



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Active specific immunotherapy of malignant melanoma with  
cytokine gene-transduced tumor cell vaccines**

Autor: Yuansheng Sun  
Einrichtung: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Doktorvater: Prof. Dr. D. Schadendorf

In the last decade, considerable interest has arisen in clinical research of vaccine therapies against melanoma, with several novel forms of melanoma vaccines having been developed. The present investigation is intended to gain initial insights into the feasibility, effectiveness and clinical toxicities of the cytokine gene-transduced tumor cell vaccines.

By using a newly-developed ballistic gene-transfer technology, we successfully introduced IL-7- or IL-12-gene into a panel of human melanoma cell lines. Subsequent magnetic cell-sorting procedure would enable the transduced tumor cells to be enriched that were capable of producing elevated amounts of transduced cytokines with confirmed bioactivity. These cell preparations allowed us to initiate/complete two phase I clinical trials aimed at induction of T-cell-mediated anti-tumor immunity by vaccination of metastatic melanoma patients.

In a pilot study with IL-12-secreting tumor vaccine, six patients with advanced metastatic melanoma were vaccinated s.c. at weekly intervals with a total number of  $2.7 \times 10^6$  to  $1.6 \times 10^7$  IL-12 gene-transduced, irradiated autologous tumor cells. All patients completed at least four vaccinations with no signs of systemic toxicities, except a mild fever and mild flu-like symptoms in some patients. Although no major clinical response was achieved in any patient, three patients showed disease stabilization and one a mixed response with regression of some cutaneous metastases over three months. An extensive immunological evaluation after the fourth immunization revealed that 2 of 6 patients developed specific DTH reactivity towards autologous, non-modified tumor cells. In one of them and in another patient, an increase in precursor frequencies of anti-melanoma-directed, proliferative as well as cytolytic CTLs was observed in peripheral blood. In this patient, massive accumulation and a partial infiltrate of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were demonstrated by immunohistochemistry in a regressing metastasis, post- but not pre-vaccination. Based on these observations, we conclude that vaccinations with IL-12 gene-transduced tumor cells are well-tolerated and of large safety, and can induce immunological changes even in a subset of advanced, terminally ill melanoma patients.

In an attempt to address the issue as to whether *in vitro* analysis of PBL-derived CTLs accurately reflects the *in vivo* immune status, we studied *in vivo* accumulation of three anti-melanoma CTL clones isolated from peripheral blood of a melanoma patient given IL-7-secreting autologous tumor cell vaccine. Using RT-PCR and Southern blot hybridization techniques, we identified clonal expansion of one CTL clone (termed E5) within one of seven metastatic lesions taken at autopsy, suggesting that selection of these anti-melanoma CTL occurred *in vivo*. This study supports the proposition that analyzing PBL during immunization is meaningful and may truly reflect an *in vivo* antitumor immune response.

In conclusion, strategies involving cytokine gene-transduced tumor vaccines are of large safety, and can influence the immunological tumor-host relationship. However, in most cases, the response seems not to be strong enough to completely eradicate the tumor in highly-pretreated/far-advanced patients. Since the fact that most melanoma patients enrolled in the phase I clinical trials are present in an active immunosuppressive state (as reflected by negative DTH reactivity, etc.), it has been predicted that such a gene therapeutic approach may have its more significant impact on survival when used in an adjuvant setting, when tumor burden is small. Thus, thoughtful selection of patient

populations and rigorous yet innovative clinical trial designs will be key to the accelerated identification of cytokine gene-transduced vaccines that improve survival in melanoma patients.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche neue Vakzinierungsverfahren zur Behandlung des malignen Melanoms entwickelt und getestet, wie z.B. die Applikation von Tumorzellen, die nach genetischer Manipulation immunstimulierende Cytokine exprimieren und sezernieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte wie Durchführbarkeit, Effektivität und klinische Nebenwirkungen solcher gentherapeutischer Ansätze untersucht.

Unter Anwendung der neu entwickelten Technologie des ballistischen Gen-Transfers, wurden IL-7- oder IL-12-Gene in eine Reihe menschlicher Melanomzelllinien transfiziert. Die transfizierten Tumorzellen waren in der Lage, erhöhte Mengen der betreffenden Cytokine in biologisch aktiver Form zu produzieren. Basierend auf diesen Vorarbeiten konnten zwei klinische Phase I Studien initiiert und abgeschlossen werden, die das Ziel verfolgten, durch Vakzinierung die Induktion einer T-Zell-vermittelten Anti-Tumor Immunität in Melanompatienten zu erzeugen.

Im Rahmen einer Pilotstudie unter Einsatz einer IL-12-sekretierenden Tumorzelle, wurden 6 Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierendem Melanom in wöchentlichen Intervallen mit  $2.7 \times 10^6$  bis  $1.6 \times 10^7$  transfizierten und bestrahlten autologen Tumorzellen s.c. geimpft. Alle Patienten erhielten mindestens 4 Vakzinierungen. Es gab keine Anzeichen von systemischer Toxizität, nur in einigen Fällen waren ein schwaches Fieber und schwache Grippe-ähnliche Symptome zu beobachten. Obwohl in keinem der Patienten ein bedeutendes klinisches Ansprechen erzielt werden konnte, stellte sich in drei Patienten eine Stabilisierung der Krankheit ein und ein Patient wies Regressionen einiger Hautmetastasen innerhalb von drei Monaten auf. Extensive immunologische Untersuchungen ergaben, daß zwei der sechs Patienten eine spezifische DTH Reaktion gegenüber autologen, nicht modifizierten Tumorzellen entwickelten. Für einen der zwei sowie für einen weiteren Patienten konnte ein Anstieg in der Frequenz von Anti-Melanom-gerichteten, proliferativen sowie cytotoxischen CTLs im peripheren Blut beobachtet werden. Bei diesem Patienten konnte ein massiver Anstieg und eine teilweise Infiltration von  $CD8^+$  T-Lymphozyten in einer zurückgehenden Metastase nach der Impfung nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen ist zu sagen, daß Impfungen mit IL-12-Gen-transfizierten Tumorzellen gut toleriert werden und von großer Sicherheit sind. Ebenso können sie immunologische Veränderungen, sogar bei fortgeschrittenen oder sich im Endstadium befindenden Melanompatienten auslösen.

Zur Klärung der Frage, ob die Analyse von PBL-abgeleiteten CTL's den in vivo Immunstatus richtig reflektiert, untersuchten wir die in vivo Akkumulation von drei anti-Melanom CTL Klonen, die aus dem peripheren Blut eines mit einer IL-7-sekretierenden autologen Tumorzell-Vakzine behandelten Melanompatienten isoliert wurden. Mittels RT-PCR und Southern Blot Hybridisierung konnte die Expansion eines CTL Klons in einer von sieben metastatische Lesionen nach Autopsy nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß eine in vivo Selektion dieser anti-Melanom cytotoxischen T Zellen erfolgte. Diese Studie unterstützt die Annahme, daß die Analyse der PBLs während einer Immunisierung bedeutsam ist und daß von PBL-abstammende CTLs wirklich eine in vivo anti-Tumor Immunantwort reflektieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Vakzinierungsstrategien, die auf Cytokingen-transfizierten Tumorzellen basieren, sicher sind und die immunologische Tumor-Wirt Beziehung beeinflussen können. Jedoch scheint in den meisten Fällen die therapeutische Antwort nicht ausreichend, um die Eliminierung von Tumoren in vortherapierten Patienten mit weit-fortgeschrittenem Krankheitsstadium zu erreichen. Da sich die meisten, an solchen klinische Phase I Studien teilnehmenden Melanompatienten in einem aktiv immunsuprimierten Stadium befinden, ist anzunehmen, daß Cytokingen-transfizierte Tumorzell-Vakzine eine verbesserte Wirkung auf das Überleben haben können, wenn sie in einem adjuvanten Stadium (geringe Tumormasse) verabreicht werden. Eine entsprechende Selektion von Patienten in Kombination mit einem innovativen Design klinischer Studien werden möglicherweise die Identifikation wirksamer Cytokingen-transfizierter Tumorzellen beschleunigen, die das Überleben der Melanompatienten entscheidend verbessern.