

Interleukin¹ 12: Adjuvans in der Tumor-Therapie?

Biologische Aktivität und Gedanken zur Toxizität von Interleukin 12

Bernhard Ryffel, Schwerzenbach

Zusammenfassung

Interleukin 12 (IL-12) wird von Makrophagen und B-Lymphozyten als Antwort auf Bakterien, Bakterienprodukte und intrazelluläre Parasiten im Körper freigesetzt und verbindet die natürliche Resistenz mit der erworbenen Immunantwort. IL-12 stimuliert das Immunsystem, insbesondere natürliche Killerzellen und zytotoxische Lymphozyten, welche eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen Infekte und Tumorzellen haben. Die wesentlichen biologischen Eigenschaften von IL-12 *in vivo* – und speziell Ergebnisse aus der experimentellen Krebstherapie – sind kurz dargestellt. Die Pläne für die klinische Anwendung werden zusammen mit dem zu erwartenden Nebenwirkungsspektrum von IL-12 diskutiert.

Interleukin 12: Adjuvant in tumor therapy?

Interleukin 12 (IL-12) is produced in the body by macrophages and B-lymphocytes in response to bacterial infections and intracellular parasites and establishes a link between natural defense mechanisms and acquired immunity. IL-12 stimulates the immune system, especially natural killer cells and cytotoxic T-lymphocytes, which play an important role against infections and tumor cell growth. The biological properties of IL-12 are briefly reviewed and the encouraging results from experimental cancer studies are presented. The potential application of IL-12 for cancer therapy in patients is discussed along with the expected adverse effects of such a therapy.

1 EINLEITUNG

Seit dem 18. Jahrhundert gibt es sporadische Berichte, dass im Laufe von schweren bakteriellen Infektionen spontane Remissionen von Tumoren auftreten können. Auf Grund dieser Beobachtungen hat Dr. William B. Coley 1891 eine lokale Therapie von Weichteilsarkomen mit einer bakteriellen Präparation, dem sogenannten Coley-Toxin, das Gram-positive und Gram-negative Bakterien enthielt, begonnen (TRINCHIERI & SCOTT, 1994). Der so erhaltene günstige Effekt auf das Tumorwachstum wurde als eine unspezifische Aktivierung von Makrophagen und andern Phagozyten interpretiert, die wahrscheinlich zur Freisetzung von hemmenden oder zytotoxischen Zytokinen wie z. B. Interferonen und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) führen (VASALLI, 1992). Diese Hypothese wurde in den letzten Jahren durch die systemische und insbesondere intratumorale Gabe von Zytokinen

bestätigt, ein Gebiet, das derzeit von verschiedenen Gruppen intensiv untersucht wird (BEUTLER, 1992).

Interleukin 12 (IL-12) wurde erstmals 1989 beschrieben und erhielt vorerst den Namen NKSF (Natural Killer-Cell Stimulatory Factor) sowie CLMF (Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor), aufgrund seines Effektes auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Lymphozyten (BRUNDA, 1994). In den letzten fünf Jahren hat man die zentrale Rolle von IL-12 im Immunsystem speziell für die Vermehrung und Aktivierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen (beides wichtige Effektorzellen gegen Infekte und Tumorzellen) erkannt. Daneben führt IL-12 auch zur Freisetzung von verschiedenen andern Zytokinen insbesondere von Interferon- γ (IFN γ), das für die Aktivierung von Makrophagen wichtig ist (GATELY et al., 1993). Aufgrund des Spektrums der Zytokine, die im Rahmen einer Immunantwort produziert werden, unterscheidet man einerseits eine zellver-

¹ Die Interleukine gehören zu den sog. Lymphokinen oder Zytokinen, d. h. Substanzen, die von Lymphozyten nach spez. oder unspez. Aktivierung gebildet werden und die als Übermittler, durch Wirkung auf verschiedene Zellsysteme oder humoral (Bildung von Antikörpern, die in Blut und Lymphe verteilt werden) zur Abwehr eines Organismus gegen Antigene beitragen.

mittelte Antwort, eine T-Helfer 1-Reaktion (TH1-Reaktion), oder eine humorale Immunantwort, eine TH2-Reaktion (Abb. 1). Während die Interleukine 4, 5, 10 und 13 eine TH2-Immunantwort induzieren, sind IL-2 und IL-12, zusammen mit IFN γ und Lymphotoxin- α (LT α) verantwortlich für die zellvermittelte TH1-Antwort (SCOTT, 1993).

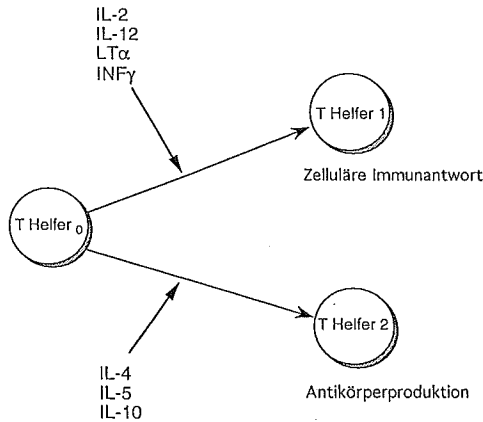


Abb. 1. Schematische Unterscheidung zwischen T-Helfer 1- und T-Helfer 2-Immunantwort auf verschiedene Interleukine (IL), Lymphotoxin (LT α) und Interferon- γ (IFN γ).

Fig. 1. Scheme of the immune responses (T 1 or T 2) to different interleukins (IL), lymphotoxin (LT α), and interferone- γ (IFN γ).

IL-12 wird im Körper durch die phagozytischen Zellen, d. h. im wesentlichen Makrophagen und B-Lymphozyten, als Antwort auf bakterielle Infekte und Toxine sowie intrazelluläre Parasiten produziert (Abb. 2).

IL-12 ist ein heterodimeres Eiweiss, bestehend aus einer leichten (p35) Kette, die Homologie mit andern Zytokinen zeigt, sowie einer schweren Kette (p40), die Verwandtschaft

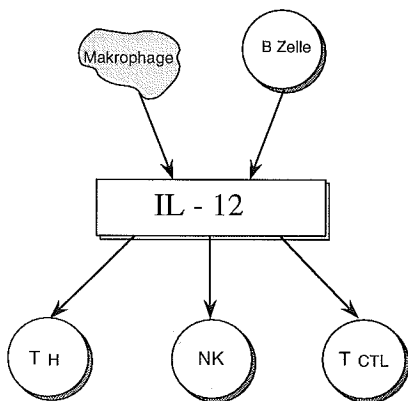


Abb. 2. Zellulärer Ursprung von endogenem IL-12 und biologische Aktivität (vgl. Tab. 1).

Fig. 2. Cellular origin of endogenic IL-12 and its biological activity (see Tab. 1).

mit extrazellulären Anteilen von Zytokinrezeptoren aufweist (Tab. 1). Die Strukturähnlichkeiten von IL-12 lassen daher vermuten, dass dieses Molekül entwicklungsgeschichtlich aus einem Zytokin und einem Zytokin-Rezeptoranteil entstanden ist. Die leichte und die schwere Kette sind über eine Disulfid-Brücke kovalent verbunden, und nur das Heterodimer zeigt biologische Aktivität. Die schwere Kette wird im Überschuss produziert; die Bedeutung eines möglichen Homodimers als Antagonist der Funktion des biologisch-aktiven IL-12 ist nicht geklärt.

IL-12 vermittelt seinen biologischen Effekt über Rezeptorbindung an der Oberfläche von T-Zellen und NK-Zellen. Ein Typ 1 transmembranäres Rezeptorprotein niedriger Affinität (Kd im Bereich von 2–5 nM) wurde kürzlich kloniert. Der IL-12-Rezeptor gehört zur Familie der hämatopoietischen (blutbildenden) Rezeptoren. Aufgrund der niedrigen Affinität muss angenommen werden, dass noch weitere Proteine am IL-12-Rezeptor teilnehmen.

Tab. 1. Struktur und Aktivität von Interleukin 12

Tab. 1. Structure and activity of IL-12

Heterodimeres Protein:	Zwei Ketten, p35 und p40
Herkunft:	Makrophagen, cvtl. B-Lymphozyten
Rezeptoren:	NK-Zellen & zytotoxische T-Lymphozyten
Aktivität:	Proliferation & Aktivierung von NK- und T-Zellen, Synthese von Interferon- γ
Effekte <i>in vivo</i> :	Aktivierung von Makrophagen, Infektabwehr, Hemmung des Tumorwachstums

2 INTERLEUKIN 12 IN INFECTEN

Kürzliche Untersuchungen in verschiedenen Modellen von Infektionskrankheiten zeigten, dass IL-12 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer zellulären Immunantwort (TH1-Antwort) spielt. So konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Toxoplasma gondii*, beides intrazelluläre Pathogene in Makrophagen, die Produktion von IL-12 in Makrophagen stimuliert. IL-12 aktiviert NK- und T-Zellen mit der sekundären Freisetzung von IFN γ . Die Aktivierung von Makrophagen wird somit durch endogenes IFN γ unterhalten und weiter fortgesetzt, was zu einer effizienten Destruktion der pathogenen Organismen führt. In beiden Infektionsmodellen ergibt eine Behandlung mit IL-12

neutralisierenden Antikörpern eine deutlich verminderte Infektabwehr.

Die Möglichkeit, mit exogenem IL-12 auch das natürliche Immunsystem zu stimulieren, wurde an Mäusen mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) demonstriert: IL-12-Gaben erhöhten die Abwehrkraft in immundefizienten Mäusen gegen das Sporozoon *Toxoplasma gondii*. In der experimentellen Leishmaniasis (Infektion mit Flagellaten der Gattung *Leishmania*) konnte gezeigt werden, dass sensitive Mäusestämme wie *Balb/c*-Mäuse mit IL-12 gegen den Parasiten geschützt werden können.

Im Gegensatz zu diesen günstigen Effekten hatte IL-12 nachteilige Effekte auf die experimentelle Infektion mit dem Wurm *Nippostrongylus brasiliensis*. IL-12-Behandlung begünstigt die Entwicklung der Wurmeier.

Hingegen hemmt IL-12 auch die Entwicklung der durch eine experimentelle Schistosomiasis (Infektion mit Pärchenegel *Schistosoma*) bedingten Granulome. Im weiteren hat IL-12 auch einen günstigen Effekt auf die Granulom-Entwicklung bei mycobakteriellen Infektionen, was einen möglichen Einsatz zur adjuvanten Therapie der Tuberkulose bedeuten könnte. Eine weitere Anwendung von IL-12 als Hilfsstoff von Impfstoffen wurde kürzlich von AFONSO et al. (1994) vorgeschlagen.

IL-12 wurde ebenfalls in der experimentellen AIDS-Behandlung evaluiert. Im murinen AIDS-Modell (Mäuse-AIDS) erhöht IL-12 die Resistenz gegenüber opportunistischen Infekten (GAZZINELLI et al., 1994).

Insgesamt haben diese Arbeiten interessante Einblicke in die Immunologie der Infektabwehr gegeben und eröffnen möglicherweise neue therapeutische Möglichkeiten.

3 RESULTATE AUS DER EXPERIMENTELLEN TUMORFORSCHUNG

N. Brunda und Mitarbeiter zeigten *in vivo* in der Maus eine deutliche Hemmung des Wachstums von transplantierten Tumoren (BRUNDA et al., 1993; NASTALA et al., 1994). So konnte die Gruppe nachweisen, dass das Wachstum von Karzinomen, Sarkomen, Melanomen und Lymphomen dosisabhängig nach systemischer oder intratumoraler Gabe von IL-12 gehemmt werden kann. Der Effekt von IL-12 auf das lokale Tumorstadium von subkutan implantierten Melanom-Zellen wird noch beobachtet, wenn die Behandlung erst 2 Wochen nach Tumor-Implantation beginnt (Abb. 3).

IL-12 hat nicht nur einen eindrücklichen Effekt auf das Wachstum eines Primärtumors, sondern hemmt auch die Bildung und das Wachstum von Tumor-Metastasen. Experi-

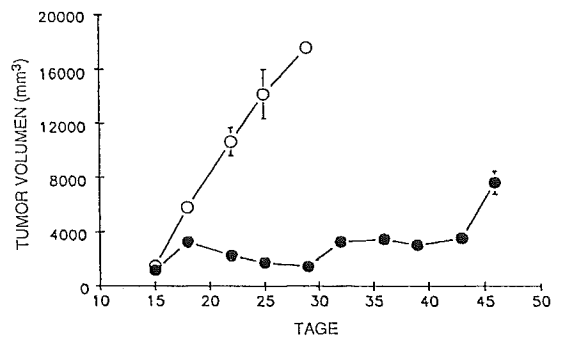


Abb. 3. Effekt von IL-12 auf das Wachstum von transplantierten Tumoren in der Maus (BRUNDA et al., 1993).

Fig. 3. Effect of IL-12 on the growth of transplanted murine tumors.

mentelle Metastasen in der Leber der Maus, die durch intravenöse Inokulation von Sarkom-Zellen gesetzt werden, können im Wachstum noch vier Wochen nach der Tumor-Inokulation gehemmt werden (Abb. 4).

Die Hemmung des Tumorstadiums ist wahrscheinlich kein direkter Effekt, da IL-12 keine Hemmung des Tumorstadiums *in vitro* bewirkt. IL-12 aktiviert zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, die die Effektorzellen für die Tumorstadium darstellen. Wahrscheinlich sind IL-12 induzierte Zytokine, insbesondere Interferon- γ , wichtig für den Aktivierungsprozess und demnach für die Tumorstadium. Diese Annahme wird unterstützt durch Befunde, dass neutralisierende Antikörper gegen Interferon- γ den Effekt von IL-12 auf das Tumorstadium vermindern (BRUNDA et al., 1993).

Im Vergleich zu anderen Zytokinen, wie z. B. IL-2 oder Interferon- α , ist IL-12 in niedrigeren Dosen biologisch aktiv. Deshalb hat IL-12 wahrscheinlich ein größeres therapeutisches Fenster.

Der Anti-Tumoreffekt von IL-12 ist in Abb. 5 schematisch dargestellt: Aktivierung von NK- und zytotoxischen T-Lym-

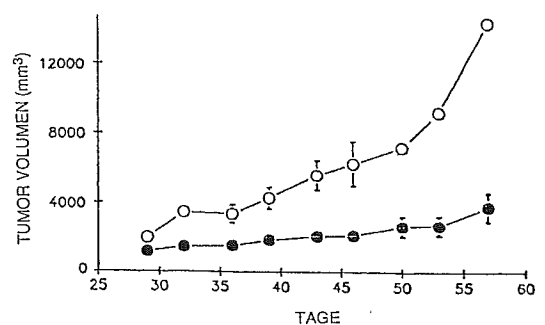


Abb. 4. Antimetastatischer Effekt von IL-12 in der Maus (BRUNDA et al., 1993).

Fig. 4. Anti-metastatic effect of IL-12 in mice (BRUNDA et al., 1993).

phozyten und Freisetzung von $IFN\gamma$. Dieses führt durch positive Rückkoppelung zur Verstärkung der Makrophagen-Aktivität mit vermehrter Freisetzung von TNF und IL-12.

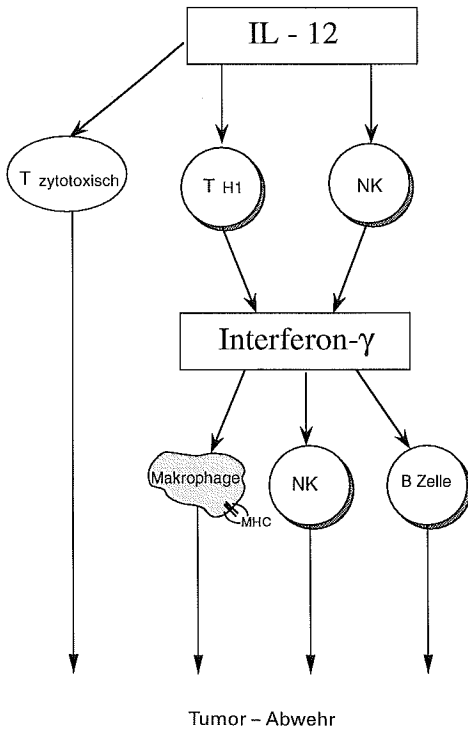


Abb. 5. Heutige Vorstellungen über die Wirkungsweise von IL-12 auf das Tumorstadium.

Fig. 5. Actual concept of the IL-12 action on tumor growth.

4 NEBENWIRKUNGEN VON IL-12

In pharmakologisch-aktiven Dosen hat IL-12 keine wesentliche Toxizität (Tab. 2). In Nagetieren und in Primaten kann bei höheren Dosen eine Abnahme der Zahl der weissen Blutkörperchen, eine Anämie, eine Leber- und besonders eine Milzvergrößerung auftreten (BRUNDA, 1994). Die erwähnten Organ-Vergrößerungen werden durch Infiltration mit NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen bedingt, die im Fall der Leber einen leichten Anstieg der Leberenzyme und vereinzelt Zelltod bewirken. In sehr hohen Dosen wird auch eine Tendenz zur Entwicklung von Lungenödem beobachtet, eine von der IL-2-Behandlung bekannte, die Dosis limitierende Nebenwirkung einer derartigen Therapie. Die Hemmung der Blutbildung in hohen Dosen war etwas überraschend, da IL-12 *in vitro* eine Stimulation der Hämatopoese induziert. Aufgrund eigener Untersuchungen an Mäusen mit einem Defekt des $IFN\gamma$ -Systems

Tab. 2. Experimentelle Toxizität von IL-12 (nach BRUNDA, 1994)
Tab. 2. Experimental toxicity of IL-12 (after BRUNDA, 1994)

Leber:	Infiltration von aktivierten NK- und T-Zellen sowie Makrophagen. Einzelzellnekrosen in hohen Dosen möglich, leichter Anstieg der Leberenzyme
Milz:	Splenomegalie ^a mit Infiltration von aktivierten NK- und T-Zellen sowie Makrophagen, extramedulläre ^b Blutbildung
Blutbildung:	Hemmung der Blutbildung im Knochenmark, Anämie und Leukopenie ^c
Lunge:	Mononukleäre Infiltrate, evtl. Lungenödem

^aMilzvergrößerung, ^bausserhalb des Knochenmarks in Leber, Milz u. a., ^cabnorm verringerte Zahl der weissen Blutkörperchen.

konnten wir zeigen (Abb. 6), dass die Hemmung der Blutbildung *in vivo* durch IL-12 bedingt ist, das die Freisetzung von $IFN\gamma$ bewirkt (ENG et al., 1995). Obwohl $IFN\gamma$ am günstigen Effekt von IL-12 beteiligt ist, muss bei der klinischen Anwendung auf die Induktion von $IFN\gamma$ geachtet werden, da hohe $IFN\gamma$ -Konzentrationen (auch endogenen Ursprungs) toxisch sind.

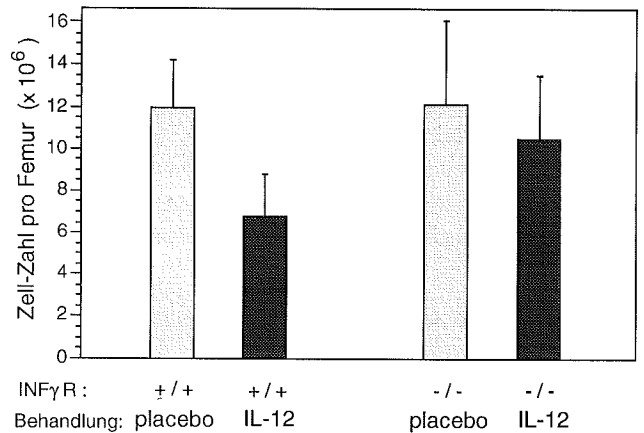


Abb. 6. Abhängigkeit der Blutbildungshemmung in der Maus von Interferon- γ . Effekt von 1 μ g IL-12 (4 x i.p.) auf die Zellzahl des Knochenmarks im Wildtyp und in interferon- γ -R-defizienten Mäusen (ENG et al., 1995).

Fig. 6. Dependence of inhibition of hematopoiesis in mice on interferone- γ . Effect of 1 μ g IL-12 (4 x i.p.) on cell number of bone marrow in wild type and in interferone- γ -R deficient mice (ENG et al., 1995).

5 ERWARTUNGEN, AUSBLICK

Aufgrund seines Wirkungsspektrums, insbesondere die Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxischen

T-Zellen sowie Freisetzung von IFN γ stellt IL-12 ein interessantes, neues therapeutisches Prinzip in der Tumorbehandlung dar. Wahrscheinlich ist es sinnvoll, IL-12 mit andern adjuvanten Therapien nach einer chirurgischen Tumorreduktion zur Verminderung des lokalen Wachstums und der Metastasierung einzusetzen.

Im Vergleich zu IL-2 wird IL-12 aufgrund der heute vorhandenen toxikologischen Befunde besser vertragen. Die möglichen Nebenwirkungen in hohen Dosen umfassen eine Hemmung der Blutbildung, Anstieg von Leberenzymen sowie selten Lungenödem.

Die ersten klinischen Studien sind geplant. Es ist zu hoffen, dass der therapeutische Effekt auch bei menschlichen Tumoren eintritt und dass die Behandlung gut vertragen wird.

Alternativ zu einer systemischen Behandlung mit IL-12 kommt auch eine lokale intratumorale Therapie in Frage. Eine weitere therapeutische Modalität ist die Gentherapie, d. h. Transfektion von IL-12 in die Tumorzellen, um dadurch eine optimale und lang dauernde Freisetzung von IL-12 *in situ* im Tumorgewebe zu erreichen.

6 LITERATUR

- AFONSO, L.C.C., SCHARTON, T.M., VIEIRA, L.Q., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G. & SCOTT, PH. 1994. The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. – *Science*, 263, 235–237.
- BEUTLER, B. 1992. Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine. – Raven Press, New York, 574 pp.
- BRUNDA, M.J. 1994. Interleukin-12. Review. – *J. Leukocyte Biol.* 55, 280–296.
- BRUNDA, M.J.L., LUISTRO, R.R., WARRIER, B.R., WRIGHT, B.R., HUBBARD, B.R., MURPHY, M., WOLF, ST.F. & GATELY, M.K. 1993. Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin 12 against murine tumors. – *J. Exp. Med.*, 178, 1223–1230.
- ENG, V.M., CAR, B., LUGLI, V., LORENZ, M., RYFFEL, B. & QUESNIAUX, V.J.F. The stimulatory effect of IL-12 on hematopoiesis are inhibited by IL-12 and IFN γ *in vivo*. – *J. Exp. Med.* (im Druck).
- GATELY, M.K., WARRIER, R.R., HONASOGE, S., CARVAJAL, D.M., FAHERTY, D.A., CONNAUGHTON, S.E., ANDERSON, T.D., SARMIENTO, U., HUBBARD, B.R. & MURPHY, M. 1993. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN- γ *in vivo*. – *Int. Immunol.* 6, 157–167.
- GAZZINELLI, R.T., GIESE, N.A. & MORSE, H.C. 1994. In vivo treatment with Interleukin-12 protects mice from immune abnormalities observed during murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS). – *J. Exp. Med.* 180, 2199–2208.
- NASTALA, Ch.T., EDINGTON, H.D., MCKINNEY, T.G., TAHARA, H., NALESNIK, M.A., BRUNDA, M.J., GATELY, M.K., WOLF, ST.F., SCHREIBER, R.D., STORKUS, W.J. & LOTZE, M.T. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. – *J. Immunol.* 153, 1697–1706.
- SCOTT, PH. 1993. IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity. – *Science*, 260, 196–197.
- TRINCHIERI, G. & SCOTT, PH. 1994. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. – *Immunology Today*, 15 (10), 460–463.
- VASSALLI, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factor. – *Annu. Rev. Immunol.* 10, 411–452.

Prof. Dr. med. Bernhard Ryffel, Toxikologisches Institut der ETH und der Universität Zürich, Schorenstrasse 19, CH-8603 Schwerzenbach.