

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung dendritischer Zellen

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden durch Ficolgradientenzentrifugation gereinigt und durch Adhäsion an eine Plastikoberfläche von anderen Zelltypen getrennt. Die adhärenen Zellen lösen sich nach Zugabe von GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) von der Unterlage ab und wurden weiter in Suspension kultiviert. Nach einem Tag konnten die, für mononukleäre typischen, Zellaggregate lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 3).

Durch durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenantigene nach einem Tag in Kultur konnte eine deutliche Expression der HLA-Moleküle (HLA-Klasse-I, HLA-DR) sowie von CD11b nachgewiesen werden. Inkubation der Zellen mit TNF- α (10 ng/ml, 24 h) unterdrückt insbesondere Expression von CD11b, HLA-DQ und HLA-DR, wohingegen die Expression anderer Adhäsionsmoleküle sowie die Expression von CD1a nur wenig beeinflusst wird (Abb. 4).

Nach 7 Tagen in Kultur, unter Zugabe von GM-CSF und IL-4, wurden morphologische Änderungen der Zellen beobachtet. Die nach einem Tag in Kultur dominierenden Zellaggregate waren verschwunden. Es konnten klar abgegrenzte einzelne Zellen beobachtet werden, die zum Teil dendritische Ausläufer gebildet hatten.

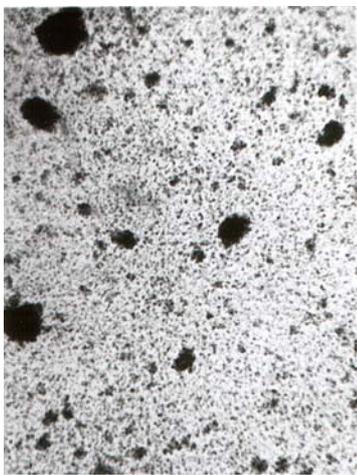


Abb. 3 Mononukleäre Zellen nach einem Tag in Kultur. Die für diese Zellen typische Aggregatbildung ist klar zu erkennen

(Abb. 5). Die Expression der HLA-Moleküle war gegenüber dem ersten Tag stark erhöht und konnte durch eine 24-stündige Inkubation mit TNF- α noch gesteigert werden (Abb. 6). Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle, CD58, CD11b, CD11c, sowie CD1a, stieg deutlich an, während die Expression von CD54 durch TNF- α induziert werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnten die monozytären Marker CD14, CD16 und CD34 praktisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 6). Die co-stimulatorischen Marker CD40, CD80 und CD86 wurden nach sieben Tagen in Kultur bestimmt. Sie waren alle bei den untersuchten Zellen nachweisbar, wobei sich ihre Expression durch TNF- α weiter steigern ließ (Abb. 7).

Andere myelotische und lymphatische Oberflächenmarker wurden ebenfalls untersucht (Abb. 8). Typische T-Zellmarker, wie CD3, CD4 und CD8 konnten nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Auch Mar-

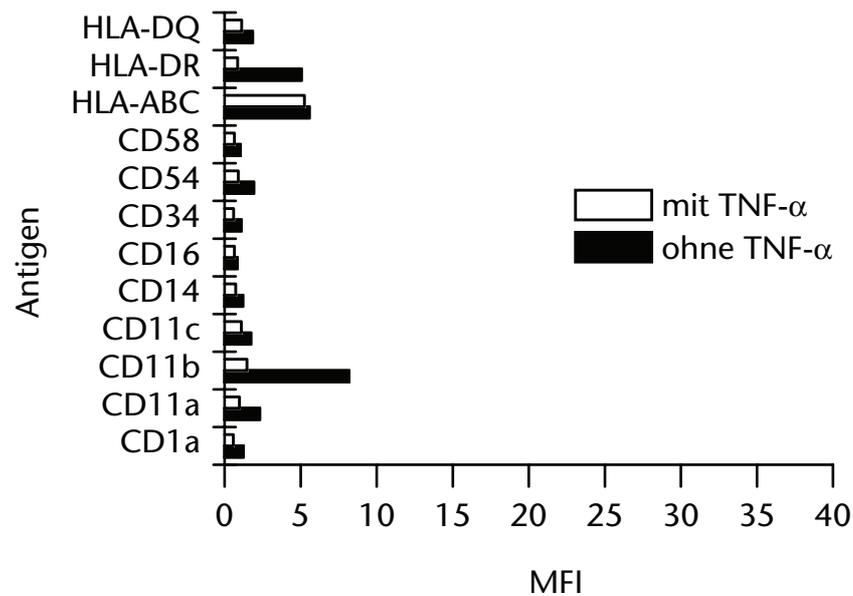


Abb. 4 Durchflußzytometrische Analyse, mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Oberflächenmarker der mononukleären Zellen nach einem Tag in Kultur. Durch Zugabe von TNF- α (10 ng / ml, 24 h) verringert sich insbesondere die Expression von HLA-DQ, HLA-DR und CD11b deutlich

ker für B-Lymphozyten (CD20, CD26), NK Zellen (CD56, CD69) sowie für Makrophagen (CD15, CD26) wurden nicht exprimiert. Lediglich der auf allen Leukozyten nachweisbare Marker CD45 konnte in nennenswerter Menge nachgewiesen werden. Eine Expression der Fc γ Rezeptoren I und II (CD64, CD32), des Fc ϵ RII Rezeptors (CD23, 29C6) konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

Nach 14 Tagen in Kultur, mit GM-CSF und IL-4, konnten Zellen mit unregelmäßig geformter Oberfläche beobachtet werden. (Abb. 10). Die Expression der MHC-Moleküle sowie von CD54, CD11b und CD11c ging nach 14 Tagen in Kultur zurück (Abb. 11).

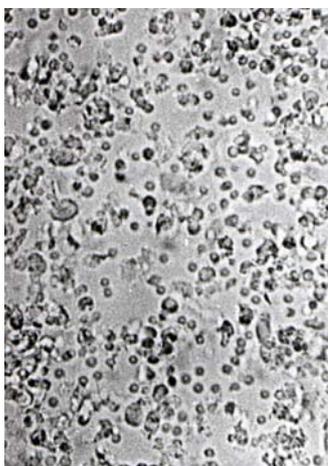


Abb. 5 Nach sieben Tagen in Kultur sind die Zellaggregate verschwunden. Es sind klar abgegrenzte einzelne Zellen sichtbar, die zum Teil dendritische Ausläufer gebildet haben

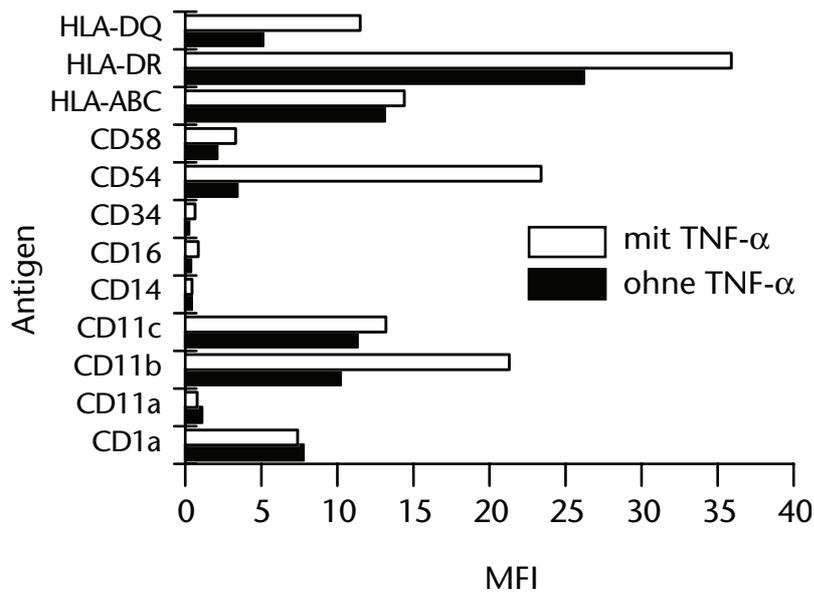


Abb. 6 Durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenmarker der mononukleären Zellen nach sieben Tagen in Kultur. Die Expression der MHC-Antigene ist gegenüber dem ersten Tag generell deutlich erhöht. Das Gleiche gilt für CD1a, CD11b und CD11c. Die Expression all dieser Antigene, sowie die von CD54, läßt sich durch Zugabe von TNF- α noch drastisch steigern. CD14, CD16 und CD34 sind praktisch nicht nachzuweisen

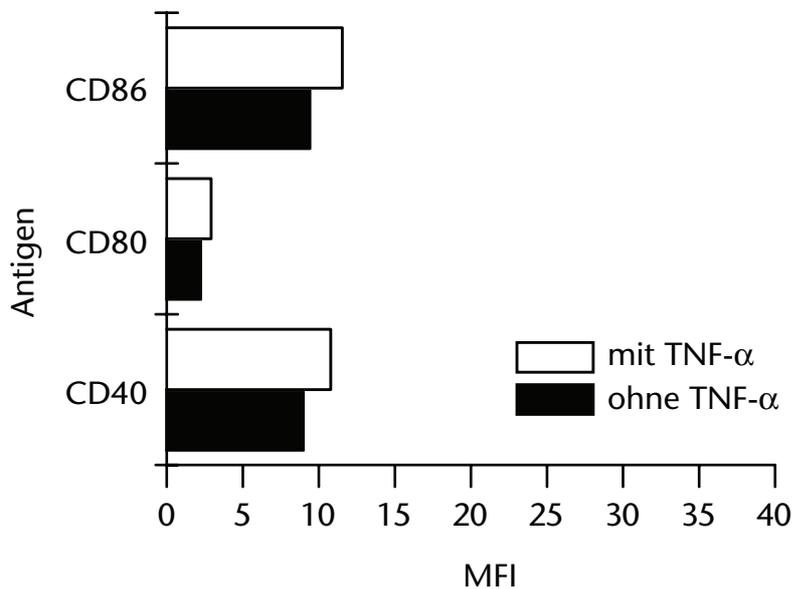


Abb. 7 Durchflußzytometrische Analyse co-stimulatorischer Marker nach sieben Tagen in Kultur. Alle Marker werden exprimiert. Die Expression läßt sich durch Zugabe von TNF- α steigern.

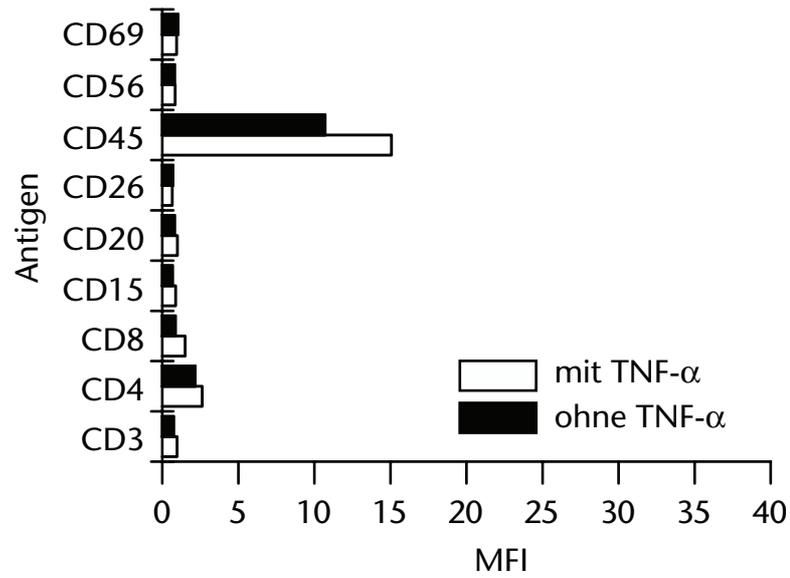


Abb. 8 Durchflußzytometrische Analyse myelotischer und lymphatischer Oberflächenmarker nach sieben Tagen in Kultur. Lediglich der auf allen Leukozyten nachweisbare Marker CD45 wird in nennenswerter Menge exprimiert

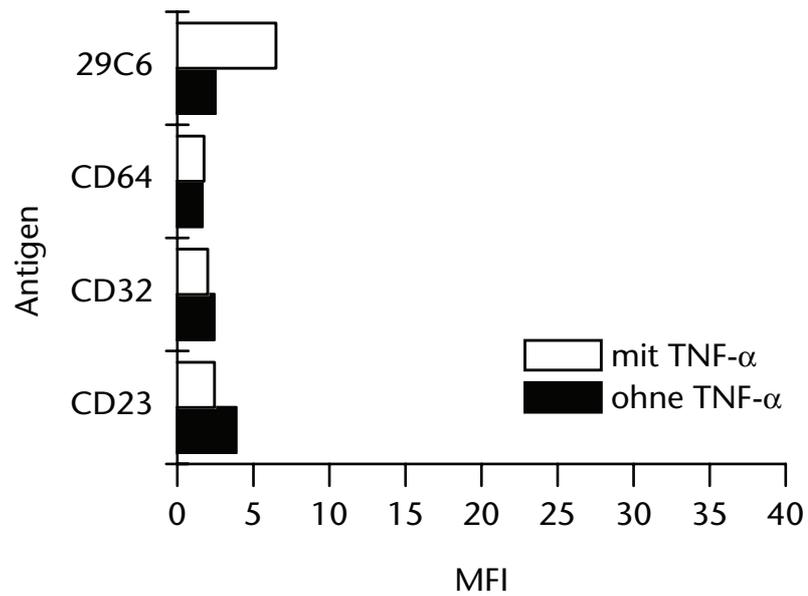


Abb. 9 Durchflußzytometrische Analyse verschiedener, mit der Antigenaufnahme assoziierter Rezeptoren nach sieben Tagen in Kultur. Keiner der untersuchten Rezeptoren wurde in nennenswerter Menge exprimiert

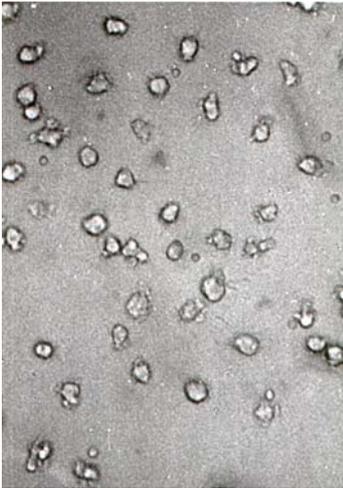


Abb. 10 Nach vierzehn Tagen in Kultur sind klar abgegrenzte einzelne Zellen mit unregelmäßig geformter Oberfläche sichtbar

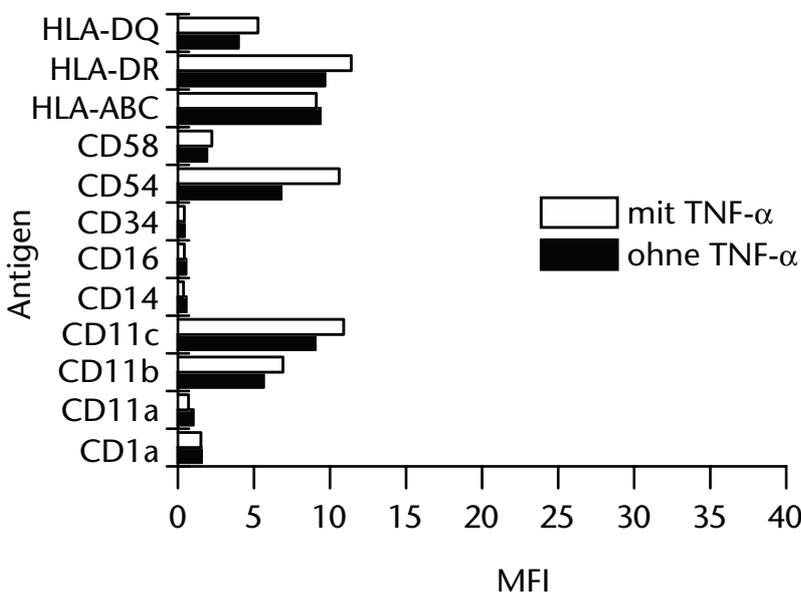


Abb. 11 Durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenmarker der mononukleären Zellen nach vierzehn Tagen in Kultur. Die Expression der MHC-Antigene ist gegenüber dem siebten Tag vermindert. Das Gleiche gilt für CD1a, CD11b und CD11c

3.2 Immunstimulatorische Eigenschaften der DC

Das immunstimulatorische Potential der generierten dendritischen Zellen wurde untersucht. Hierzu wurde die Fähigkeit der DC zur Stimulation peripherer Blutlymphozyten (PBL) mittels einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) bestimmt.

Dieser Test wurde sowohl mit allogenen, als auch autologen PBL in unterschiedlichen Mischverhältnissen (1:10, 1:50, 1:100) zu den DC durchgeführt.

Eine Kokultur von DC mit autologen PBL führte lediglich bei einem DC/PBL Verhältnis von 1:10 zu einer Proliferation der PBL. Der entsprechende Versuch mit allogenen PBL führte hingegen zu einer starken Proliferation der PBL. Bei allen Experimenten hing die Proliferation vom Mengenverhältnis zwischen DC und PBL ab (Abb. 12).

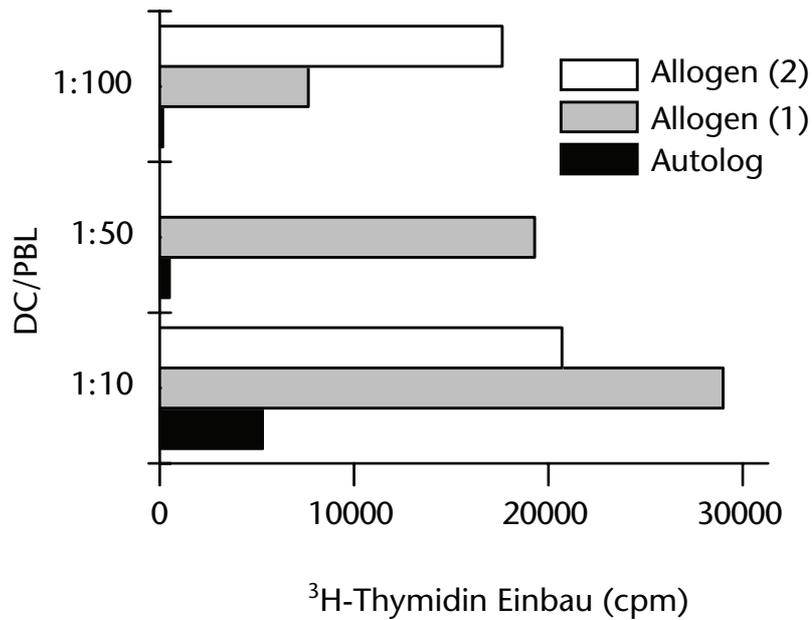


Abb. 12 Immunstimulatorische Kapazität von DC nach sieben Tagen in Kultur. Die Zahl der PBL wurde jeweils konstant bei $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Ansatz gehalten. Die Zahl der DC wurde entsprechend angepasst. Die ^3H -Thymidin Einbaurate wurde nach fünf Tagen bestimmt. Bei autologen PBL konnte nur eine schwache Proliferation festgestellt werden. Während bei der Verwendung von allogenen PBL eine starke proliferative Antwort beobachtet wurde

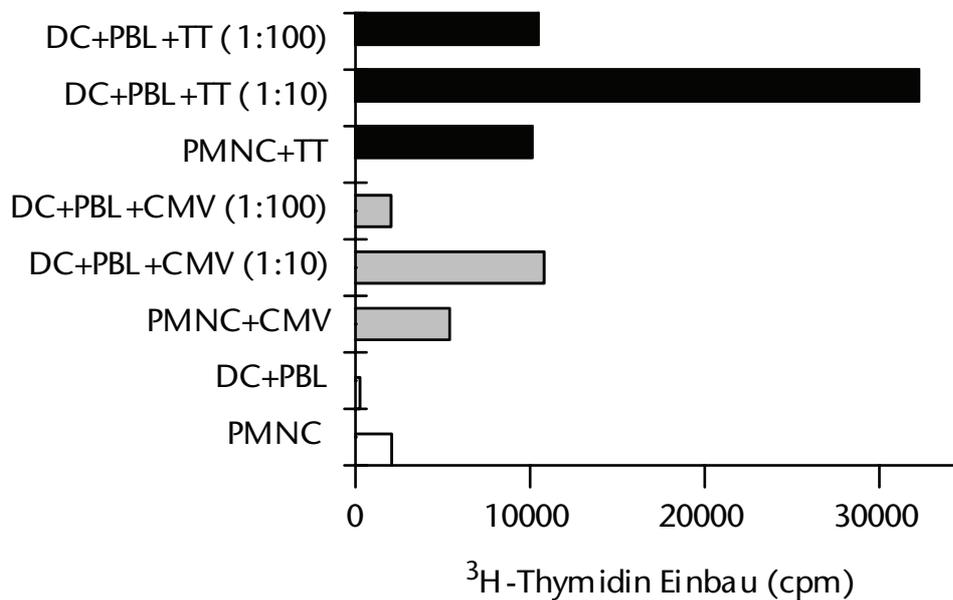


Abb. 13 Immunstimulatorische Kapazität von DC, sieben Tagen nach Gewinnung und PMNC im autologen System. Bei den Messung mit DC wurde die Zahl der PBL jeweils konstant bei $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Ansatz gehalten. Die Zahl der DC wurde entsprechend angepasst. PMNC wurden direkt nach Isolierung aus dem Spenderblut verwendet. Die ^3H -Thymidin Einbaurate wurde nach fünf Tagen bestimmt. Bei unbeladenen Zellen ergab sich nur unter Verwendung von PMNC eine schwache Proliferation. Nach Antigenbeladung der PMNC bzw. der DC konnte in allen Fällen eine starke Proliferation der PBL beobachtet werden

Die immunstimulatorische Kapazität der DC wurde in einem weiteren Experiment mit der von peripheren mononukleären Zellen (PMNC) verglichen (Abb. 13). Hierfür wurden sowohl unbeladene, als auch mit CMV-Peptid bzw. Tetanustoxin (TT) beladene PMNC bzw. DC eingesetzt. Die PBL waren jeweils autolog. Bei unbeladenen Zellen war lediglich bei Verwendung von PMNC eine schwache Proliferation festzustellen. Hingegen bei Antigen-beladenen Zellen kam es in jedem Fall zu einer deutlichen Proliferation der PBL.

3.3 Transfektion dendritischer Zellen

Die Transfizierbarkeit von dendritischen Zellen wurde durch liposomalen Gens-transfer zweier Reportergene (CAT, β -Galaktosidase), sowie von humaner Tyrosinase¹ getestet. Die Transfektion mit dem CAT bzw. dem β -Galaktosidase Gen diente als Kontrolle, um die Transfizierbarkeit der DC prinzipiell nachzuweisen. Eine β -Galaktosidaseaktivität konnte nur in einigen transfizierten DC beobachtet werden (Abb. 14).

Im CAT Assay ließen sich spezifische Enzymaktivitäten in CAT-transfizierten DC nachweisen (durchschnittlich 1066,53 cpm/ μ g Protein bei 6 unabhängigen Versuchen). Als negative Kontrolle diente eine Transfektion der DC mit dem leeren Vektor. Hier ließ sich eine durchschnittliche CAT-Aktivität von 194,46 cpm/ μ g Protein (3 unabhängige Versuche) nachweisen. Auf mRNA Ebene konnte CAT durch RT-PCR nachgewiesen werden.

Im Tyrosin-Hydroxylase-Assay wurden in transfizierten DC durchschnittlich 3257 cpm/ μ g Protein (Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen) nachgewiesen. Die Negativkontrolle ergab eine Aktivität von 1426 cpm/ μ g Protein (3 unabhängige Messungen). Auch auf mRNA Ebene wurde Tyrosinase durch RT-PCR nachgewiesen (Abb. 15). In der zweiten Bahn des Gels ist amplifizierte c-DNA aus HT-3 Zellen nach Transfektion mit humaner Tyrosinase als Positivkontrolle aufgetragen. Die Bahnen vier bis acht enthalten Tyrosinase-spezifische c-DNA aus vier unabhängigen Zell-Präparationen, die von unterschiedlichen Spendern gewonnen wurden. Kontaminierende Plasmid-DNA war nicht nachweisbar, wie die fehlende Amplifikation des

-
1. Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melanogenese und wurde für diese Versuche als Prototyp eines Tumorantigens ausgewählt, da Peptidfragmente dieses Proteins auf Melanomzellen durch T-Lymphozyten erkannt werden und zu einer CTL-vermittelten Zytolyse führen.

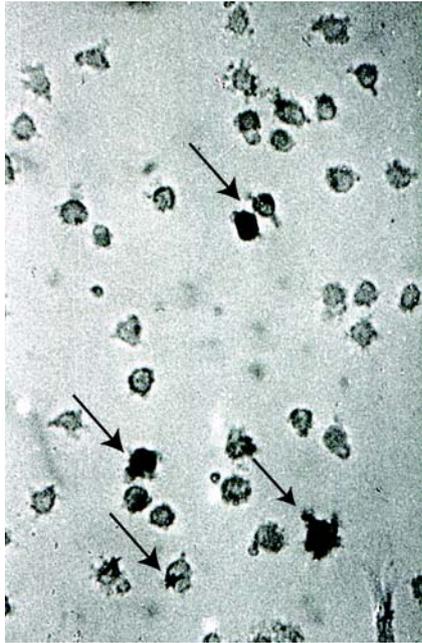


Abb14 Transfektion dendritischer Zellen mit Lipofectin. Nach Transfektion mit dem β -Galaktosidase Gen konnten einige transfizierte Zellen nachgewiesen werden



Abb. 15 Nachweis spezifischer Tyrosinase mRNA mittels RT-PCR in DC.

1: Mit Leervektor-transfizierte HT-3 Zellen. Primer: Tyr-1/Tyr-2.

2: HT-3 Zellen transfiziert mit humaner Tyrosinase/pCEP4. Primer: Tyr-1/Tyr-2. Bande bei 284 bp.

3: DC (Spender 1) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer: cmv-PRO100 und cmv-PRO592. Bande bei 527 bp.

4: DC (Spender 1) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Tyr-1/Tyr-2.

5: DC (Spender 2) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer: Tyr-1/Tyr-2.

6: DC (Spender 2) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer Tyr-3/Tyr-4, Bande bei 207 bp.

7: DC (Spender 3) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer: Tyr-1/Tyr-2.

8: DC (Spender 4) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer: Tyr-1/Tyr-2.

9: DC (Spender 4) mit humaner Tyrosinase/pCEP4 transfiziert. Primer: cmv-PRO100 und cmv-PRO592.

10: Leervektor-transfizierte DC (Spender 4). Primer: Tyr-1/Tyr-2.

11: Negative Kontrolle

M: 1 kb-DNA-Leiter

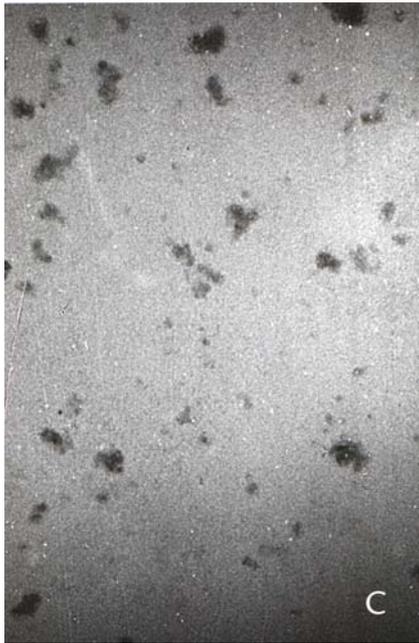
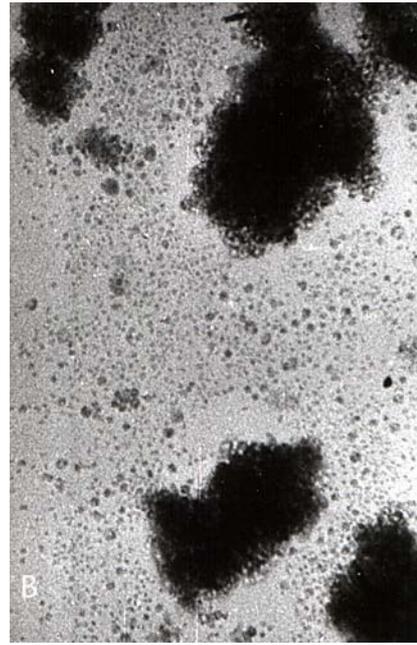
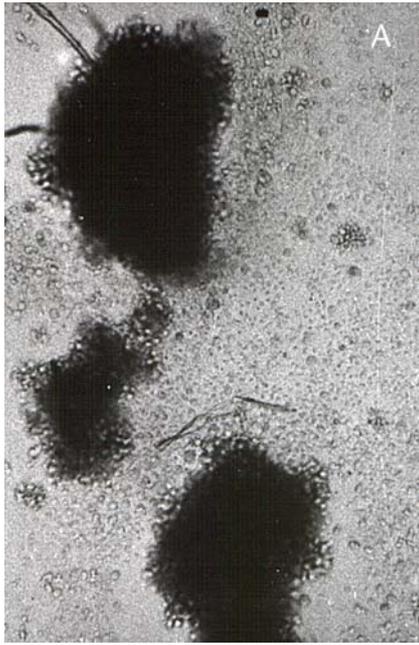


Abb. 16 Kokultur transfizierter DC mit CTL (IVSB). Die Cokultur der Tyrosinasetransfizierten DC mit IVSB führte zu einer Aggregation der Zellen (A). Das gleiche Ergebnis wurde mit den beladenen DC festgestellt (B), wohingegen bei mit CAT-transfizierten DC keine Aggregation beobachtet wurde (C)

CMV-Promoter (Abb. 15, 3 und 9) zeigt. Auch die mit einem Leer-Plasmid transfizierten DC exprimierten keine entsprechende RNA (Abb. 12, 1 und 10). 11 zeigt eine Negativkontrolle ohne Plasmid-DNA.

Der Erfolg der Transfektion mit dem Tyrosinase-Gen wurde ferner durch Cokultur der transfizierten DC mit dem tyrosinasespezifischen CTL-Klon IVSB überprüft. Als negative Kontrolle dienten DC, welche mit CAT transfiziert waren. Als positive Kontrolle wurden, mit dem humanen Tyrosinase Fragment Ty2 beladenen, DC verwendet. Die Cokultur der Tyrosinasetransfizierten DC mit IVSB führte zu einer Aggregation der Zellen (Abb. 16 A). Das gleiche Ergebnis wurde mit den beladenen DC festgestellt (Abb. 16 B), wohingegen bei mit CAT-transfizierten DC keine Aggregation beobachtet wurde (Abb. 16 C). Insgesamt kam es durch die transfizierten DC zu einer ausgeprägten CTL Stimulation. Dies äußerte sich auch durch eine Freisetzung von TNF- α durch die CTL. Die Konzentration von TNF- α im Zellkulturüberstand betrug hierbei 30 pg/ml (Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen). Auch die beladenen DC induzierten eine ähnlich starke CTL Stimulation, wobei im Kulturüberstand eine TNF- α Konzentration von 26 pg/ml festgestellt wurde. Die CAT-transfizierten DC waren nicht zu einer Stimulation in der Lage. Die TNF- α Konzentration betrug bei diesen Versuchen 4,5 pg/ml.

3.4 Stimulation von CTL durch transfizierte DC

Die Reaktion von CTL aus dem Blut HLA-A2 positiver, gesunder Spender auf mit Tyrosinase transfizierten DC wurde durch Co-Kultur Experimente untersucht. Hierzu wurden naive CD 8⁺ T-Zellen mit transfizierten DC zusammen kultiviert. Die Stimulation wurde insgesamt viermal im Lauf von vier Wochen wiederholt. Danach wurden T-Zell Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD56) auf den T-Zellen durchflußzytometrisch untersucht. Ein typisches Ergebniss dieser Versuche ist in Abb. 17 dargestellt. Bei den Co-Kulturen mit transfizierten DC waren nach vier Wochen praktisch nur noch CD8⁺ Zellen nachweisbar. Im Gegensatz hierzu waren in Co-Kulturen von T-Zellen mit nichttransfizierten DC, die meisten T-Zellen CD4⁺.

Tyrosinasefragmente werden in vivo im Kontext mit HLA-A2 präsentiert. Eine eventuelle zytotoxische Aktivität der stimulierten T-Zellen sollte also zu einer Lyse entsprechender Zielzellen führen. Die entsprechenden Versuche wurden mit einer aus einem Melanompatienten etablierten Zelllinie (UKRV-MEL-15) durchgeführt. Diese Zellen sind gemäß durchflußzytometrischer Analyse HLA-A2 , HLA-A11 positiv. Eine endogene Tyrosinase-Expression wurde durch RT-PCR nachgewiesen (Abb. 18).

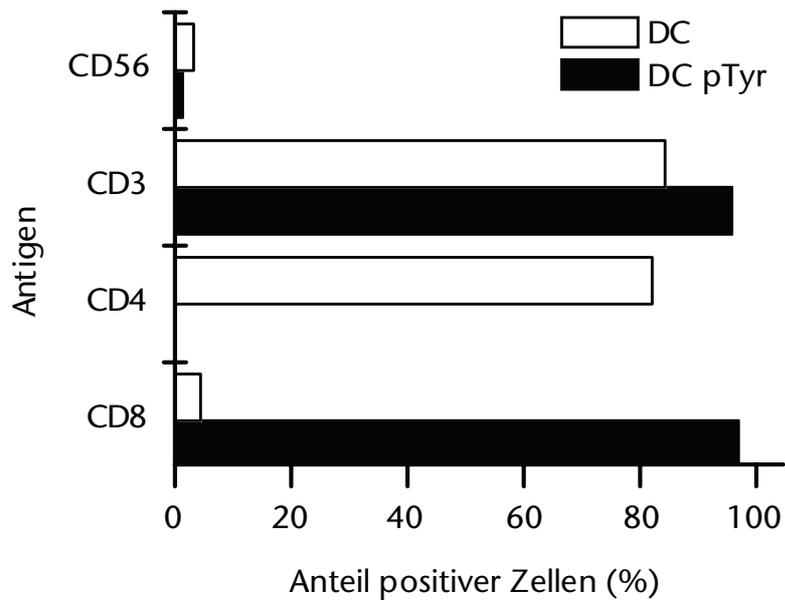


Abb. 17 Expression Oberflächenmarkern durch T-Zellen nach vierwöchiger Co-Kultur mit transfizierten bzw. nicht-transfizierten DC. Nach Co-Kultur mit tyrosinase-transfizierten DC sind praktisch nur noch $CD8^+$ T-Zellen nachweisbar. Mit nicht-transfizierten DC überwiegen die $CD4^+$ T-Zellen

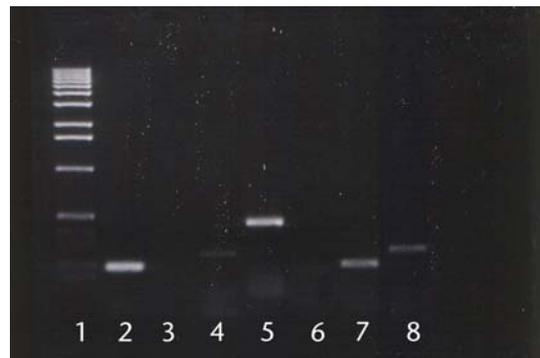


Abb. 18 Expressionsmuster der UKRV-MEL-15 Zelllinie. Die Zelllinie exprimiert endogen Tyrosinase.

1: Marker

2: GAPDH

3: MAGE-1

4: MART-1

5: GP100

6: MAGE-3

7: Tyrosinase 3/4 207bp

8: Tyrosinase 1/2 284 bp

Die lytische Aktivität der stimulierten T-Zellen wurde mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays (LDH-Assay) bestimmt. In Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen T-Zellen und Zielzellen, Effector / Target (E/T), kommt es zu einer Lyse der Melanomzellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 zusammengefasst. Bei einem E/T von 3:1 werden ca. 30% der Zielzellen lysiert.

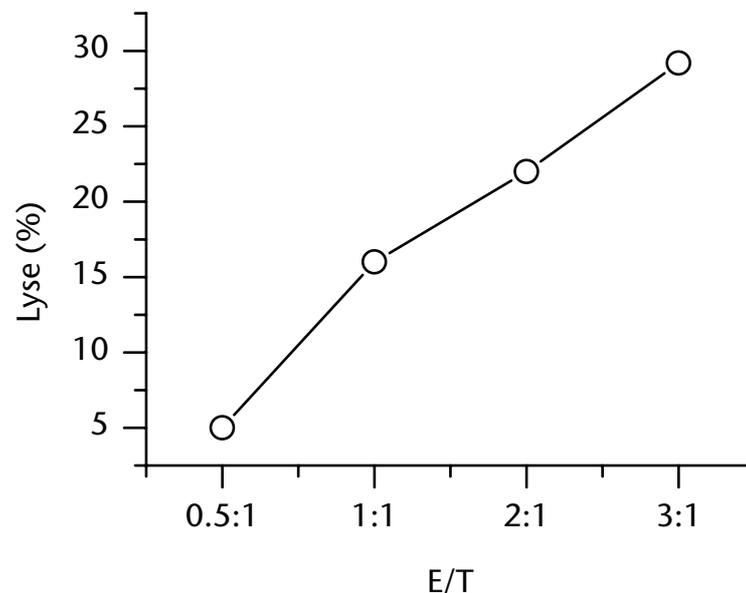


Abb. 19 Lytische Aktivität der stimulierten T-Zellen. Bei einem Effector / Target Verhältnis von 3:1 werden 30% der Zielzellen (UKRV-MEL-15) lysiert

3.5 Zytokinexpression in DC

Das Zusammenspiel der Zellen des Immunsystems wird maßgeblich durch verschiedene Zytokine gesteuert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Expression verschiedener Zytokine in DC unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Abb. 20 zeigt die Zytokin-Expression unstimulierter DC. Ohne Stimulation werden lediglich TNF- α und (schwach) IL-10 exprimiert. Entsprechende Untersuchungen wurden nach Stimulation der DC mit verschiedenen Peptiden (KLH, MAGE-1 u. a.), Tumorlysat, DMSO oder nach Transfektion mit Tyrosinase bzw. Leervektor durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Expression von IFN- α steigt generell nach Stimulation der DC durch Peptide an. Mit Tumorlysat ist keine Erhöhung festzustellen. IL-1 α wurde nach Behandlung mit Tumorlysat und dem stark immunogenen Protein KLH nachgewiesen, während IL-1 β durch Stimulation überhaupt nicht induzierbar war. Die Expression des IL10 wurde durch Sti-

mulation mit Peptiden gehemmt, lediglich mit Tumorlysat oder KLH blieb die Expression bestehen. GM-CSF kann durch KLH und verschiedene Peptide induziert werden. Auffällig ist, daß eine Transfektion einen starken generellen Anstieg der Expression der untersuchten Zytokine zur Folge hat.

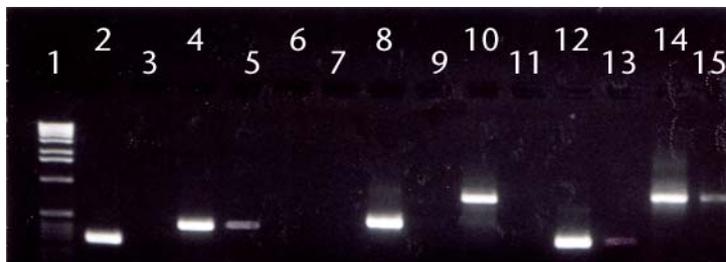


Abb. 20 Expression ausgewählter Zytokine durch unstimulierte DC gemäß RT-PCR. Zu jedem untersuchten Zytokin wurde parallel eine positive Kontrolle gemäß den Anweisungen des KIT-Herstellers aufgetragen

1: Marker, 2: IFN- α , 303 bp, 3: IFN- α , DC, 4: TNF- α , 444 bp, 5: TNF- α , DC, 6: IL-6, 628 bp, 7: IL-6, DC, 8: IL-1 α , 491 bp, 9: IL-1 α , DC, 10: IL-1 β , 802 bp, 11: IL-1 β , DC, 12: IL-10, 328 bp, 13: IL-10, DC, 14: β -Actin, 838 bp, 15: β -Actin, DC

Tabelle 5 Zytokinexpression der DC nach unterschiedlichen Stimuli

	TNF- α	IFN- α	IL1- α	IL1- β	IL-10	GM-CSF
unstimuliert	+	-	-	-	+	-
Lysat	+	-	+	-	+	nd
KLH	+	+	+	-	+	+
Tyrosinase	+	+	-	-	-	-
MART-1	+	+	-	-	-	-
gp 100	+	+	-	-	-	+
MAGE-1	+	+	-	-	-	+
MAGE-3	+	+	-	-	-	+
DMSO	+	+	nd	-	-	-
Leervektor	+	+	nd	+	+	+
pTyr	+	+	nd	+	+	+

3.6 Immunisierungsstudien an Melanompatienten

Im Rahmen der Immunisierungsstudien wurden den Patienten mit KLH und Tumorlysate bzw. verschiedenen Peptiden beladene, autologe, DC infundiert. Da bisher nur geringe Erfahrungen mit dieser Behandlung vorlagen, lag das Hauptaugenmerk der Studie auf der Verträglichkeit der Therapie. Insgesamt nahmen 16 Patienten an der Studie teil. Die Patientendaten sind in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Die Immunisierung wurde generell gut vertragen. Nur gelegentlich kam es zu leichtem Fieber oder Lymphknotenschwellungen, welche aber nach einem bis zwei Tagen wieder abklangen. Bei keinem der Patienten konnten irgendwelche Symptome einer Autoimmunkrankheit beobachtet werden.

In drei Patienten (Nr. 8, 10 und 13) konnten Antikörper gegen den TSH Rezeptor nachgewiesen werden, allerdings wurden keine klinischen Effekte beobachtet. Bei Patient Nr. 1 traten nach der sechsten Behandlung Antikörper gegen Nukleoproteine auf, wobei wiederum keine klinischen Auswirkungen erkennbar waren.

Bei Patient Nr. 11 bildete sich ein Pigmentfleck zurück, was auf eine Immunreaktion gegen Melanocyten hindeutet. Weitere negative Effekte konnten jedoch nicht beobachtet werden.

Insgesamt läßt sich sagen, daß eine wiederholte Behandlung von Patienten mit beladenen DC keine negativen Auswirkungen auf die Patienten hat.

Neben den oben erwähnten Sicherheitsaspekten stellt sich natürlich die Frage inwieweit eine Immunisierung mit DC eine spezifische Immunantwort induzieren kann. Die in-vitro Bestimmung der Aktivität von tumorspezifischen CTL ist derzeit umstritten und es konnte bisher auch keine Übereinstimmung hinsichtlich der geeigneten Methodik erzielt werden. Daher wurden in der vorliegenden Studie DTH Reaktionen verwendet, um eine spezifische Immunisierung nachzuweisen. Hierzu wurde die Immunreaktion der Patienten nach Immunisierung mit dendritischen Zellen, welche mit KLH, tumorspezifischen Peptiden bzw. mit Tumorlysate beladen waren, getestet. Vor der Immunisierung konnte keine Immunreaktion auf eines der erwähnten Antigene nachgewiesen werden.

Bei KLH handelt es sich um ein körperfremdes Protein, welches eine starke Immunreaktion auslösen sollte. Es muß von den dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Anschließend präsentieren die dendritischen Zellen die Proteinfragmente in Verbindung mit MHC-II-Molekülen. Dies führt letztlich zu einer Stimulation der T-Helfer Zellen.

Nach sechs Immunisierungsbehandlungen war bei allen Patienten eine starke Immunantwort gegen KLH festzustellen (Tabelle 6, Abb. 21a). Anhand von Biopsiematerial konnte eine starke Infiltration der Injektionsstelle durch CD45RO⁺, CD4⁺ Lymphocyten beobachtet werden (Abb. 21c).

Tabelle 6 *Patientendaten und Ergebnisse der Immunisierung mit DC*

Nr.	Alter Geschlecht	Tumordicke	DC Beladung	Klinisches Ergebnis	DTH Reaktion
1	60 w	?	A2 Peptide	PR	Pep + KLH ++
2	57 w	1,8 mm	Tumorlysat	PD	KLH (+)
3	29 w	?	Tumorlysat	PD	KLH +
4	65 m	?	Tumorlysat	CR	Pep ++ KLH+++ Lysat ++
5	48 w	2,0 mm	A2 Peptide	PD	KLH ++
6	42 m	2,8 mm	A2 Peptide	PD	KLH ++
7	54 m	1,58 mm	Tumorlysat	PR	Pep (+) KLH +++ Lysat ++
8	62 m	7,0 mm	A1 Peptide	PR	Pep + KLH +
9	69 w	2,5 mm	A2 Peptide	CR	Pep + KLH ++ Lysat ++
10	69 m	4,5 mm	A1 + A2 Peptide	PD	KLH +
11	23 m	1,08 mm	A1 + A2 Peptide	PD	Pep (+) KLH ++
12	40 w	?	A1 Peptide	PD	Pep (+) KLH (+)
13	54 m	0,9 mm	A1 Peptide	PD	Pep + KLH ++
14	37 m	3,8 mm	A2 Peptide	PD	Pep (+) KLH +
15	59 m	2,6 mm	A1 Peptide	PD	Pep (+) KLH (+)
16	64 m	3,15 mm	A2 Peptide	MR	Pep +++ KLH +++

CR: *complete response, komplettes Verschwinden aller klinischen Manifestationen des metastasierenden Melanoms während eines Zeitraums von über einem Monat*

PR: *partial response, Regression von mehr als 50% der gesamten Tumormasse*

MR: *mixed response, Regression an manchen metastatischen Tumorlokalisationen und eine Progression an anderen Läsionen*

SD: *stable disease, konstantes Verhalten des Tumors ohne wesentliche Verschlechterung oder Verbesserung innerhalb von 6 Wochen*

PD: *progressive disease, unzweifelhaftes Wachsen der Tumormasse um mehr als 50%*

DTH Reaktion, Schwellung nach 48 Stunden:

(+) 6 bis 10 mm

+ 11 bis 20 mm

++ 20 bis 30 mm

+++ über 30 mm

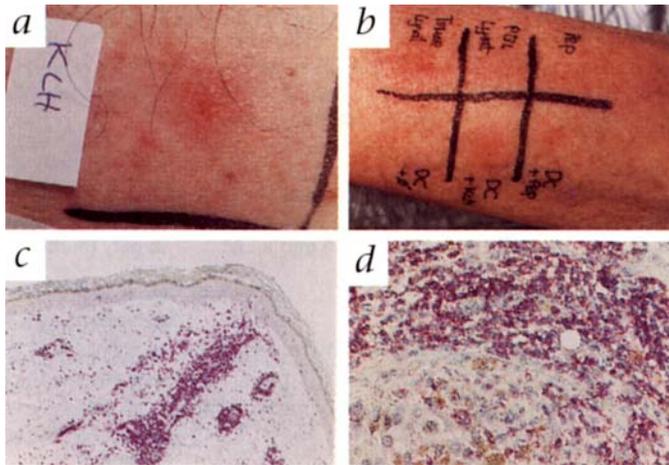


Abb. 21 *DTH Tests und histologische Veränderungen nach Immunisierung mit beladenen DC. (a) Typische DTH Reaktion gegen KLH, welche bei allen Patienten nach der Immunisierung auftrat. (b) DTH Reaktion gegen mit KLH bzw. A2 Peptiden beladene DC. Nach Injektion von Peptiden oder Lysaten aus PBL allein trat keine Hautreaktion auf. Der hier dargestellte Patient (Nr. 9) zeigte auch eine Reaktion gegen autologes Tumorlysate. (c) Infiltration der Injektionsstelle (DTH Test mit KLH) durch CD45RO⁺ T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD45RO⁺ nachgewiesen. (d) Infiltration von Tumormetastasen durch CD45RO⁺ positive Zellen*

Im Rahmen von DTH Tests müssen tumorspezifische Peptide zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert werden, um durch Effektor T-Zellen erkannt zu werden. Das Beladen von schon im Gewebe vorhandenen Antigenpräsentierenden Zellen mit Peptiden ist schwierig, da die Peptide sehr schnell abgebaut werden. Daher wurden die Tests auf eine tumorspezifische Immunantwort mit ex vivo beladenen dendritischen Zellen durchgeführt, welche dem Patienten intradermal injiziert wurden. Zur Kontrolle wurden auch unbeladene dendritische Zellen injiziert. Die Immunantwort auf diesen Stimulus war jedoch relativ gering. Die auftretenden Schwellungen waren kleiner als 6 mm. Lediglich bei den Patienten 1 (9 mm), 13 (7 mm), 15 (20 bis 15 mm) und 16 (30 mm) traten größere Schwellungen auf.

Nach Injektion von beladenen DC wurden generell größere Schwellungen beobachtet. Eine Ausnahme bildete hier Patient Nr. 1. Bei diesem Patienten wurde allerdings eine Immunantwort gegen die reinen Peptide festgestellt.

Eine starke Immunantwort mit einer Schwellung von über 10 mm trat bei fünf Patienten auf (Abb. 21 b). Bei vier dieser Patienten (Nr. 1, 8, 9, 16) konnte auch eine signifikante Verbesserung des klinischen Zustandes erzielt werden. Auf immunhistochemischem Wege konnte auch die Infiltration von Tumormetastasen durch CD45RO⁺, CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21d).

Um die Aussagekraft der DTH Tests für den Nachweis peptidspezifischer CTLs zu untersuchen, wurden immunhistochemische Methoden und in vitro Test eingesetzt. Durch Färbung von Gefriergewebeschnitten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8, konnte eine starke Infiltration der Schwellungen durch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die infiltrierenden Zellen wurden isoliert und auf peptid-spe-

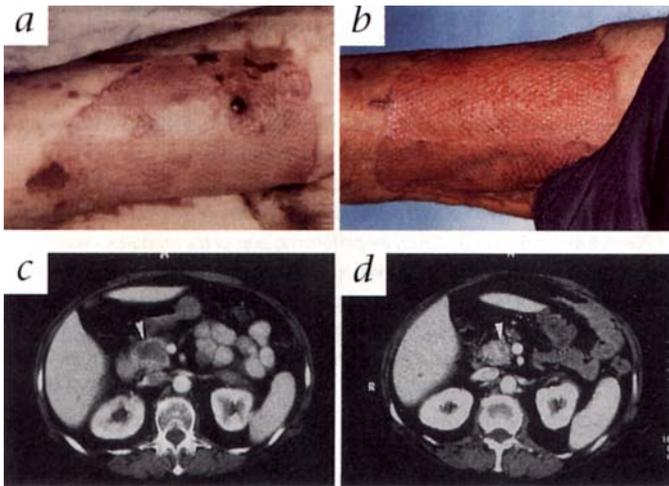


Abb. 22 *Klinische Ergebnisse der Immunisierung mit beladenen dendritischen Zellen. (a) rechtes Bein des Patienten Nr. 4 mit Hautmetastasen vor der Immunisierung (b) das gleiche Gebiet nach Abschluß der Behandlung mit Tumorlysate beladenen DC. Alle Hautmetastasen haben sich zurückgebildet. CT Aufnahmen des Patienten Nr. 1 vor (c) und nach (d) der Behandlung. Die in (c) sichtbaren Metastasen im Pankreas haben sich deutlich zurückgebildet*

zifische Cytotoxizität getestet. Cytotoxizität wurde durch gp100 und Melan A, jedoch nicht durch Tyrosinase induziert.

Die Patienten 4 und 7 zeigten eine Immunantwort sowohl gegen Tumorlysate, als auch gegen tumorspezifische Peptide aus Tyrosinase, gp100 und Melan-A. Auch bei diesen Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen der Immunreaktivität und dem klinischen Verlauf beobachtet werden. Die Patienten 2 und 3 zeigten keine Immunreaktivität und auch keine Verbesserung der klinischen Befunde. Bei Patient 9 kam es zu einer Immunreaktion auf autologes Tumorlysate, obwohl der vorher lediglich mit peptidbeladenen DC immunisiert worden war, bei diesem Patienten besserte sich der klinische Zustand signifikant.

Alle teilnehmenden Patienten hatten schon mehrere erfolgreiche Therapieversuche hinter sich. Bei den meisten waren auch Metastasen in verschiedenen Organen nachweisbar. Eine vollständige Remission konnte bei zwei Patienten (Nr. 4 und Nr. 9) erzielt werden (Abb. 22 a, b). Bei beiden Patienten beschränkte sich der Tumor hauptsächlich auf die Haut. Bei vier anderen Patienten konnte eine Reduktion der Tumormasse in anderen Organen um über 50% beobachtet werden. Die klinischen Verbesserungen traten nach 6 bis 10 wöchiger Behandlung ein.

Von den sechs HLA-A1 positiven Patienten, die mit MAGE-1 und MAGE-3 Peptiden beladenen DC immunisiert wurden, zeigte nur einer eine Verbesserung seines klinischen Zustandes (Patient 8). Von den sechs HLA-A2 positiven Patienten zeigte einer eine komplette und einer eine teilweise Remission (Nr 9 bzw. Nr. 1) (Abb. 22 c, d).

Vier Patienten wurden mit Tumorlysate beladenen DC immunisiert. Zwei von ihnen (beide HLA-A2) zeigten klinische Verbesserungen, welche sich in einem Rückgang von Hautmetastasen bzw. Lungenmetastasen äußerten (Patienten 4 und 7).

Die beiden Patienten mit kompletter Remission waren auch 15 Monate nach Abschluß der Studie tumorfrei, während die teilweisen Remissionen länger als sechs Monate anhielten.