Entwicklung und klinische Anwendung von Vakzinen unter Verwendung von DNA des Tumorantigens Muzin (MUC1)

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dr. med. Gabriele Pecher
geboren am 20. 02. 1964 in Teterow

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 30. 10. 2002

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 17. 07. 2003

Gutachter:
1. Prof. Dr. G. Gastl
2. Prof. Dr. A. Zander

Inhaltsverzeichnis

Ziel der Arbeit **4**

1. Einleitung **4**

1.1 Tumorvakzinierung **4**

1.1.1 Genmodifizierte Tumorzell-Vakzinen **5**
1.1.2 Peptid- und Proteinvakzinen **6**
1.1.3 Verwendung von dendritischen Zellen **7**
1.1.4 Verwendung von aktivierten B-Zellen **8**
1.1.5 Rekombinante Viren **9**
1.1.6 ”Nackte” DNA-Vakzinen **9**

1.2 Das Tumorantigen Muzin **11**

2. Präklinische und klinische Arbeiten **14**

2.1 Induktion einer Immunantwort in Schimpansen durch Vakzinierung mit Muzin-cDNA-transfizierten autologen Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierten B-Zellen **14**

2.2 Humorale Immunantwort gegen Muzin **15**

2.3 Zelluläre Immunantwort gegen Muzin **15**

2.4 Muzin exprimierende "Mini"-Epstein-Barr-Virus-immortalisierte B-Zellen zur Erzeugung zytotoxischer T-Zellen **16**

2.5 Herstellung eines immortalisierten humanen CD4+ T -Zell-Klons, der Muzin exprimierende Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* lysiert **17**

2.6 Hemmung des Tumorwachstums durch eine Muzin-DNA-Plasmid-Vakzine im Mausmodell **17**

2.7 Muzin-Gentransfer in humane dendritische Zellen unter Verwendung von kationischen Liposomen und rekombinanten Adenoviren **18**

2.8 Effiziente Kryokonservierung von Muzin-cDNA-transfizierten humanen dendritischen Zellen für die klinische Anwendung..... **19**

2.9 Klinische Phase I / II -Studie: Muzin-cDNA-transfizierte autologe humane dendritische Zellen als Vakzine..... **19**

3. Zusammenfassung..... **21**

Literaturverzeichnis..... **22**

Publikationen..... **30**

Abkürzungsverzeichnis..... **31**

Danksagung..... **32**

Eidesstattliche Versicherung..... **33**

Ziel der Arbeit

Die Entwicklungen in der Molekular- und Tumorbiologie sowie in der Gentechnologie haben Wege für neue spezifische Substanzen in der Tumortherapie eröffnet. Bei der Aufdeckung der Prozesse, die zu malignem Wachstum führen und es hemmen können, sind in jüngster Zeit enorme Fortschritte gemacht worden, die klinische Umsetzung erfordert jedoch noch enorme Anstrengungen.
In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Übertragung von molekularbiologischer und tumorimmunologischer Grundlagenforschung in die klinische Anwendung. Schwerpunkt der Arbeit war die Entwicklung neuer Immun- und Gentherapieverfahren gegen Tumore, insbesondere von Mamma- und Pankreaskarzinomen unter Verwendung von DNA des Tumorantigens Muzin. Dargestellt werden in der kumulativen Arbeit Forschungsergebnisse von der Testung eines Impfstoffs in Schimpansen bis hin zur klinischen Anwendung einer Vakzine in Patienten.

1. Einleitung

1.1 Tumorvakzinierung

Die in den letzten Jahren erfolgte Entwicklung im hämatologisch / onkologischen Grundlagenwissen hat die Sichtweise auf die Behandlungsmöglichkeiten fundamental geändert. Das zunehmende Verständnis der regulierenden Funktion des Immunsystems bei der Tumorabwehr, die Identifizierung von Tumorantigenen (1, 2, 3), die Kenntnisse der Rolle von Antigen präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen (4, 5), haben neue Wege z.B. für die Entwicklung von Tumorvakzinen eröffnet. Die Vakzinen sind darauf ausgerichtet, eine zytotoxische T-Zellantwort und / oder eine Antigen-spezifische Antikörperantwort zu induzieren um das Immunsystem so zu aktivieren, dass Tumore und Metastasen spezifisch bekämpft werden.

Voraussetzung für eine erfolgreiche spezifische Vakzinierung ist das Vorhandensein

eines Tumorantigens. Zahlreiche Antigene wurden identifiziert (2), u.a. mittels der SEREX-Methode (6, 7). Tumorantigene sind häufig Autoantigene, die auf Tumorzellen überexprimiert werden. T-Zellen erkennen Peptidfragmente (Epitope) dieser Antigene klassischerweise auf der Oberfläche der Zellen in Verbindung mit genetisch determinierten MHC-Molekülen (8). Die meisten Epitope sind neun Aminosäuren lange Peptide und wurden bisher für HLA-Klasse II identifiziert (2). T-Zellen benötigen zur vollen Aktivierung jedoch mindestens zwei Signale: neben der Erkennung der Epitope einerseits sind als zweites Signal kostimulatorische Moleküle wie z. B. B7.1 (DC80) bzw. B7.2. (CD 86) notwendig (9, 10). Tumorzellen verfügen nicht über diese kostimulatorischen Moleküle. Das ist wahrscheinlich auch der Grund, warum Tumorzellen, auch wenn sie Tumorantigene präsentieren, bei Patienten keine effiziente T-Zellantwort aktivieren. Tumorvakzinen sollen dieses Problem lösen helfen.

An der Entwicklung von Tumorimpfstoffen wird mit verschiedenen Ansätzen, u.a. unter Verwendung von genmodifizierten Tumorzellen (11), Peptiden/ Proteinen (12), dendritischen Zellen (13), DNA-Vakzinen (14, 15, 16) oder rekombinanten Viren (17, 18), gearbeitet.

1.1.1 Genmodifizierte Tumorzell-Vakzinen

Eine Möglichkeit der Konstruktion einer Vakzine besteht darin, Tumorzellen mit den für die T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Molekülen per *ex vivo* Gentransfer auszustatten. Um die Effizienz der Vakzinen zu erhöhen, können Tumorzellen *ex vivo* zusätzlich mit Zytokingenen transfiziert werden. Die so modifizierten Tumorzellen werden im autologen System als Vakzine mit dem Ziel eingesetzt, das zelluläre Immunsystem tumorspezifisch zu aktivieren. Über einen erfolgreichen retroviralen Gentransfer von Lymphokingenen in humane Nierenzell-Karzinomzellen berichteten u.a. Gastl G. et al. (19). Klinische Studien mit retroviral transfizierten Tumorzellen wurden durchgeführt, z.B. mit bestrahlten autologen Prostata-Karzinomzellen, die nach Transduktion GM-CSF sezernierten (11). B- und T-Zellantworten sowie Delayed Type Hypersensitivity (DTH) - Reaktionen wurden dabei induziert (11).

Vorteile dieser Vakzinen liegen darin, dass das Tumorantigen nicht identifiziert und charakterisiert werden muß und die Vakzine alle relevanten, auch individuelle Tumorantige, enthalten sollte. Ein Nachteil ist das möglicherweise noch vorhandene Metastasierungspotential und die Produktion von immunsupressorischen Faktoren durch die Tumorzellen. Schwierigkeiten stellen darüberhinaus das Erreichen einer ausreichenden Transfektionseffizienz und die aufwendige und zeitintensive Herstellung sowie die ausreichende Expansion der autologen Tumorzellen dar.

1.1.2 Peptid- und Proteinvakzinen

Voraussetzung für diesen Vakzinierungsansatz ist das Vorhandensein und die Kenntnis von immunogenen Peptiden bzw. Proteinen. Ein Vorteil ist die einfache technische Herstellung, nachteilig ist die Restriktion auf bestimmte HLA-Typen. Auch die Fokussierung auf ein einzelnes Epitop ist möglicherweise nicht ausreichend, um eine effektive Immunantwort zu induzieren. Unter dem Selektionsdruck kann es zu Verlusten der Epitope auf den Tumorzellen kommen und damit zur Ineffizienz der Immunisierung. Außerdem müssen die Peptide von APC präsentiert werden. Die Applikation erfolgt z. B. in die Haut in die Nähe von drainierenden Lymphknoten mit dem Ziel der Aufnahme durch dendritische Zellen. Dieser Weg ist aber nur schwer kalkulierbar. Weiterhin müssen kostimulatorische Substanzen bzw. Adjuvantien zusätzlich verabreicht werden, um eine volle T-Zellaktivierung zu erreichen.

Klinische Studien wurden hauptsächlich bei Patienten mit malignem Melanom, bei dem die meisten Epitope identifiziert wurden, durchgeführt (20, 21). Scheibenbogen C. et al. berichten über eine klinische Phase 2-Studie, bei der Tyrosinase-Peptide als Vakzine in Kombination mit GM-CSF bei 18 Patienten mit Malignem Melanom eingesetzt wurden (21). Ein Patient zeigte eine Regression der Lungenmetastasen, zwei Patienten mit vor der Immunisierung progredienter Erkrankung blieben stabil (21).

Als Adjuvantien wurden auch dendritische Zellen verwendet (20), z. B. auch in einer Vakzine gegen Human-Papillomavirus-Type 16 (HPV16)-induzierte Tumore (12). Ein 105 Aminosäuren langes, synthetisch hergestelltes Muzin-Peptid mit BCG als Adjuvants wurde in einer klinischen Phase I-Studie bei 63 Patienten verwendet und zeigte die Sicherheit dieser Vakzine sowie positive DTH-Reaktionen in einigen Fällen (22).

1.1.3 Verwendung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen als "professionelle" Antigen präsentierende Zellen (APC) spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer Immunantwort (Abb. 1). Sie verfügen über zur T-Zellaktivierung notwendige kostimulatorische Moleküle und haben die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, diese innerhalb der Zelle zu prozessieren und in die Lymphknoten zu wandern (4). Dort werden die Antigene unter Anwesenheit der kostimulatorischen Moleküle den T-Zellen präsentiert. Diejenigen T-Zellen, die das Antigen auf den dendritischen Zellen erkannt haben, vermehren sich, werden aus den Lymphknoten ausgeschwemmt und erreichen über die Zirkulation ihre Zielzellen und lysieren diese (4).

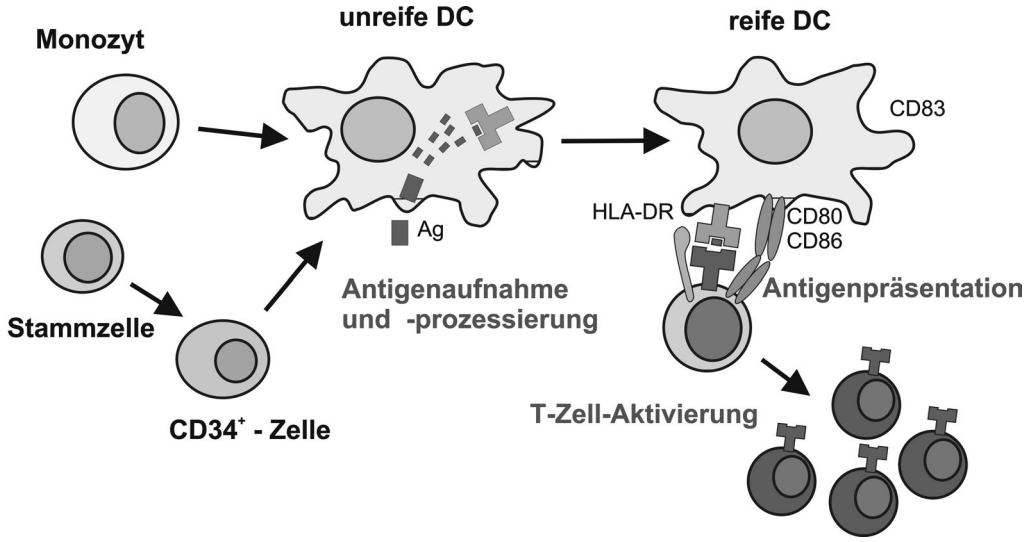

Abb. 1 Rolle der dendritischen Zellen bei der Induktion einer Immunantwort

Insbesondere Verfahren zur Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten unter Verwendung von Zytokincocktails wie Interleukin 4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen-kolonienstimulierender Faktor (GM-CSF) (5) werden in ersten klinischen Studien genutzt.

Autologe dendritische Zellen, gepulst mit Antigenen, wurden erstmals 1995 in einer klinischen Studie von Hsu F. J. et al. (23) zur Therapie bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen eingesetzt. Das Verfahren erwies sich als nicht toxisch und wurde von den Patienten gut toleriert. Ein klinisches Ansprechen wurde beobachtet.
Eine weitere Möglichkeit der Nutzung als Vakzine besteht in der *ex vivo* Beladung ("pulsen") von dendritischen Zellen mit Peptiden oder Proteinen. Auch hier erfolgten die ersten Studien mit gutem Erfolg beim Malignen Melanom (20).
In der Gruppe Finn wurden präklinische Studien mit Muzin-Peptid gepulsten autologen dendritischen Zellen an Schimpansen durchgeführt (24). Dabei konnte gezeigt werden, daß subkutan applizierte dendritische Zellen in den drainierenden Lymphknoten wandern (24).
Ebenfalls praktikabel scheint die Fusion von dendritischen Zellen mit Tumorzellen zu sein, bei der Anti-Tumor-Immunantworten beobachtet wurden (25).
Ein Gentransfer in dendritische Zellen stellt einen weiteren Ansatz dar, Tumorvakzinen zu konstruieren. Beschrieben sind der retrovirale (26, 27, 28), der adenovirale (29, 30, 31, 32, 33), der Rezeptor-vermittelte (34) Gentransfer sowie die Verwendung von Liposomen (33, 35, 36, 37).

Es ist derzeit nicht abzusehen, welcher Weg sich in der klinischen Anwendung durchsetzen wird. Entscheidend werden hierbei auch Praktikabilität unter Good Manufacturing Practice (GMP)- und Good Clinical Practice (GCP)-Bedingungen, Kosten und Standardisierbarkeit sein.

1.1.4 Verwendung von aktivierten B-Zellen

Anstelle von dendritischen Zellen können auch aktivierte B-Zellen als APC verwendet werden (38, 39, 40, 41, 42). Epstein-Barr-Virus (EBV)-immortalisierte B-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle wie B7.1 und B7.2 und wurden als Vakzine in Schimpansen verwendet (42). Für klinische Anwendungen müßte sichergestellt sein, dass von der Vakzine kein Virus produziert wird. Bei dendritische Zellen stellt sich dieses Problem nicht und sie sind im Vergleich zu aktivierten B-Zellen potentere APC bei der Initiation einer zellulären Immunantwort bzw. dem "primen" von "naiven" T-Zellen.

Über eine klinische Studie, bei der spontane lymphoblastoide Zelllinien von latent mit EBV infizierten Tumorpatienten mit mutiertem p21 ras bei Patienten mit Pankreaskarzinom als Vakzine verwendet wurde, wird berichtet (43). Bei den Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung war jedoch kein Tumoransprechen zu verzeichnen.

1.1.5 Rekombinante Viren

Neben der beschriebenen Verwendung von dendritischen Zellen als Vakzine wird auf die Entwicklung neuer, nicht zellulärer Vakzinen fokussiert, die kostengünstiger und nicht mit der Problematik der individuellen Herstellung von Zellen behaftet sind. Hier kommen neben "nackten" DNA-Vakzinen (s. 1.1.6) rekombinante Vaccinia- und adenovirale Vektoren in Betracht (17, 18, 44, 45). Vaccinia-Viren wurden als Vakzine erfolgreich zur Beseitigung der Pockeninfektion eingesetzt und stellen eines der effizientesten Expressionssysteme, die in der Biotechnologie verwendet werden, dar. Rekombinante Vaccinia-Viren, die HIV-ProteinV exprimieren, waren in der Lage, Rhesusaffen gegen ein HIV-"challenge" zu schützen (46). Ein erfolgreicher Einsatz in der Tumortherapie unter Verwendung von Epitopen des Tumorantigens Carcinoembryonales Antigen (CEA) wurde von Kass E. et al. beschrieben (43).
Rekombinante humane Adenoviren sind auf Grund ihrer hohen Proteinproduktion attraktiv für die Verwendung als Vektoren in der Gentherapie (47, 48). Adenoviren infizieren proliferierende und ruhende Zellen. Meistens werden replikationsdefiziente Viren, bei denen die E1-Region des Genoms fehlt, verwendet (48). Die starke Immunogenität der viralen Proteine könnte die Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort ergänzen, Wechselwirkungen sind jedoch noch zu eruieren. Über eine erste klinische Studie bei Patienten mit Malignem Melanom wird von Rosenberg S.A. et al. (45) berichtet.

1.1.6 "Nackte" DNA-Vakzinen

Im Gegensatz zu viralen Vektorsystemen sind nicht-virale Systeme einfacher und sicherer anzuwenden und benötigen einen geringeren präparativen Aufwand. DNA-

Vakzinen verwenden Gene, die für Proteine kodieren, die von Antigenen stammen. "Nackte" -Vakzinen bestehen aus einem Plasmid mit einem starken Promotor, in dem das Gen von Interesse (z.B. für ein Antigen) integriert ist sowie Sequenzen zur Transkriptionsinitiation und -termination (49). Die Plasmide werden in Bakterien (E. coli) vermehrt, gereinigt, in Flüssigkeit aufgenommen und können dann direkt appliziert werden. Die Plasmide werden von den Muskelzellen oder dendritischen Zellen aufgenommen, in entsprechende Boten-RNA transkribiert und in Proteinantigene übersetzt.

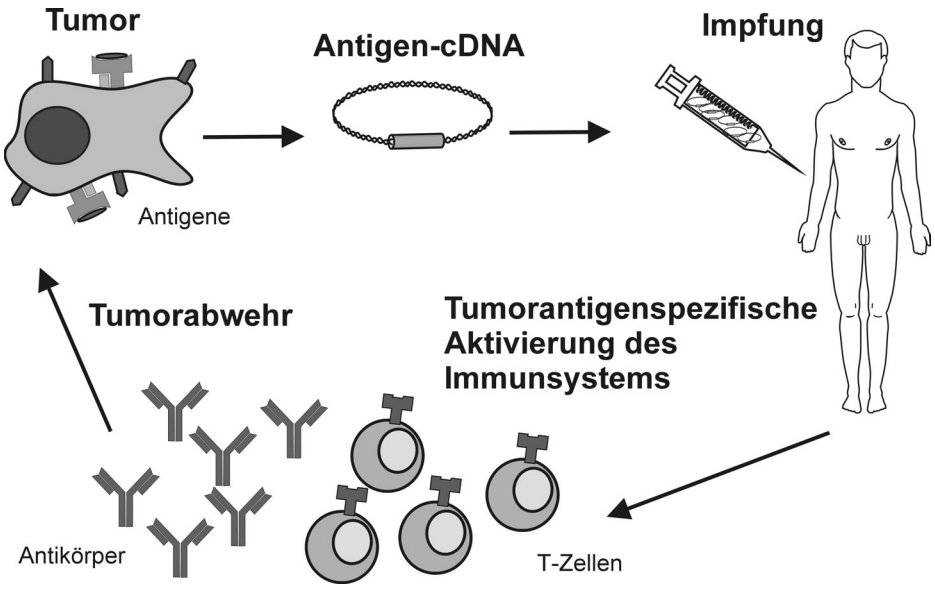

Abb. 2 Wirkungweise einer "nackten" DNA-Vakzine (aus: Pecher G. 2002. DNA basierte Tumorvakzinierung. Symp. Medical. 2: 30-31)

"Nackte" DNA-Vakzinen haben bereits erfolgreich eine protektive Immunität gegen ein breites Spektrum infektiöser Agentien (z.B. Hepatitis B, Malaria) im Tierversuch bewiesen (50, 51). In den Muskel injiziert führten sie zu einer antigenspezifischen T-Zell- und Antikörperantwort (Abb. 2).

Die Effektivität dieser Vakzinen kann gesteigert werden durch die Verwendung von CpG-Oligonukleotiden in den Vektoren (52, 53, 54). CpG-Motive sind nichtmethylierte

Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen. Synthetische Oligonukleotide, die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren eine zusätzliche immunstimulatorische Wirkung, die u.a. auch für die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen genutzt werden kann (55).
Interessant sind Ansätze, die Plasmide verwenden, die zusätzlich zu der Antigen-DNA die cDNA von beispielsweise GM-CSF (56) oder Hitzeschockproteinen (57) mit dem Ziel der Verstärkung der induzierten Immunantwort enthalten und virale und "nackte" DNA-Vakzinen kombinieren (56).

1.2 Das Tumorantigen Muzin

Pankreas- und Mammakarzinome entstehen durch maligne Transformation von normalen epithelialen Zellen. Beide, normale und maligne transformierte Zellen, exprimieren auf ihrer Oberfläche das Glykoprotein Muzin, bekannt auch als "Polymorphic epihelial mucin" (PEM) oder Episialin und kodiert durch das Gen MUC1 [kloniert von S. Gendler (58, 59) und S. M. Lan (60)]. Die Besonderheit von MUC1, exprimiert in Pankreas- und Mammageweben, liegt darin, dass es 40 bis 100 "Tandem Nucleotid Repeats" enthält. Ein Repeat besteht aus 20 Aminosäuren einer bestimmten Sequenz (Abb. 3).

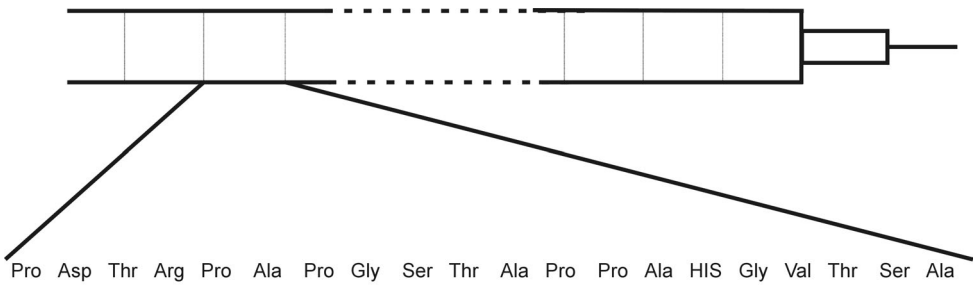

Abb. 3 Muzin-"Tandem Nucleotid Repeat"-Sequenz

Muzin zeigt auf Tumorzellen ein anderes Glykosylierungsmuster als auf gesunden Zellen (61). Es ist auf Grund einer gesteigerten Proliferationsrate oder einer aberranten Glykosyltransferase weniger glykosyliert (62, 63). Infolge dieser aberranten Glykosylierung werden auf dem Muzinmolekül von Karzinomzellen Peptid-Epitope "freigelegt", die vorher (auf normalen Zellen) von Kohlenhydraten maskiert waren (64) (Abb. 4). Diese Peptid-Epitope können vom Immunsystem als fremd erkannt werden (65, 66).

Von der Arbeitsgruppe O. J. Finn (67) und weiteren Gruppen (C. G. Ionnides, T. Takahashi) (68, 69) konnten tumorspezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) aus Lymphknoten von Pankreas-und Mammakarzinompatienten gewonnen und kloniert werden, die das aberrant glykosylierte Muzinmolekül als Tumorantigen erkennen (70).

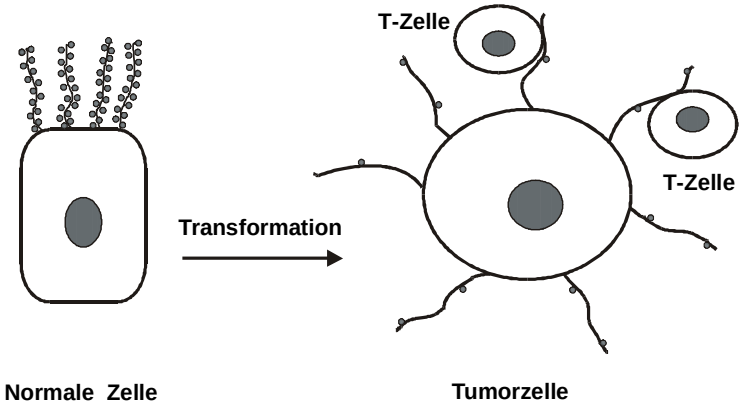

Abb. 4 Muzin auf normalen Zellen und auf Tumorzellen

Das Peptid-Epitop mit der Aminosäuresequenz Pro Asp Thr Arg Pro auf diesem Molekül, das auf Tumorzellen nicht glykosyliert ist, wurde als wahrscheinliches Target für diese tumorspezifischen CTL identifiziert (71). Das gleiche Epitop wird auch von tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern (SM3, deshalb als SM3 Epitop bezeichnet,) erkannt (72, 73, 74, 75, 76). Die CTL lysierten mehrere Muzin exprimierende Tumor-Zellinien unabhängig vom MHC-Typ, jedoch nicht Muzin negative Tumor-Zellinien und normale Muzin produzierende Zellen (71, 77, 78). Die MHC-unabhängige Erkennung dieser Muzinepitope wird mit der besonderen Struktur des Moleküls ("Tandem Nukleotid Repeat") sowie der hohen Dichte des Antigens auf der präsentierenden Zelle erklärt. Die mehrfache Wiederholung des immunogenen Peptid-

Motivs kann möglicherweise zu einer Aktivierung der T-Zellen durch ein "Crosslinking" des T-Zell-Rezeptors führen, ohne dass der MCH-Komplex vorhanden sein muß (79). Darin liegt eine Besonderheit des Muzinmoleküls als Antigen, das als ganzes Molekül auf der Zelloberfläche erkannt werden kann. SM3 Epitope finden sich immunhistochemisch auf Pankreas- und Mammakarzinomgewebe in allen untersuchten Fällen unabhängig vom histologischen Typ, ebenso auch auf Metastasen der entsprechenden Karzinome (73).
Neben dieser MHC-unabhängigen Erkennung des Muzinmoleküls existiert auch der klassische Weg der Epitoperkennung und der Antigenpräsentation in Verbindung mit dem HLA-A2-Komplex (80, 81, 82).
Muzin-spezifischen CTL-precursor-Frequenzen bei Patienten wurden mittels Limiting Dilution Assay (LDA) bestimmt (83). Bei Anwendung des Assays, zunächst für Tumorpatienten verglichen mit gesunden Probanden, zeigte sich, dass einige Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden höhere CTL-precursor-Frequenzen für Muzin-Epitope im peripheren Blut haben (83). Es ist jedoch festzustellen, dass die Tumorpatienten nur eine relativ niedrige Mucin-Epitop-spezifische CTL-precursor-Frequenz aufweisen, was u. a. darauf hinweist, daß Tumorzellen keine optimalen Antigen präsentierenden Zellen für die T-Zellaktivierung sind.
Die Verwendung von Muzin-Epitopen zur Konstruktion einer Vakzine mit dem Ziel der Stimulierung autologer Tumor-spezifischer-CTL stellt einen vielversprechenden Immuntherapieansatz insbesondere bei Patienten mit Muzin-exprimierenden Mamma- und Pankreaskarzinomen dar.

Das Mammakarzinom ist der am häufigsten auftretende Tumor bei Frauen. Das Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, beträgt ca. 10%. Das metastasierte Mammakarzinom ist zur Zeit immer noch eine unheilbare Krankheit. Die mediane Überlebenszeit von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom beträgt 18-24 Monate. Das Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen in westlichen Industrieländern dar. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben 75-85% der Patienten einen nicht mehr resezierbaren Tumor. Konservative onkologische Strategien wie Chemo- oder Strahlentherapie haben nicht zu einer Verbesserung der Prognose geführt. Die Mehrheit der Patienten verstirbt innerhalb von 3-6 Monaten.

Die Suche nach neuen Therapiekonzepten sowohl beim metastasierten Mammakarzinom als auch beim Pankreaskarzinom ist somit angezeigt.

2. Präklinische und klinische Studien

2.1 Induktion einer Immunantwort in Schimpansen durch Vakzinierung mit Muzin-cDNA-transfizierten autologen Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierten B-Zellen

Pecher G. and O. J. Finn. 1996. Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA transfected EBV-immortalized autologous B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 93:1699-1704

Mit Muzin-cDNA transfizierte Zellen, die eine große Anzahl immunogener Epitope exprimieren, bieten die Chance, eine hohe Dichte der Epitope zu gewährleisten und so ein ausreichendes "Crosslinking" der T-Zell-Rezeptoren zu erreichen. Weiterhin werden zur vollen Aktivierung von CTL und zum "Priming" von naiven T-Zellen kostimulierende Moleküle, wie z. B. B7, benötigt (10). Es liegt also nahe, Muzin-cDNA in "professionelle" autologe Antigen präsentierende Zellen (APC), die diese Liganden exprimieren und im Gegensatz zu Tumorzellen keine immunsuppressiven Substanzen produzieren, zu transfizieren. Solche geeigneten APC sind aktivierte B-Zellen oder dendritische Zellen (s. Abschnitte 1.1.3 und 1.1.4). Eine Vakzine mit dem Ziel der Muzin-Epitop spezifischen T-Zellaktivierung, die autologe APC transfiziert mit Muzin-cDNA enthielt, wurde an Schimpansen getestet. Als aktivierte B-Zellen wurden EBV-immortalisierte B-Zellen, die mittels Elektroporation mit MUC1 (das Plasmid enthielt 22 Wiederholungen der "Tandem Nucleotid-Sequenz") transfiziert wurden, verwendet. Schimpansen besitzen ebenfalls die "Tandem Nucleotid Sequenz" des MUC1. SM3-Epitope wurden durch Anwendung des kompetitiven Glykosylierungsinhibitors Phenyl-N-α-D-Galactosaminid (Phenyl-GalNac) (84) zur Expression gebracht. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich war, durch diese Vakzinierungsform in den Schimpansen nach Immunisierung CTL spezifisch für Muzin-Tumor-Epitope zu erzeugen (vor Immunisierung waren keine Tumor-Epitop spezifischen CTL im peripheren Blut der Schimpansen nachweisbar). Eine besonders hohe T-Zellfrequenz war nach der Immunisierung im drainierenden Lymphknoten der Vakzinierungsseite zu finden. Ebenso

wies eine für Muzin spezifische "Delayed Type Hypersensitivity" (DTH) Reaktion auf eine erfolgte T-Zellaktivierung hin. Durch diese Vakzinierung war es möglich, T-Zellen *in vivo* für Tumor-spezifische Muzinepitope zu "primen". Bei den Schimpansen traten keine Nebenwirkungen, Toxizitäts- oder Autoimmunerscheinungen auf.

2.2 Humorale Immunantwort gegen Muzin

Kotera Y., J. D. Fontenot, G. Pecher, R. S. Metzgar, and O. J. Finn. 1994. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res*. 54: 2856-2860

Die Daten in dieser Publikation wurden vorrangig von Y. Kotera erhoben. G. Pecher hat daran mitgearbeitet und die Ergebnisse zur Immunhistologie der Tumorzellen gewonnen.

Tumorspezifische humorale Immunantworten in Patientenseren wurden gegen verschiedene Tumorantigene oder Onkogene, u.a. gegen c-myc bei kolorektalen Karzinomen (85), c-erbB-2/HER-2/neu bei Mammakarzinomen (86, 87) oder gegen p53-Epitope bei Bronchialkarzinomen (88) gefunden. Die therapeutische Bedeutung ist unklar. Auch gegen Muzin-Epitope wurde eine Antikörperantwort ermittelt. Seren von 24 Patienten mit Mammakarzinom, 10 Patienten mit Kolonkarzinom und 12 Patienten mit Pankreaskarzinom wurden mittels ELISA unter Verwendung von 60, 80 und 105 Aminosäuren langen synthetischen Peptiden aus der "Tandem Repeat Region" getestet. 8,3% der Mammakarzinom-Seren, 16,7 % der Pankreaskarzinom-Seren und 10% der Kolonkarzinom-Seren waren positiv. Die höchsten Titer wurden bei Verwendung des 105 Aminosäure langen Muzin-Peptids erreicht. Die Antikörperantworten waren vom IgM-Isotyp. Mit Peptiden, die das Epitop Ala Pro Asp Thr Arg Pro enthielten, konnte im Assay die Antikörperantwort geblockt werden, so dass geschlußfolgert wird, dass die Antikörper dieses Epitop erkennen.

2.3 Zelluläre Immunantwort gegen Muzin

Jerome K. R., A. D. Kirk, G. Pecher, W. W. Ferguson, and O. J. Finn. 1997. A survivor of breast cancer with immunity to MUC-1 mucin, and lactational mastitis. *Cancer Immunol. Immunother*. 43: 355-360

Die klinische Daten wurden vorrangig von K. R. Jerome ermittelt. G. Pecher hat die Ergebnisse zur Bestimung der zellulären Immunantwort bei der Patientin erhoben.

Es wird der Fall einer Mammakarzinompatientin beschrieben, die fünf Jahre nach der Mastektomie schwanger wurde und dabei in der verbliebenen Brust eine schwere inflammatorische Mastitis entwickelte. Diese wurde histologisch bestätigt, es fand sich kein Hinweis auf Malignität. Das Mastitis-Gewebe exprimierte wie das Tumorgewebe unglykosylierte Muzinepitope. Die T-Zellantwort bei der Patientin wurde mittels Limiting Dilution Assay (LDA) bestimmt. In drei Experimenten betrug die Muzinspezifische T-Zell-Frequenz jeweils 1 in 3086 , 1 in 673 und 1 in 583. Verglichen mit Gesunden, die eine Frequenz von ca. 1 in 1 Million haben (83), ist das eine sehr hohe Frequenz. Die Patientin blieb über den Beobachtungszeitraum von weiteren fünf Jahren karzinomfrei. Es wird angenommen, dass der primäre Tumor eine zelluläre Immunantwort bei der Patientin induziert hat und, dass die Expression der Epitope auf dem Mastitisgewebe eine zweite Immunantwort ausgelöst hat, die vor dem Auftreten eines Karzinoms bzw. vor Metastasen geschützt hat.

2.4 Muzin exprimierende "Mini"-Epstein-Barr-Virus-immortalisierte B-Zellen zur Erzeugung zytotoxischer T-Zellen

E. Kilger*, Pecher G.*, A. Schwenk and W. Hammerschmidt. 1999. Expression of Mucin (MUC-1) from a Mini-Epstein-Barr Virus in immortalized B-cells to generate tumor antigen specific cytotoxic T cells. *J. Gene Med.* 1: 84-92, * joined first author

Aktivierte B-Zellen können als APC zur Stimulation spezifischer T-Zellantworten verwendet werden (39, 40). "Mini"-EBV-Plasmide enthalten alle funktionellen Elemente, die zur Immortalisierung von B-Zellen notwendig sind. Es wurde ein "Mini"-EBV-Plasmid mit einer Expressionskassette für Muzin konstruiert. Mit dem "Mini"-EBV-Muzin-Plasmid wurden primäre humane B-Zellen infiziert. Die etablierten B-Zellinien waren frei von Helfer-Viren und Wildtyp-EBV. Die Zellinien wurden mittels Durchflußzytometrie auf die Expression von Muzin und das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle getestet und zur Stimulation von PBMC, die von gesunden Spendern stammten, verwendet. Es gelang, zytotoxische T-Zellen, die die Muzin-exprimierende Mammakarzinom-Zelllinie Cama und die Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan2, jedoch nicht die nicht Muzin-exprimierende Zelllinie Raji lysierten, zu generieren. Die Lyse konnte mit einem Muzin-Epitop-erkennenden mAk geblockt werden.

Virusfreie B-Zelllinien, die Tumorantigene wie z. B. Muzin exprimieren, liefern eine unbegrenzte und sichere Quelle für APC, mit denen *ex vivo* T-Zellen antigenspezifisch stimuliert und expandiert werden können. Dieser Ansatz könnte für eine adoptive Immuntherapie genutzt werden.

2.5 Herstellung eines immortalisierten humanen CD4+ T-Zell-Klons, der Muzin exprimierende Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* lysiert

Pecher G., Harnack U., Günther M., Hummel M., Fichtner I., and J. A. Schenk. 2001. Generation of an immortalized human CD4+ T cell clone inhibiting tumor growth in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 283:738-742

Tumorantigenspezifische T-Zell-Klone sind ein hilfreiches Mittel in der Tumorimmunologie um die Interaktionen zwischen Effektorzellen und Antigen zu studieren. Die Lebensdauer eines solchen Klons in der Zellkultur ist in der Regel jedoch begrenzt. Um einen immortalisierten T-Zell-Klon zu generieren, wurde eine "Mixed Lymphocyte Culture" mittels Herpesvirus saimiri transfomiert. Es konnte ein CD4+ T-Zell-Klon gezüchtet werden. Die Klonalität wurde durch die Analyse des αβ T-Zell-Rezeptors bewiesen. Der Rezeptor wurde sequenziert. Der Klon wies eine zytolytische Aktivität gegenüber Muzin-exprimierenden Tumorzellinien auf. Weiterhin wurden in einem NOD/SCID-Mausmodell Muzin-exprimierende Tumorzellen (Panreaskarzinomzellinie Capan-2) durch den Klon im Wachstum gehemmt.
Die Kenntnis des T-Zell-Rezeptors dieses Klons liefert die Grundlage für eine mögliche adoptive Immuntherapie, bei der der Rezeptor z. B. in rekombinanten chimären Konstrukten mittels Gentransfer in Effektorzellen verbracht werden kann, um ein antigenspezifisches Targeting zu erreichen.

2.6 Hemmung des Tumorwachstums im Mausmodell durch eine Muzin-DNA-Plasmid-Vakzine

H. Johnen, H. Kulbe and G. Pecher. 2001. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1) *Cancer Immunol. Immunother*. 50: 356-360

In einem Mausmodell wurden verschiedene nicht zelluläre Vakzinen als präklinische Studien auf ihre Effektivität hin getestet. C57/BL6-Mäuse wurden mit dem Plasmid pCI-

MUC1 zweimal, am Tag 1 und Tag 10, immunisiert. Die Applikation erfolgte intramuskulär. Fünf Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte ein "Tumor-challenge" mit der murinen Tumorzelllinie MC38, die retroviral mit humanem MUC1 transduziert ist. In 85% der mit pCI-MUC1 immunisierten Mäuse wurde ein "Nichtanwachsen" des Tumors beobachtet, während in der Kontrollgruppe bei allen Mäusen der Tumor anwuchs. Nach drei Monaten erfolgte ein "re-Tumor-challenge". In den mit pCI-MUC1-geimpften Mäusen trat kein Tumorwachstum auf. Diese Mäuse waren offensichtlich durch die Muzin-DNA-Impfung vor einem Tumorwachstum langzeitlich geschützt.
Die "nackte" DNA-Vakzinierung stellt möglicherweise auch für die Immunisierung von Tumorpatienten einen vielversprechendes Verfahren dar.

2.7 Muzingentransfer in humane dendritische Zellen unter Verwendung von kationischen Liposomen und rekombinanten Adenoviren

Pecher G., Spahn G., Schirrmann T., Kulbe H., Ziegner M., Schenk J.A., and V. Sandig. 2001. Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res.* 21: 2591-2596

Als Vorbereitung auf eine klinische Studie wurden Gentransferverfahren in humane dendritische Zellen erprobt. Es konnte gezeigt werden, dass sich dendritische Zellen als APC mittels kationischer Liposomen (Lipofectin^{R}) effizient mit Muzin-cDNA transfizieren lassen. Es wurde das Plasmid pCMV/MUC1 verwendet. Die Transfereffizienz, die mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung von Muzin-Antikörpern ermittelt wurde, lag dabei bei 5 bis 20%. Nach der Transfektion exprimierten die dendritischen Zellen den Reifungsmarker CD83. Das ist ein möglicher Hinweis, dass durch die Antigenaufnahme die dendritischen Zellen ausgereift sind. Muzin-cDNA-transfizierte und mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-GalNac behandelte autologe dendritische Zellen erwiesen sich als geeignete Stimulatorzellen für periphere Blutlymphozyten (PBL). Mit einem Muzin-exprimierenden Adenovirus wurde eine Gentransfereffizienz von 20-40% erzielt. Die Stimulierbarkeit von PBL war vergleichbar mit der von liposomal transfizierten dendritischen Zellen.

2.8 Effiziente Kryokonservierung von Muzin-cDNA-transfizierten humanen dendritischen Zellen für die klinische Anwendung

Pecher G., Schirrmann T., L. Kaiser L. and J.A. Schenk. 2001. Efficient cryopreservation of dendritic cells transfected with cDNA of a tumour antigen for clinical application. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34:161-166

Als weitere Vorbereitung für klinische Studien wurde eine effiziente Methode des Einfrierens von dendritischen Zellen etabliert. Für klinische Studien ist es erforderlich, standardisierte GMP-und GCP-gerechte Verfahren zu verwenden. Die Möglichkeit des Einfrierens der Vakzine trägt zur besseren Praktikabilität bei. Es wurde ein Verfahren etabliert, bei dem der Plasmaexpander Gelifundol^{R} (Oxypolygelatine) verwendet wird. Die DMSO-Konzentration reduzierte sich auf 5%. Es mußte kein fötales Kälberserum oder anderes Serum verwendet werden. Nach dem Einfrieren und Auftauen wiesen die dendritischen Zellen den typischen Phänotyp (CD 80+, CD83+, CD86+) auf und waren in der Lage, PBL in ähnlicher Weise zu stimulieren wie vor dem Einfrieren.

2.9 Klinische Phase I / II - Studie: Muzingen-transfizierte autologe humane dendritische Zellen als Vakzine

Pecher G., A. Häring, L. Kaiser and E. Thiel. 2002. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I / II clinical trial, *Cancer Immunol Immunother*, in press, published online 19. 10. 2002

Es wurde eine klinische Phase I / II-Studie, bei der liposomal MUC1-transfizierte autologe dendritischen Zellen als Vakzine verwendet wurden, durchgeführt. In die Studie aufgenommen wurden 10 Patienten mit Mamma-, Pankreas- und Papillenkarzinom. Die Patienten erhielten jeweils zwei bzw. drei Immunisierungen im Abstand von drei Wochen. Appliziert wurden jeweils eine Million MUC1-transfizierte und mit dem Glykosylierungsinhibitor Phenyl-GalNac behandelte autologe dendritische Zellen subkutan in die Nähe der Leistenlymphknoten. Eine Vakzine-spezifische DTH wurde bei 3 der 10 Patienten beobachtet. 4 Patienten zeigten nach der Vakzinierung einen 2-bis 10-fachen Anstieg der Frequenz der Muzin-spezifischen Interferon-gamma-sezernierenden CD8+ T-Zellen im peripheren Blut. Es traten keine Toxizität und keine Nebenwirkungen auf. 9 der 10 Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung waren weiter progredient. Eine Mammakarzinom-Patientin, die bereits vor der Immunisierung eine positive spezifische DTH-Reaktion aufwies und die auch einen Anstieg der Muzin-spezifischen

Interferon-gamma-sezernierenden CD8+ T-Zellen im peripheren Blut nach der Immunisierung aufwies, war stabil für drei Monate seit Beginn der Vakzinierung. Die Patientin hatte außer Lebermetastasen keine weiteren Tumormanifestationen. Ihre Erkrankung war im Vergleich zu den anderen Patienten am wenigstens fortgeschritten. Das begründet möglicherweise den relativen Erfolg der Vakzinierung bei dieser Patientin. Insgesamt konnte demonstriert werden, dass diese Art von Vakzinierung durchführbar und sicher ist, und dass Immunantworten auch bei Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung erzielt wurden.

3. Zusammenfassung

Tumorvakzinierungen stehen erst am Anfang des klinischen Einsatzes. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Immunisierungsansätze unter Verwendung des Tumorantigens Muzin entwickelt.

Virusfreie "Mini"-EBV-B-Zellinien, die Tumorantigene wie z. B. Muzin exprimieren, liefern eine unbegrenzte und sichere Quelle für APC, mit denen *ex vivo* T-Zellen antigenspezifisch stimuliert und expandiert werden können. Dieser Ansatz könnte für eine adoptive Immuntherapie genutzt werden.

Die Kenntnis des T-Zell-Rezeptors eines Muzin-erkennenden T-Zell-Klons liefert die Grundlage für eine mögliche adoptive Immuntherapie, bei der der Rezeptor z. B. in rekombinanten chimären Konstrukten mittels Gentransfer in Effektorzellen verbracht werden kann, um ein antigenspezifisches Targeting zu erreichen.

Die "nackte" DNA-Vakzinierung stellt möglicherweise auch für die Immunisierung von Tumorpatienten einen vielversprechendes Verfahren dar. Sie hat den Vorteil, dass sie einfach herzustellen ist und nicht wie zelluläre Vakzinen mit hohem Zeit- und Kostenaufwand sowie nicht patientenindividuell hergestellt werden muß.

Eine Vakzine unter Verwendung liposomal MUC1-transfizierter autologer dendritischer Zellen wurde bereits in eine klinische Phase I / II umgesetzt. Es konnte demonstriert werden, dass diese Art von Vakzinierung durchführbar und sicher ist, und dass Immunantworten auch bei Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung erzielt werden konnten.

DNA-Vakzinen, die eine große Anzahl immunogener Epitope exprimieren können, bieten die Chance eines verstärkten Immunisierungseffektes und die Konstruktion von Multi-Epitop-Vakzinen um somit auch Escape-Phänomenen vorzubeugen.

Zur Induktion einer effizienten Immunantwort kann es sinnvoll sein, DNA-Vakzinen in Kombination von verschiedenen Vektorsystemen und Ansätzen zu verwenden.

Es ist erstrebenswert, eine Tumorvakzine möglichst zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. in einer adjuvanten Therapiesituation oder bei "minimal residual disease" einzusetzen.

Literaturverzeichnis

1. Henderson RA, Finn OJ. 1996. Human tumor antigens are ready to fly. Adv. Immunol. 62: 217-256

2. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. Cancer Immunol. Immunother. 50: 3-15

3. Wang RF, Rosenberg SA. 1999. Human tumor antigens for cancer vaccine development. Immunol. Rev. 170: 85-100

4. Banchereau J, Steinman, RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 392: 245-252

5. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. J. Immunol. Methods. 196:137-151

6. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M. 1997. Serological identification of human tumor antigens. Curr. Opin. Immunol. 9: 709-716

7. Chen YT. 2000. Cancer vaccine: identification of human tumor antigens by SEREX. Cancer J. 6: S208-217

8. Boon T. 1993. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes - present perspectives for specific immunotherapy. (Review). Int. J. Cancer. 54 : 177-180

9. Li Y, McGowan P, Hellstrom I, Hellstrom KM, Chen L. 1994. Costimulation of tumor -reactive CD4+ and CD8+ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma. J. Immunol. 153: 421-428

10. Weaver CT, Unanue ER. 1990. The costimulatory function of antigen- presenting cells. Immunol. Today 11: 49-55

11. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG. 1999. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. Cancer Res. 15: 5160-5168

12. De Bruijn ML, Schuurhuis DH, Vierboom MP, Vermeulen H, deCock KA, Ooms ME, Ressing ME, Toebes M, Franken KL, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Offringa R, Melief CJ. 1998. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. Cancer Res. 58: 724-731

13. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze WJ, Falo LD Jr. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. J. Exp. Med. 183: 283-287

14. Abe A, Emi N, Taji H, Kasai M, Kohno A, Saito H. 1996. Induction of humoral and cellular anti-idiotypic immunity by intradermal injection of naked DNA encoding a human variable region gene sequence of an immunoglobulin heavy chain in a B cell malignancy. Gene Ther. 3: 988-993

15. White SA, LoBuglio AF, Arani RB, Pike MJ, Moore SE, Barlow DL, Conry RM. 2000. Induction of anti-tumor immunity by intrasplenic administration of a carcinoembryonic antigen DNA vaccine. J. Gene Med. 2: 135-140

16. Johnen H, Kulbe H, Pecher G. 2001. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1) Cancer Immunol. Immunother. 50: 356-360

17. Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW. 1999. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. Cancer Res. 59: 676-683

18. Chen PW, Wang M, Bronte V, Zhai Y, Rosenberg SA, Restifo NP. 1996. Therapeutic antitumor response after immunization with a recombinant adenovirus encoding a model tumor-associated Antigen. J. Immunol. 156: 224-231

19. Gastl G, Finstad CL, Guarini A, Bosl G, Gilboa E, Bander NH, Gansbacher B. 1992. Retroviral vector-mediated lymphokine gene transfer into human renal cancer cells. Cancer Res. 15: 6229-6236

20. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat. Med. 4: 328-332

21. Scheibenbogen C, Schmittel A, Keilholz U, Allgauer T, Hofmann U, Max R, Thiel E, Schadendorf D. 2000. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. J. Immunother. 23: 275-281

22. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. 1996. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. J. Surg. Res. 63: 298-304

23. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. Nat. Med. 2: 52-58

24. Barratt-Boyes SM, Vlad A, Finn OJ. 1999. Immunization of chimpanzees with tumor antigen MUC1 mucin tandem repeat peptide elicits both helper and cytotoxic T-cell

responses. Clin. Cancer Res. 5: 1918-1924

25. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. 1997. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. Nat. Med. 3: 558-561

26. Henderson RA, Nimgaonkar MT, Watkins SC, Robbins PD, Ball ED, Finn OJ. 1996. Human dendritic cells genetically engineered to express high levels of the human epithelial tumor antigen mucin (MUC-1). Cancer Res. 56: 3763-3770

27. Aicher A, Westermann J, Cayeux S, Willimsky G, Daemen K, Blankenstein T, Uckert W, Dorken B, Pezzutto A. 1997. Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells. Exp. Hematol. 25: 39-44

28. Szabolcs P, Gallardo HF, Ciocon DH, Sadelain M, Young JW. 1997. Retrovirally transduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T-cell stimulatory capacity. Blood. 90: 2160-2170

29. Kaplan JM, Yu Q, Piraino ST, Pennington SE, Shankara S, Woodworth LA, Roberts BL. 1999. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. J. Immunol. 163: 699-707

30. Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Dissette VB, Lau R, Gamradt SC, Glaspy JA, McBride WH, Mukherji B, Economou JS. 1998. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. J. Immunol. 161: 5607-5613

31. Gong J, Chen L, Chen D, Kashiwaba M, Manome Y, Tanaka T, Kufe D. 1997. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. Gene Ther. 4: 1023-1028

32. Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. 1998. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. Blood. 91: 392-398

33. Pecher G, Spahn G, Schirrmann T, Kulbe H, Ziegner M, Schenk JA, Sandig V. 2001. Mucin (MUC1) gene transfer into human dendritic cells by cationic liposomes or recombinant adenovirus. Anticancer Res. 21: 2591-2596

34. Diebold SS, Kursa M, Wagner E, Cotten M, Zenke M. 1999. Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. J. Biol. Chem. 274: 19087-19094

35. Zheng L, Huang XL, Fan Z, Borowski L, Wilson CC and Rinaldo CRJ. 1999. Delivery of liposome-encapsulated HIV type 1 proteins to human dendritic cells for stimulation of HIV type 1-specific memory cytotoxic T lymphocyte responses. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 15: 1011-1020

36. Alijagic S, Moller P, Artuc M, Jurgovsky K, Czarnetzki BM, Schadendorf D. 1995.

Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. Eur. J. Immunol. 25: 3100-3107

37. Pecher G, Häring A, Kaiser L, Thiel E. 2002. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine - results from a phase I / II clinical trial, Cancer Immunol. Immunother. in press, published online 19. 10. 02

38. Ron Y, Sprent J. 1987. T cell priming in vivo : a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes. J. Immunol. 138: 2848-2856

39. Finkelman FD, Lees A, Morris SC. 1992. Antigen presentation by B Lymphocytes to CD4+ T lymphocytes in vivo: Importance for B lymphocyte and T lymphocyte activation. Sem. Immunol. 4: 247-255

40. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM. 1993. Activared human B lymphocytes express three CTLA 4 counter receptors that co-stimulate T cell activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11059-11063

41. Jerome KR, Bu D, Finn OJ. 1992. Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr-Virus-immortalized B-cells and Burkitt's Lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA. Cancer Res. 52: 5985-5990

42. Pecher G, Finn OJ. 1996. Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA transfected EBV-immortalized autologous B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 1699-1704

43. Kubuschok B, Schmits R, Hartmann F, Cochlovius C, Breit R, Konig J, Pistorius G, Schilling M, Renner C, Pfreundschuh M. 2002. Use of spontaneous Epstein-Barr virus-lymphoblastoid cell lines genetically modified to express tumor antigen as cancer vaccines: mutated p21 ras oncogene in pancreatic carcinoma as a model. Hum. Gene Ther. 13: 815-827

44. Chen CH, Wang TL, Hung CF, Pardoll DM, Wu TC. 2000. Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines. Vaccine. 18: 2015-2022

45. Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Seipp CA, Einhorn JH, Roberts B, White DE. 1998. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. J. Natl. Cancer Inst. 90: 1894-1900

46. Lekutis C, Shiver JW, Liu MA, Letvin NL. 1997. HIV-1 env DNA vaccine administered to rhesus monkeys elicits MHC class II-restricted CD4+ T helper cells that secrete IFN-gamma and TNF-alpha. J. Immunol. 158: 4471-4477

47. Christ M, Lusky M, Stoeckel F, Dreyer D, Dieterle A, Michou AI, Pavirani A, Mehtali M. 1997. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. Immunol. Lett. 57: 19-25

48. Nunes FA, Furth EE, Wilson JM, Raper SE. 1999. Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. Hum. Gene Ther. 10: 2515-2526

49. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. 1997. DNA vaccines. Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648

50. Wild J, Gruner B, Metzger K, Kuhrober A, Pudollek HP, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. 1998. Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid. Vaccine. 16: 353-360

51. Martin T, Parker SE, Hedstrom R, Le T, Hoffman SL, Norman J, Hobart P, Lew D. 1999. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum. Gene Ther. 10: 759-768

52. Krieg AM. 1999. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. J. Gene Med. 1: 56-63

53. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, Endres S, Link BK, Krieg AM, Weiner GJ. 2001. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. J. Leukoc. Biol. 69: 81-88

54. Schirmbeck R, Reimann J. 2001. Modulation of gene-gun-mediated Th2 immunity to hepatitis B surface antigen by bacterial CpG motifs or IL-12. Intervirology. 44: 115-123

55. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. Eur. J. Immunol. 31: 2154-2163

56. Sedegah M, Weiss W, Sacci JB Jr, Charoenvit Y, Hedstrom R, Gowda K, Maja VF, Tine J, Kumar S, Hobart P, Hoffman SL. 2000. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. J. Immunol. 164: 5905-5912

57. Chen CH, Wang TL, Hung CF, Yang Y, Young RA, Pardoll DM, Wu TC. 2000. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. Cancer Res. 60: 1035-1042

58. Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T. 1987. Cloning of a partial cDNA encoding differentiation and tumor -associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6060-6064

59. Gendler SJ , Lancaster CA, Taylor- Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. 1990. Molcular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. J. Biol. Chem. 265: 15286-15293

60. Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. 1990. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. J. Biol. Chem. 265: 15294-15299

61. Hakomori S. 1989. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. Adv. Canc. Res. 52: 257-331

62. Chen C, Fenderson BA, Andrews PW, Hakomori S. 1989. Glycolipid glycosyltransferases in human embryonal carcinoma cells during retinoic acid induced differentiation. Biochemistry. 28: 2229-2238

63. Itzkowitz S, Kjeldsen T, Friera A, Hakomori SI, Yang US , Kim YS. 1991. Expression of Tn sialosyl, Tn and T antigens in human pancreas. Gastroenterology. 100: 1691-1700

64. Finn OJ. 1992. Pancreatic tumor antigen: diagnostic markers and targets for immunotherapy (Review). Import. Advanc. Oncology. 61-77

65. Rughetti A, Turchi V, Ghetti CA, Scambia G, Panici PB, Ronucci G, Mancuso S, Frati L, Nuti M. 1993. Human B-cell immune response to the polymorphic epithelial mucin. Cancer Res. 53: 2457-2459

66. Xing P.X, Reynolds K, Tjandra JJ, Tang XL, McKenzie IF . 1990. Synthetic peptides reactive with anti-human milk fat globule membrane monoclonal antibodies. Cancer Res. 50 : 89-96

67. Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. 1996. MUC-1 epithelial tumor-mucin-based immunity and cancer vaccines. Immunol. Rev. 145: 61-89

68. Ioannides CG, Fisk B, Jerome KR, Irimura T, Wharton JT, Finn OJ. 1993. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. J. Immunol. 151: 3693-3703

69. Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. 1994. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. J. Immunol. 153: 2102-2109

70. Barnd DL., Kerr LA, Metzgar RS, Finn OJ. 1988. Tumor-specific cytotoxic T cell lines generated from tumor draining lymph node infiltrate. Transpl. Proc. 20: 339-341

71. Jerome K, Barnd DL, Bendt KM, Boyer CM, Taylor-Papadimitriou J, McKenzie IFC, Bast RC, Finn OJ. 1991. Cytotoxic T- lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. Cancer Res. 51: 2908-2916

72. Burchell J, Gendler S, Taylor- Papadimitriou J, Girling A , Lewis A, Millis R, Lamport D. 1987. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. Cancer Res. 47 : 5476-5482

73. Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J. 1989. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. Int. J. Canc. 43: 1072-1076

74. Burchell J, Durbin H, Taylor-Papadimitriou J. 1983. Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. J. Immunol. 131: 508-513

75. Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. 1994. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. Cancer Res. 54: 2856-2860

76. Ding L, Lalani EN, Reddish M, Koganty R, Wong T, Samuel J, Yacyshyn MB, Meikle A, Fung PYS, Taylor-Papadimitriou J, Longenecker MB. 1993. Immunogenicity of synthetic peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC 1 mucin gene: effect of immunization on the growth of murine mammary adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. Cancer Immunol. Immunother. 36 : 9-17

77. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. 1989. Specific, MHC- unrestricted recognitation of tumor associated mucins by human cytotoxic T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 7159-7163

78. Finn O. J. 1992. Antigen -specific , MHC- unrestricted T cells. (Review). Biotherapy. 4 : 239-249

79. Magarian-Blander J, Ciborowski P, Hsia S, Watkins SC, Finn OJ. 1998. Intercellular and intracellular events following the MHC-unrestricted TCR recognition of a tumor-specific peptide epitope on the epithelial antigen MUC1. J. Immunol. 160: 3111-3120

80. Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. 1997. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. J. Immunol. 159: 5211-5218

81. Pietersz GA, Li W, Osinski C, Apostolopoulos V, McKenzie IF. 2000. Definition of MHC-restricted CTL epitopes from non-variable number of tandem repeat sequence of MUC1. Vaccine. 18: 2059-2071

82. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. 1999. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. Blood. 93 : 4309-4317

83. McKolanis JR, Finn OJ. 2000. Analysis of the frequency of MHC-unrestricted MUC1-specific cytotoxic T-cells in peripheral blood by limiting dilution assay.
Methods Mol Biol. 125: 463-470

84. Kuan SF, Byrd JC, Basbaum C, Kim S. 1989. Inhibition of mucin glycosylation by Aryl-N-acetyl-a-galactosaminides in human colon cancer cells. J. Biol. Chem. 264 :

19271-19277

85. Ben-Mahrez K, Sorokine I, Thierry D, Kawasumi T, Ishii S, Salmon R, Kohiyama M. 1990. Circulating antibodies against c-myc oncogene product in sera of colorectal cancer patients. Int. J. Cancer. 15: 35-38

86. Pupa SM, Menard S, Andreola S, Colnaghi MI. 1993. Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. Cancer Res. 53: 5864-5866

87. Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB, et al. 1994. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. Cancer Res. 54: 16-20

88. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. 1992. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. Cancer Res. 52: 4168-4174

Publikationen

1. Pecher G. and O. J. Finn. 1996. Induction of cellular immunity in chimpanzees to tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected EBV-immortalized autologous B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1699-1704

2. Kotera Y., J. D. Fontenot, G.Pecher, R. S. Metzgar, and O. J. Finn. 1994. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res.* 54: 2856-2860

3. Jerome K. R., A. D. Kirk, G. Pecher, W. W. Ferguson, and O. J. Finn. 1997. A survivor of breast cancer with immunity to MUC-1 mucin, and lactational mastitis. *Cancer Immunol. Immunother*. 43: 355-360

4. Kilger E.*, G. Pecher*, A. Schwenk and W. Hammerschmidt. 1999. Expression of Mucin (MUC-1) from a Mini-Epstein-Barr Virus in immortalized B-cells to generate tumor antigen specific cytotoxic T cells. *J. Gene Med.* 1: 84-92 ***** joined first authorship

5. Pecher G., Harnack U., Günther M., Hummel M., Fichtner I., and J. A. Schenk. 2001. Generation of an immortalized human CD4+ T cell clone inhibiting tumor growth in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 283:738-742

6. H. Johnen, H. Kulbe and G. Pecher. 2001. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1) *Cancer Immunol. Immunother*. 50: 356-360

7. Pecher G., Spahn G., Schirrmann T., Kulbe H., Ziegner M., Schenk J.A., and V. Sandig. 2001. Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res.* 21: 2591-2596

8. Pecher G., Schirrmann T., L. Kaiser L. and J.A. Schenk. 2001. Efficient cryopreservation of dendritic cells transfected with cDNA of a tumour antigen for clinical application. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34:161-166

9. Pecher G., A. Häring, L. Kaiser and E. Thiel. 2002. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I / II clinical trial, *Cancer Immunol Immunother*, in press, published online 19. 10. 2002

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
APC	antigen presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CTL	cytotoxic T cells (zytotoxische T-Zellen)
DC	dendritic cells (dendritische Zellen)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GCP	Good Clinical Practice
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-kolonienstimulierender Faktor
GMP	Good Manufacturing Practice
HIV	Human Immunodeficiency Virus
His	Histidin
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HSP	Hitzeschock-Protein
IL	Interleukin
LDA	Limiting Dilution Assay
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere Blut-mononukleäre Zellen)
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Val	Valin

Danksagung

Mein Dank gilt der Forschungskommission der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin und ihrem Vorsitzenden Herrn Prodekan Prof. Dr. C. Frömmel für die Unterstützung und Absicherung dieser Arbeit, die durch das mir verliehene Habilitationsstipendium "Rahel Hirsch" ermöglicht wurde.

Ich danke den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe Thomas Schirrmann, Dr. rer. nat. Heiko Johnen, Arnt Häring, Hagen Kulbe, Mike Ziegner, Dr. med. Günther Spahn, Arvid Schwenk, Ulf Harnack und David Dorn für ihre langjährige Unterstützung und ihren Zusammenhalt.
Für ihren Rat und ihre Diskussionsbereitschaft danke ich Jörg Schenk und Dr. rer. nat. Volker Sandig.

Meiner Mentorin an der University of Pittsburgh, USA, Olivera J. Finn und meinen dortigen Laborkollegen danke ich für die Möglickeit, molekularbiologische und tumorimmunologische Methoden zu erlernen. Olivera J. Finn hat meine Vorhaben mitinitiiert, gefördert und mit fachlicher Kompetenz begleitet. Mein Aufenthalt am Department of Molecular Genetics and Biochemistry der University of Pittsburgh wurde durch ein Forschungsstipendium der Mildred-Scheel-Stiftung ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. K. Possinger, Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Onkologie und Hämatologie, Charité Campus Mitte, danke ich für die freundliche Aufnahme in die Klinik und die großzügige Gewährung von Freiräumen zur Ermöglichung und Fortsetzung meiner wissenschaftlichen Arbeiten.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 29. 10. 2002 Dr. Gabriele Pecher