989) und begünstigt spezifische, zytotoxische T-Zell-Antworten (Gately et al., 1991). Nur eine

Stimulation humaner MODC mit IS-PL induzierte die Sekretion von bioaktivem IL-12, jedoch fand sich im Vergleich zu CpG-ODN-stimulierten murinen BMDC (Sparwasser et al., 1998; Jakob et al., 1998; Cella et al., 1999) eine geringere IL-12-Produktion. Begründet sein könnte diese nur moderate IL-12 Synthese zum Teil in speziesspezifischen Abweichungen von humanen und murinen DC in der Reaktion auf IS-DNA oder durch Differenzen in den verwendeten Assays zum IL-12-Nachweis (IL-12 p40/p35-Heterodimer vs. IL-12 p40-Monomer). In dieser Arbeit wurde das bioaktive IL-12 p40/p35-Heterodimer nachgewiesen und nicht die IL-12 p40-Untereinheit bestimmt, da die p40-Untereinheit bei der IL-12 Synthese im Überschuss (bis zu 100-fach) produziert wird (Stern et al., 1990; D'Andrea et al., 1992; Heinzel et al., 1994). Es konnte sogar ein IL-12-Antagonismus für das murine (Gillesen et al., 1995) und humane (Ling et al., 1995) IL-12 p40-Monomer nachgewiesen werden. Die Messung nur der IL-12 p40-Untereinheit alleine erlaubt daher keine Aussage über die biologische IL-12 Aktivität. Die Produktion von bioaktivem IL-12 durch MODC konnte in dieser Arbeit nur nach Stimulation mit IS-PL nachgewiesen werden, die Verwendung von TNF- α oder DNase-verdaulichem IS-PL induzierte keine messbare IL-12 Sekretion.

Damit führte bei humanen MODC nur der Ausreifungsstimulus IS-PL zu einem Zytokinsekretionsmuster, das bei MODC-Stimulation von Lymphozyten eine starke Polarisierung in die Richtung einer T_{H1}-Immunantwort erwarten lässt. Weder TNF- α noch das zur Kontrolle mit DNase verdaute IS-PL vermochten ein vergleichbares, T_{H1}-förderndes Zytokinsekretionsmuster bei MODC auszulösen.

Eine weiterführende Charakterisierung der funktionellen Aktivität der MODC erfolgte in T-Zell-Proliferationsassays mit dem Antigen Tetanustoxoid. IS-PL- und TNF- α -ausgereifte MODC zeigten eine ähnlich starke antigenspezifische Stimulationswirkung auf T-Zellen Tetanus-immunisierter Probanden, während unreife MODC eine signifikant schwächere T-Zell-Proliferation hervorriefen. Diese Befunde entsprechen den bisher bekannten Ergebnissen über eine verstärkte T-Zell-Stimulation durch ausgereifte MODC im Vergleich zu unreifen MODC (Young und Steinman, 1990; Zhou und Tedder, 1995; Nijman et al., 1995).

Eine Ausreifung mit IS-PL oder TNF- α führte zu einer vergleichbaren Stimulationswirkung der MODC auf T-Zellen. Jedoch konnte für IS-PL-ausgereifte MODC die Stimulation einer T_{H1}-Immunantwort vermutet werden, da IS-ODN und IS-DNA im murinen und humanen System eine T_{H1}-Antwort fördern (Roman et al., 1997; Ballas et al., 1996; Chu et al., 1997). Auch das Zytokinsekretionsmuster der IS-PL-stimulierten MODC mit der Produktion von

bioaktivem IL-12 und einer hohen IL-6 Sekretion ließ eine starke Polarisation in Richtung einer zytotoxischen Immunantwort erwarten. Die durchflußzytometrischen Untersuchungen der T_{H1} / T_{H2} -Balance der Lymphozyten im Proliferationsassay bestätigten das Vorherrschen eines T_{H1} -Phänotyps (25% IFN- γ produzierende T-Lymphozyten) bei Stimulation mit IS-PL-ausgereiften MODC. Die durch IS-PL-ausgereifte MODC hervorgerufene T_{H1} -Antwort war signifikant stärker als bei Verwendung von unreifen oder TNF- α -ausgereiften MODC.

Das Vorherrschen des T_{H1} -Phänotyps wies auf eine Differenzierung in T_{H1} -polarisierte T-Zellen durch IS-PL-stimulierte MODC hin. Alternativ könnten IS-PL-stimulierte MODC die Aktivierung von T-Gedächtniszellen bewirkt haben, die bereits auf eine T_{H1} -Antwort festgelegt waren.

Sowohl IS-PL- als auch TNF- α -ausgereifte MODC zeigten eine vergleichbar große Kapazität zur T-Zell-Stimulation. Jedoch konnte bei humanen MODC nur durch die Aktivierung mit IS-PL neben einem die T_{H1} -Immunantwort förderndem Zytokinsekretionsmuster auch die Stimulation einer starken T_{H1} -Antwort im Proliferationsassay ausgelöst werden. Für die Immuntherapie von Karzinomen und intrazellulären Erregern bietet sich damit durch IS-PL-ausgereifte MODC der Vorteil, eine stärkere zytotoxische Immunantwort auslösen zu können als mit dem konventionellen Ausreifungsstimulus TNF- α .

Zusätzlich unterstützt der Nachweis einer großen stimulatorischen Kapazität von IS-PL-ausgereiften MODC die Idee, daß die begleitende Verabreichung von IS-Plasmid DNA bei herkömmlichen oder DNA-basierten Impfungen die Ausbildung einer starken T_{H1} -Immunantwort fördern könnte.

Fallstudie: In vivo Immuntherapie mit MODC bei metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom

Dies ist die erste Beschreibung eines Behandlungsversuches bei einem endokrinen Karzinom durch Vakzinierung mit antigenbeladenen MODC. Durch die *in vivo* Behandlung eines Nebenschilddrüsen(NSD)-Karzinoms mit Tumorlysat(TL)-beladenen MODC sollte die Effektivität dieses Therapiekonzeptes gezeigt und gleichzeitig die DC-basierte Immuntherapie erst-

malig auf das Gebiet der endokrinen Karzinome erweitert werden. Nach anfänglicher Therapie mit unausgereiften MODC konnte nach wiederholten Immunisierungen mit TNF- α -ausgereiften MODC eine tumorspezifische T-Zell-Antwort gezeigt werden. (Für die Therapie mit IS-PL-ausgereiften MODC wäre die Genehmigung einer Gentherapie erforderlich gewesen).

Das Nebenschilddrüsenkarzinom ist ein seltener maligner Tumor, der aufgrund gesteigerter Parathormonwerte die Symptome einer chronischen Hyperkalzämie hervorruft. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 30% und die 10-Jahre-Überlebensrate beträgt ungefähr 15% (Shane und Bilezikian, 1982). Bestrahlung und Chemotherapie haben sich bei der Kontrolle von Tumorrezidiven und metastatischen Läsionen als unwirksam erwiesen (Shane und Bilezikian, 1982; Bukowski et al., 1984; Calandra et al., 1984; Schott et al., 2000). Daher wurde in dem vorliegenden Fall eines metastasierten NSD-Karzinoms mit einer MODC-basierten Immuntherapie versucht, das Tumorwachstum zu kontrollieren.

Der *in vivo* Nachweis einer Tumorlysat-spezifischen Immunantwort erfolgte durch einen positiven DTH-Hauttest nach dem 10. Vakzinierungszyklus. Mit der rapiden Entwicklung einer KLH-spezifischen- und einer nachfolgenden Tumorlysat-spezifischen Antwort zeigt das vorliegende Therapieschema seine Fähigkeit, eine effektive Immunantwort gegen einen malignen Tumor zu bewirken. Zudem zeigte sich auch eine starke TL- und KLH-spezifische *in vitro* Immunreaktion im T-Zell-Proliferationsassays, deren Auftreten mit der *in vivo* Antwort zeitlich korrelierte. Trotz wiederholter Vakzinierungen mit dem PTH-Peptid (AS 1-84; 1 μ g / ml) ließ sich keine PTH-spezifische Immunantwort *in vivo* (und *in vitro*) zeigen. Erst der Einsatz einer größeren Menge des bioaktiven PTH-Peptids (AS 1-34; 100 μ g / ml) bei den Immunisierungen erzeugte auch hier eine starke antigenspezifische *in vivo* Immunreaktion, die mit einem Abfall des PTH-Serumspiegels korrelierte.

In einem ähnlichen Fall von metastasiertem Nebenschilddrüsenkarzinom mit extremer Hyperkalzämie konnte nach PTH-Immunisierung (ohne Verwendung von MODC) eine PTH-spezifische T_{H2}-Antwort demonstriert werden (Bradwell und Harvey, 1999). Einer Patientin wurden verschiedene humane und bovine PTH-Peptide mit komplettem Freund'schem Adjuvans (suspendiert in steriler Kochsalzlösung) in Intervallen von 3 bis 7 Wochen subkutan appliziert. Durch diese Strategie konnte die B-Zell-Toleranz durchbrochen und eine PTH-Autoantikörperproduktion ausgelöst werden. In diesem Fall resultierte eine klinische Besserung der Symptome aus der Bindung von Antikörpern an freies PTH im Serum, so daß

eine rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzellen verhindert wurde. Hingegen konnte der PTH-Serumspiegel nicht verringert werden, sondern stieg im Therapieverlauf konstant an.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Therapie ein Abfall des PTH-Serumspiegels bei der Patientin erreicht werden, jedoch wurde trotz sinkender PTH-Serumwerte keine klinische Besserung der Symptomatik erreicht. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre die Auslösung unterschiedlicher Immunreaktionen in den beiden NSD-Karzinomfällen. Sowohl der Modus der Antigenapplikation (Vakzinierung mit und ohne DC) als auch die Verwendung nur eines einzelnen bioaktiven PTH-Peptides an Stelle des Cocktails aus humanen und bovinen PTH-Peptiden lassen differierende Immunreaktionen wahrscheinlich erscheinen.

Aus naheliegenden Gründen bietet sich die DC-basierte Tumorthherapie bei den malignen Erkrankungen an, für die definierte Tumorantigene verfügbar sind (z.B. PSA, CEA, MART) (Morse et al., 1999b; Nair et al., 1999; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000; Philip et al., 2000). Analog zur Verfahrensweise bei anderen Karzinomen ohne bekannte Tumorantigene (Fields et al., 1998; Nestle et al., 1998; Mulders et al., 1999; Hinkel et al., 2000) erfolgte daher die Beladung der MODC mit lysiertem autologem Tumorgewebe (Tumorlysat). Insbesondere bei diesen Vakzinierungen könnte der Co-Immunisierung mit KLH eine wichtige Rolle zukommen, da KLH durch die Auslösung einer starken T-Helfer-Zell-Antwort und eine Aktivierung der Zytokinproduktion in den regionären Lymphknoten für ein Umfeld sorgt, das eine effektive zytotoxische T-Zell Antwort begünstigt. Die Induktion einer *in vitro* T-Zell-Antwort gegen Tumorlysat und KLH bei der NSD-Karzinomtherapie spricht dafür, einen generellen Einsatz von KLH oder ähnlichen Immunstimulanzien in der DC-basierten Immuntherapie mit schwachen Antigenen (Tumorlysat) in Betracht zu ziehen. Mehrere Therapiekonzepte bedienen sich bereits der Co-Immunisierung mit KLH (Lim und Bailey-Wood, 1999; Rieser et al., 2000). Berichte über vereinzelte Patienten ohne Immunantwort auf KLH-Immunisierung sind selten (Rieser et al., 2000).

Die in dieser Arbeit bei der NSD-Karzinompatientin beobachteten starken *in vivo* Immunreaktionen waren jedoch nur mit einem unbefriedigenden klinischen Effekt verbunden. Die Entwicklung weiterer Lungenmetastasen konnte durch Immunisierungen mit Tumorlysat nicht verhindert werden. Daher wurde der Versuch einer kurativen Behandlung mit Tumorlysat-Vakzinierungen eingestellt und weiterhin vordringlich versucht, den Kalzium-Serumspiegel durch fortgesetzte Immunisierungen mit 100-fach höher dosiertem bioaktiven PTH-Peptid (und unterstützt durch eine Bisphosphonattherapie) zu kontrollieren. Der initial weiter

angestiegene Parathormon-Serumspiegel begann daraufhin stetig abzufallen, während der Kalzium-Serumspiegel auf erhöhtem Niveau verharrte.

Im weiteren Verlauf verweigerte die Patientin diese Behandlung und unterzog sich einer Chemotherapie an einer auswärtigen Klinik. Die Patientin verstarb bei schlechtem Allgemein- und Ernährungszustand 22 Monate nach Therapiebeginn an einer Pneumonie.

Diese Diskrepanz zwischen der starken *in vivo* Immunreaktion und dem unbefriedigenden klinischen Effekt könnte durch das fortgeschrittene Krankheitsstadium mit hohen Tumormassen, das Fehlen eines spezifischen Tumorantigens für das Nebenschilddrüsenkarzinom oder die unzureichende Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen trotz Bildung von T-Gedächtniszellen bedingt sein. Für eine ungenügende Induktion zytotoxischer T-Zellen spricht die Beobachtung, daß bei den TL-spezifischen *in vitro* Immunreaktionen im T-Zell-Proliferationsassay keine entsprechende Veränderung des CD 4 / CD 8-Verhältnisses zu finden war. Gleiches gilt für das *in vivo* CD 4 / CD 8-Verhältnis (im peripher-venösen Blut), wo aber aufgrund der geringen Zahl spezifischer CD 8⁺ Zellen nicht mit einer nachweisbaren Veränderung gerechnet werden konnte.

Alle Vakzinierungen mit DC erfolgten ambulant und wurden von der NSD-Karzinompatientin ohne Nebenwirkungen toleriert. Andere Studien berichteten vereinzelt über leichte Nebenwirkungen (mildes Fieber) bei einem kleinen Teil der Patienten nach DC-basierten Immuntherapien, anaphylaktische Reaktionen nach wiederholten Immunisierungen, das Auftreten einer Vitiligo (Mackensen et al., 2000; Mackensen et al., 2000a) sowie Antikörperbildung (IgM, IgG und IgE) gegen FKS (Mackensen et al., 2000a). Die Induktion von Autoimmunität wurde auch schon für tierexperimentelle Studien beschrieben (Ludewig et al., 2000).

Zusammenfassend kann nach bisherigem Erkenntnisstand davon ausgegangen werden, daß Antitumor-Vakzinierungen mit DC effektive tumorspezifische Immunreaktionen *in vivo* hervorrufen können, ohne jedoch gravierende Nebenwirkungen auszulösen.

Unabhängig vom klinischen Ausgang der NSD-Karzinompatientin repräsentiert die Vakzinierung mit antigenbeladenen MODC eine vielversprechende neue Strategie zur Induktion von T-Zell-Antworten gegen schwache Antigene wie z.B. Tumorproteine. Dieser Ansatz stellt daher auch im endokrinologischen Bereich neue Möglichkeiten zur Therapie fortgeschrittener, Strahlen- und Chemotherapie-resistenter maligner Erkrankungen zur Verfügung.

Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die immunologische Forschung war für lange Zeit auf Antigene und Lymphozyten fokussiert, jedoch führt die bloße Anwesenheit dieser zwei Fraktionen nicht immer zu Immunität. Eine dritte Gruppe, das antigenpräsentierende System der DC, hat sich als wichtiges auslösendes und modulierendes Element bei einer Immunantwort erwiesen. Durch ihre zentrale Stellung in der Kontrolle von Immunreaktionen sind DC ein wichtiges Ziel bei vielen klinischen Situationen mit einer Beteiligung von T-Lymphozyten.

Ein großer Teil der Forschungsbemühungen im Bereich der DC-Immuntherapie hat die Behandlung maligner Tumoren zum Ziel:

Als antigenpräsentierende Zellen können DC eine effektive Immunantwort gegen Tumoren auslösen: DC phagozytieren und präsentieren nicht nur lösliches Antigen in Komplex mit HLA Klasse I und II-Molekülen (Nijman et al., 1995; Pierre et al., 1997), sondern können auch direkt Tumorantigene von apoptotischen Zellen aufnehmen, diese in Komplex mit HLA Klasse I-Molekülen präsentieren und eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort bewirken (Russo et al., 2000). Die Funktion der DC beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Regulation von T- und B-Zell-Antworten, sondern sie sind in der Tumorabwehr auch als direkte Effektorzelle bedeutsam (Chapoval et al., 2000). Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle der DC in der Tumorbekämpfung ist der Befund, daß eine Ausreifung von DC alleine durch nekrotische Tumorzellen ausgelöst werden kann, nicht aber durch Gewebszellen oder apoptotische Zellen (Sauter et al., 2000).

Bei Patienten mit malignen Erkrankungen können die Tumoren aber einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. So wurde u.a. für verschiedene Karzinome die Fähigkeit nachgewiesen, DC zur Apoptose zu veranlassen (Esche et al., 1999; Kiertscher et al., 2000). Auch sind Tumor-infiltrierende DC defizitär in ihrer antigenpräsentierenden Funktion (Chaux et al., 1997).

Diese Funktionseinbußen der DC bei Tumorkranken beziehen sich jedoch nicht auf DC, die aus monozytären Vorläuferzellen *ex vivo* kultiviert werden: kultivierte, autologe MODC konnten bei Karzinompatienten eine starke T-Zell-Stimulation auslösen; aus dem peripheren Blut isolierte DC hingegen waren dazu nicht in der Lage (Gabrilovich et al., 1997). Diese Beobachtungen würden eine Erklärung dafür bieten, weshalb die *ex vivo* Beladung der MODC mit Antigen eine effektive Antitumor-Immunreaktion bei Patienten induzieren kann,

während die DC im peripheren Blut der Patienten bei dieser Aufgabe zuvor offensichtlich versagt haben.

Die Möglichkeit, humane MODC mit GM-CSF und IL-4 in großer Menge aus venösem Blut zu generieren, erlaubt den therapeutischen Einsatz von MODC mit ihren vielfältigen Fähigkeiten. Die vorliegende Arbeit bietet zu diesem Zweck ein Protokoll an, das auf die Isolierung von MODC für den Einsatz in DC-basierten Immuntherapien zugeschnitten wurde. Die vorgestellte Fallstudie konnte mit der *in vivo* Behandlung eines Nebenschilddrüsen-(NSD)-Karzinoms mit Tumorlysat(TL)-beladenen MODC die Effektivität dieses Therapie-konzeptes demonstrieren, indem starke Tumor-spezifische Immunreaktionen *in vitro* und *in vivo* induziert wurden. Gleichzeitig erfolgte damit die erstmalige Beschreibung einer DC-basierten Immuntherapie auf dem Gebiet der endokrinen Karzinome.

Weiterhin bildet das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Isolierung von MODC die Grundlage einer Studie über DC-basierte Immuntherapien endokriner Karzinome, in deren Rahmen eine Reihe unterschiedlicher endokriner Karzinome (neuroendokrines Pankreas-karzinom, medulläres Schilddrüsenkarzinom, Nebenschilddrüsenkarzinom) behandelt und Teilremissionen bzw. eine Reduzierung der Tumormassen erreicht wurden (Schott et al., 1999; Schott et al., 2001; Schott et al., 2001a).

Humane MODC, die in ausreichenden Zellzahlen für eine klinische Anwendung kultiviert werden können, haben sich zu einem bevorzugten Ziel von Immuntherapien entwickelt. Die *ex vivo* Manipulation von MODC scheint Möglichkeiten zur selektiven Modulation von T_{H1}- und T_{H2}- Aktivierung, zur Induktion von Toleranz sowie spezifischer T-Zell Immunität gegen infizierte Zellen und Tumoren zu eröffnen (Cella et al., 1997a; Banchereau und Steinman, 1998; Lanzavecchia, 1998).

Erste vielversprechende Erfolge mit dem Konzept einer DC-basierten Immuntherapie ließen sich bereits in der Karzinombehandlung mit Tumorregressionen und -eradikationen erzielen (Ashley et al., 1997; Specht et al., 1997; Nestle et al., 1998; Nair et al., 1999; Schott et al., 1999; Murphy et al., 2000; Lodge et al., 2000).

Auch an neuen Strategien zur Vakzinierung gegen intrazelluläre Erreger (bakteriell oder viral), die weltweit große Gesundheitsprobleme verursachen, wird gearbeitet (z.B. *Leishmania donovani* / *Mycobacterium tuberculosis*: Ahuja et al., 1999; Demangel und Britton, 2000; oder HIV: Kusakabe et al., 2000).

Ausschlaggebend für die zukünftige Bedeutung der DC-basierten Immuntherapie wird aber eine Verbesserung der Effektivität sein. Viele der gegenwärtigen Vorschläge hierzu befassen sich mit einer wirkungsvolleren Antigenbeladung und Präsentation der DC, so die Transfektion mit einer sich selbst replizierenden RNA-Vakzine (Ying et al., 1999; Leitner et al., 1999), der virus-vermittelte Gentransfer in DC (Di Nicola et al., 1998; Wan et al., 1999; Russo et al., 2000) oder die Bildung einer Fusionszelle aus DC und Tumorzelle (Gong et al., 2000).

Weiterhin wird versucht, die ausgelöste antigenspezifische Immunreaktion in die Richtung einer T_{HI} -Immunantwort zu beeinflussen, die für eine effektive Bekämpfung u.a. von Tumoren und intrazellulären Erregern benötigt wird. Die gegenwärtigen Ansätze hierzu favorisieren die Gabe komplexer Zytokinkombinationen während der DC-Kulturphase (Sato et al., 1999), die Transfektion/Transduktion der DC mit Zytokin-codierenden DNA-Sequenzen (Ahuja et al., 1999) oder sogar die Verwendung von IL-10 defizienten APC (Igiertseme et al., 2000) zur Auslösung einer T_{HI} -Immunantwort.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Wirkung von IS-Plasmid-DNA auf humane MODC eröffnet hier einen alternativen Weg: Unreife humane MODC (d.h. jene Zellen, auf die sich der überwiegende Teil der DC-Immuntherapiekonzepte stützt) könnten ohne weitere Zytokingaben mit IS-Plasmid-DNA ausgereift werden und würden gleichzeitig (ohne zusätzliche Manipulationen) die gewünschte zytotoxische Immunantwort generieren. Zur Ausreifung der Zellen würden Plasmide mit multiplen starken IS-Sequenzen oder nur die jeweiligen IS-Sequenzen alleine Anwendung finden. Bei einer Transfektion/Transduktion der MODC mit DNA-kodierten Tumorantigenen könnte sich die Möglichkeit bieten, eine starke zytotoxische Antwort auszulösen, indem ein (eventuell speziell konstruierter) Vektor mit starken IS-Sequenzen gewählt wird. Weitere Forschungsbemühungen würden hier die Frage nach den am besten geeigneten IS-Sequenzen für humane *in vivo* Therapien klären.

Bei Schutzimpfungen (i.m., etc.) wird nicht mehr nur mit dem Einsatz von Impfstoffen auf DNA-Basis experimentiert, sondern auch die Verwendung von DC bei DNA-basierten Vakzinierungen gegen intrazelluläre Erreger (Influenza-Virus: Casares et al., 1997) rückt mehr und mehr ins Blickfeld. Sollte sich dieser Ansatz durchsetzen, böte auch hier der Einsatz von IS-Plasmid-DNA offensichtliche Vorteile.

Sowohl die Tumorbekämpfung als auch die Abwehr von intrazellulären Erregern erfordert eine starke antigenspezifische T_{HI} -Immunantwort. Obwohl der Beweis der Wirksamkeit einer

Immuntherapie mit IS-Plasmid-DNA ausgereiften MODC *in vivo* noch aussteht (da die Genehmigung einer Gentherapie Voraussetzung ist), sprechen die in dieser Arbeit vorgelegten *in vitro* Ergebnisse für den Einsatz von Plasmid-DNA zur Ausreifung von MODC. Dies wäre eine elegante Methode, da Plasmid-DNA durch eine Ausreifung der MODC sowohl deren T-Zell-stimulatorische Potenz erhöhen als auch die Induktion der gewünschten T_{HI}-Immunantwort ermöglichen könnte. Die IS-Plasmid-DNA vermittelte MODC-Ausreifung und Aktivierung scheint damit zukünftig eine weitere Verbesserung der *in vivo* Immuntherapien gegen Tumoren und wichtige Infektionskrankheiten zu versprechen.