

Impfung mit dendritischen Zellen

Anti-Tumor-Impfung mit autologen dendritischen Zellen beladen mit allogenem Tumorlysat für PatientInnen mit metastasiertem medullären Schilddrüsenkarzinom.



Hintergrund

1975 wurden dendritische Zellen (DCs) erstmals von Steinmann et al. beschrieben. Heute ist deren Funktion als Antigen-präsentierende Zellen und Induktoren primärer und sekundärer Immunantworten bekannt. In den 1980/90er Jahren wurden DCs für die Tumorummunologie als Immuntherapie in Betracht gezogen. Die in vitro-Herstellung potenter DCs aus Monozyten unter Verwendung von GM-CSF und IL-4 hat zu einer Vielzahl klinischer Studien an diversen Malignomen, wie Melanom, Prostata- und Pankreaskarzinom geführt. Der Therapieerfolg blieb trotz vielversprechender präklinischer Daten jedoch oft bescheiden. Daher gilt es, in aktuellen Studien nach einer Möglichkeit zur Steigerung der DC-Funktion zu suchen.

Einleitung

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) ist ein Calcitonin-produzierender Tumor der parafollikulären C-Zellen und betrifft fünf bis zehn Prozent aller Schilddrüsenkarzinome. MTCs treten sporadisch, familiär gehäuft und in Assoziation mit anderen endokrinologischen Pathologien auf, wie MEN

(multiple endocrine neoplasia) Typ 2A oder 2B. Da der Tumor zwar langsam, aber progressiv mit früher Lymphknotenbeteiligung an Hals und Mediastinum fortschreitet, wird den PatientInnen im frühen Stadium der Erkrankung eine Totalresektion der Schilddrüse inklusive anhängender Lymphknoten empfohlen. Sind jedoch schon Fernmetastasen aufgetreten, ist eine palliative Behandlung angebracht.

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass mit Tumorlysat beladene DCs die autologe Antitumor-T-Zell-Antwort gegen MTC-Zellen stimulieren können. DCs werden in vitro mittels GM-CSF und IL-4 aus PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) generiert. Sie stellen hochpotente Antigen-präsentierende Zellen zur naiven T-Zell-Aktivierung dar. Diese gewonnenen Zellen mit den Charakteristika unreifer DCs können mit Tumorlysat beladen und mit inflammatorischen Stimuli (TNF α , IL-1 β oder CD40-Ligand) zur Ausreifung induziert werden. Aufgrund ihrer einzigartigen Kapazität, ruhende T-Zellen zu stimulieren, stellt eine Immuntherapie mit DCs eine vielversprechende Option für PatientInnen mit unterschiedlichsten Tumoren dar.

Immuntherapie mit autologen DCs gepulst mit Tumorzelllysat aus allogenen Tumorzelllinien sind ein neuer Ansatz, um eine antineoplastische Immunreaktion bei TumorentInnen zu induzieren. Tumorzelllinien haben den Vorteil, unlimitedes Tumormaterial zum Pulsen der DCs zur Verfügung zu stellen, und sie können einfach in vitro kultiviert und expandiert werden.

Pat. No.	Age, Sex	Tumor type ^α	Histology at diagnosis	Surgery ^β	Previous treatment ^χ	Metastatic disease ^δ	Study entry (months after diagnosis)	Calcitonin at study entry (pg/ml)
1 CM	40, M	S	T4, N1	TE, ND, ML-NE, LB	DCs (auTL)	cervical LNs, lungs, liver	123	2568
2 MS	55, F	S	T2a, N1b	TE, ND	N	bone	86	6010
3 FE	43, M	MEN-2	T1b, N1	TE, ND, ML-NE, LB	N	liver, bone	108	37044
4 HS	77, M	S	T4a, N1b	TE, ND	N	cervical LNs, bone	61	13874
5 KP	45, M	S	T4, N1a	TE, ND, ML-NE	IFN- α , DCs (auTL)	mediastinal LNs	148	661
6 JD	43, M	S	T4b, N1b	TE, NE, ML-NE	N	cervical LNs, trachea, esophagus	1	683
7 AP	29, F	S	T4b, N1b	TE, NE, ML-NE	DCs (auTL)	cervical LNs	31	4575
8 WO	55, M	MEN-2	T4, N1	TE, ND	RXT	lungs, hilar LNs	25	774
9 JK	49, M	S	T4, N1	TE, ND, ALND, LR	IFN- α , HT, SS, MRXT, DCs (auTL)	axillary LNs, mediastinal LNs, lungs, pleura, liver	220	34900
10 ES	70, M	S	T4b, N1	TE, ND, PHR, LB	DCs (auTL)	cervical LNs, mediastinal LNs, liver	1	3130

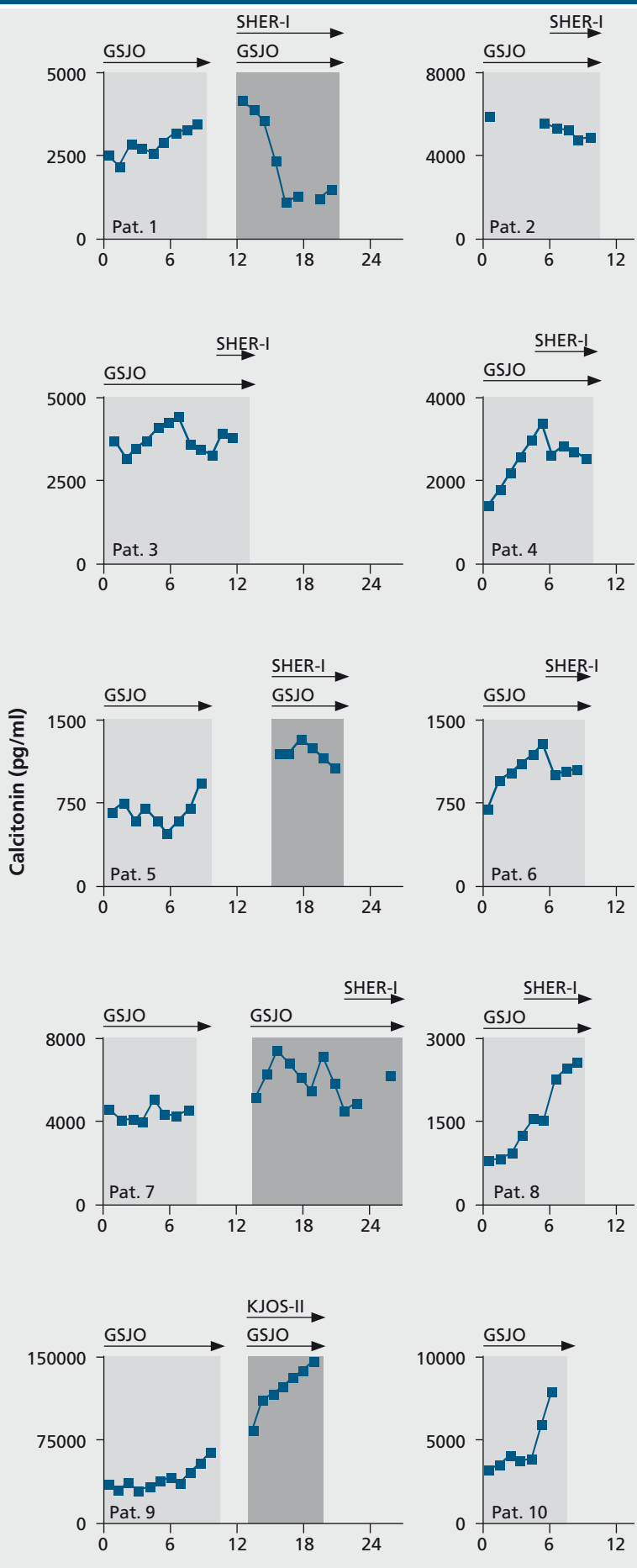
^α Tumor type: S, sporadic MTC; MEN-2, multiple endocrine neoplasia-2

^β Surgery: TE, thyroidectomy; ND, neck dissection; MLNE, mediastinal lymph node extirpation; LB, liver biopsy; ALND, axillary lymph node dissection; LR, liver resection; PHR, pharyngeal resection

^χ Previous treatment: DCs (auTL), autologous tumor lysate-pulsed DCs; IFN α , Interferon-alpha; RXT, radiotherapy; HT, hyperthermia; SS, somatostatin; MRXT, mediastinal radiotherapy

^δ Metastatic disease: LN, lymph node

Fig. 1 Calcitoninwerte der PatientInnen unter Behandlung mit allogenen Tumorlysats gepulsten DCs



Hier werden nun die Ergebnisse einer Phase I-Studie gezeigt, in der allogene, mit Tumorzelllysats gepulste DCs zur Immuntherapie bei PatientInnen mit MTC eingesetzt wurden. Diese Therapie stellt eine vielversprechende Strategie zur Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion bei betroffenen PatientInnen dar. Das Ziel dieser Studie war, die Sicherheit, den resultierenden Immunresponse und die klinische Aktivität der mittels allogenen Tumorlysats gepulsten DCs zu evaluieren.

Durchführung der Studie

In diese Studie wurden zehn PatientInnen im Alter zwischen 18 und 75 Jahren mit metastasiertem MTC inkludiert. Die PatientInnen mussten eine geschätzte Lebenserwartung von mehr als drei Monaten, einen Karnofskyindex von mehr als 60 Prozent und normale renale, hepatische und hämatopoetische Funktionen aufweisen. Weiters durften in den drei Monaten vor Therapiebeginn weder eine Chemo-, Radio- oder eine Immuntherapie erfolgt sein (Tabelle 1).

Für die Präparierung der DCs wurden PBMCs mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem peripheren Blut der PatientInnen isoliert. CD14-positive Zellen wurden mit magnetischen Beads konjugiertem CD14-mouse-anti-human-Antikörper aufbereitet. Nach fünf Tagen Zellkultur mit GM-CSF und IL-4 in RPMI konnten die DCs mit Tumorlysats beladen werden. Die Zellen wurden abschließend mit TNF α und IFN- γ für zwölf Stunden gefolgt von vier Stunden LPS zur Ausreifung gebracht. Für die Impfung wurden die Zellen gewaschen und in PBS aufgenommen. Die DC-Impfung konnte auf ambulanter Basis alle drei Wochen durchgeführt werden. Dazu wurde die Zellsuspension ultraschallgezielt in einen Lymphknoten in der Leiste injiziert.

Für die Studie wurden drei Tumorzelllinien ausgewählt (GSJO, KJOS-II, SHER-I), die aus Primärtumoren bzw. Tumormetastasen generiert wurden. Für das Zelllysats wurden die Tumorzellen in Suspension gebracht, in PBS gewaschen und anschließend in sterilem Wasser gelöst. Nach fünf Frier-/Tauzyklen wurde der Proteingehalt im Überstand ermittelt und auf minus 80°C gelagert.

Bei allen PatientInnen wurde vor Therapiebeginn und in weiterer Folge alle sechs Monate ein Tumorstatus (Staging) mittels Ultraschall, Computertomographie, Magnetresonanz und/oder PET-Scan erhoben. Calcitoninwerte wurden nach der Baseline-Ermittlung zu Therapiestart monatlich bestimmt. Autoantikörper wurden vor und zweimal in der Impfperiode bestimmt.

Ein in vitro-Zytotoxizitätstest in Form eines Europium-release-assays wurde zur Bestimmung der spezifischen zytotoxischen Aktivität der zuvor in Kokultur mit DCs stimulierten T-Zellen eingesetzt.

Für den intrazytoplasmatischen IFN- γ -Detektionsassay wurden T-Zellen mit reifen

Tabelle 2.		Behandlungsschema und klinisches Ansprechen						
Pat. No.	Total no. of vaccinations (cycle 1/2)	Cell lines used for DC pulsing		FU months	Toxicity	Response ^α		Disease status ^β
		cycle 1	cycle 2			Calcitonin	Imaging	
1 CM	31 (15/16)	GSJO	GSJO, SHER-I	21	N	-41%	SD	AWD
2 MS	16	GSJO, SHER-I	-	8	N	-17%	SD	AWD
3 FE	23	GSJO, SHER-I	-	13	N	+3%	SD	AWD
4 HS	16	GSJO, SHER-I	-	10	N	+82%	PD	AWD
5 KP	37 (21/16)	GSJO	GSJO, SHER-I	20	N	+59%	PD	AWD
6 JD	16	GSJO, SHER-I	-	8	N	+54%	PD	AWD
7 AP	38 (17/21)	GSJO	GSJO, SHER-I	26	N	+34%	PD	AWD
8 WO	15	GSJO, SHER-I	-	8	N	+229%	PD	AWD
9 JK	30 (19/11)	GSJO	GSJO, KJOS-II	20	N	+316%	PD	DOD
10 ES	11	GSJO	-	7	N	+150%	PD	AWD

^α Response: SD, stable disease; PD, progressive disease

^β Disease status: AWD, alive with disease; DOD, died of disease

Tumorzelllysate gepulsten DCs kokultiviert. Nach 18 Stunden wurde Monensin zugesetzt, um die Proteinsekretion zu blockieren. Nach Zellernte, Permeabilisierung und anschließender Markierung mit einem anti-IFN- γ - und anti-CD3-Antikörper wurde bei den T-Zellen mittels Durchflusszytometrie der Gehalt an intrazytoplasmatischem IFN- γ bestimmt.

Ergebnisse

Die DC-Impfungen wurden gut toleriert. Es konnten keine Grad 3- oder Grad 4-Toxizitäten (laut WHO-Richtlinien) oder Autoimmunreaktionen beobachtet werden. In Tabelle 2 werden die Calcitonin-Tumormarker-Verläufe und die radiologischen Veränderungen während der Studie gezeigt. Patient 1 und 2 zeigen eine Abnahme der Calcitoninwerte. Patient 3 weist einen stabilen Wert unter Therapie auf, während alle anderen PatientInnen einen Anstieg des Calcitonins aufweisen. Die radiologischen Befunde zeigen analog zu den Calcitoninparametern stabile Werte bei Patient 1, 2 und 3 in Form einer Regression metastasierter Läsionen in Leber und zervikalen Lymphknoten. Nach einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von elf Monaten (Range 7 bis 26 Monate) waren noch neun PatientInnen am Leben. Patient 9 starb 20 Monate nach Beginn der Studie an rasch fortschreitender Metastasierung in Leber und Lunge.

Bei den meisten PatientInnen konnten wir einen Anstieg des Calcitonins unter Monotherapie mit nur einem Tumorzelllysate beobachten. Unter der Annahme, dass DCs, die mit einem breiteren Spektrum an Tumorantigenen gepulst werden, den anti-Tumor-Response steigern, wurde den PatientInnen ein weiteres Tumorzelllysate verabreicht. Als Folge dieser Kombinationstherapie konnten wir eine Abnahme des Calcitonins bei einigen PatientInnen beobachten. (Fig. 1) Dies legt nahe, dass eine effiziente Therapie durch Einsatz kombinierter Tumorzelllysate erreicht werden kann.

Um die immunstimulierende Kapazität der DCs zu evaluieren, wurde ein in vitro-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Sowohl bei Patient 1 als auch bei Patient 2 konnte eine spezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion gezeigt werden. Patient 1 zeigt einen Response auf mit SHER gepulsten DCs, jedoch nicht mit GSJO. Dies legt nahe, dass eine Monotherapie mit GSJO-DCs klinisch ineffizient sein kann.

Diskussion

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass autologe DCs, die mit allogenen Tumorzelllysate beladen wurden, ein neuer, vielversprechender Ansatz sind, um eine gegen den Tumor gerichtete Reaktion der T-Zellen der PatientInnen zu bewirken.

DCs mit allogenen Tumorzelllysate zu beladen, weist mehrere Vorteile auf:

1. Eine Operation zur Gewinnung von Tumormaterial für die Lysatherstellung ist nicht zwingend notwendig.
2. Tumorzelllinien stellen eine unerschöpfliche Quelle an Tumorprotein dar.
3. Eine Behandlung ist auch bei inoperablen Tumoren möglich bzw. bei nicht radiologisch darstellbaren oder fraglich lokalisierten Metastasen.

Es möglich, durch eine Kombination von Tumorzelllinien ein breiteres Spektrum an Tumorantigenen für die DCs bereitzustellen. So kann die DC-Impfung eine vielseitigere anti-Tumor T-Zell-Reaktion bewirken.

Das primäre Ziel der Studie war, die Durchführbarkeit und Verträglichkeit zu beurteilen. Die Impfung wurde gut vertragen. Die ambulante Betreuung der PatientInnen wurde gut angenommen und stellt keinen Nachteil im Vergleich zu einer stationären Behandlung dar.

Die Frage bezüglich klinischer Effizienz der DC-Therapie konnte durch Korrelation von klinischem Ansprechen und Ergebnis der immunologischen in vitro-Tests ausreichend beantwortet werden.

In der genannten Patientenkohorte mit infauster Prognose konnte bei einigen PatientInnen ein gutes Therapieansprechen festgestellt werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse befürworten weitere Anstrengungen zur Optimierung der Wirksamkeit der Therapie mit DCs.



Michaela Hassler

Biomedizinische Analytikerin