

Aus dem  
CharitéCentrum 14 für Tumormedizin, Campus Virchow-Klinikum  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Dörken

## **Habilitationsschrift**

# **Modifikation der Antigenpräsentation zur Induktion von Tumormunität**

zur Erlangung der Venia Legendi für das Fach  
Innere Medizin  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jörg Westermann  
geb. am 21.02.1964 in Bonn

eingereicht: im März 2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. D.J. Schendel/ München

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Gramatzki/ Kiel

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1	Tumorimmunologie: Im Wandel der Konzepte.....	6
2.2	Strategien der Immuntherapie.....	9
2.3	Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) als Modell einer immunresponsiven Erkrankung.....	12
2.3.1	Zelluläre Immunität/ Zielantigene bei der CML/Vakzinierung bei CML.....	13
2.4	Das Nierenzell-Karzinom (NCC).....	16
2.4.1	In-Vivo-Amplifikation der Antigenpräsentation durch GM-CSF.....	17
2.5	Präklinische Modelle zur Modifikation der Antigenpräsentation in vivo: Flt-3L und CCL19(ELC) als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung.....	18
<b>3.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>Präklinische und klinische Untersuchungen</b>	
4.1	Anti-Leukämie-Immunität bei der Chronischen Myeloischen Leukämie.....	21
4.1.1	Simultane Zytokin-Analyse mittels Cytometric Bead Array (CBA) zum Nachweis Leukämie-reaktiver T-Zellen bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (2005) Westermann J, van Lessen A, Schlimper C, Baskaynak G, le Coutre P, Dörken B, Pezzutto A Simultaneous cytokine analysis by Cytometric Bead Array (CBA) for the detection of Leukaemia-reactive T cells in patients with chronic myeloid leukemia. Br J Haematol 132: 32-35.....	22
4.1.2	Erkennung von bcr/abl durch T-Zellen bei Gesunden und bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (2004) Westermann J, Schlimper C, Richter G, Mohm J, Dörken B, Pezzutto A T cell recognition of bcr/abl in healthy donors and in patients with chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol 125:213-216 .....	27
4.1.3.	Vakzinierung mit autologen nicht-bestrahlten Dendritischen Zellen bei Patienten mit bcr/abl+ CML (2007) Westermann J, Kopp J, Hecker A, van Lessen A, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol, in press.....	32
4.1.4	Kryokonservierung von reifen, aus Monozyten generierten humanen Dendritischen Zellen für die Vakzinierung: Einfluss auf Phänotyp und funktionelle Eigenschaften (2003) Westermann J, Körner IJ, Kopp J, Kurz S, Zenke M, Dörken B, Pezzutto A Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties. Cancer Immunol Immunother 52:194-198.....	43
4.1.5	Retroviraler IL-7-Genstransfer in humane Dendritische Zellen verstärkt die T-Zell-Aktivierung (1998) Westermann J, Aicher A, Qin Z, Cayeux S,	

	Daemen K, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation. <i>Gene Therapy</i> 5: 264-271.....	49
4.1.6	Bcr/abl+ autologe Dendritische Zellen zur Vakzinierung bei Chronischer Myeloischer Leukämie (2000) Westermann J, Kopp J, Körner IJ, Richter G, Qin Z, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A Bcr/abl+ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia. <i>Bone Marrow Transplant</i> 25: S46-49.....	58
<b>4.2</b>	<b>In-Vivo-Modifikation der Antigenpräsentation durch GM-CSF beim Nierenzell-Karzinom</b>	
4.2.1	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor plus Interleukin-2 plus Interferon-alpha in der Behandlung des metastasierten Nierenzell-Karzinoms (2001) Westermann J, Reich G, Kopp J, Haus U, Dörken B, Pezzutto A Granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor plus interleukin-2 plus interferon-alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study. <i>Cancer Immunol Immunother</i> 49: 613-620.....	63
<b>4.3</b>	<b>In-Vivo-Modifikation der Antigenpräsentation im Mausmodell durch Flt-3L und CCL19(ELC)</b>	
4.3.1	Flt-3L als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung führt zur Verstärkung der Immunantwort, jedoch nicht zur Veränderung der TH-1/TH-2-Polarisierung (2004) Westermann J, Nguyen-Hoai T, Mollweide A, Richter G, Schmetzer O, Kim HJ, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A Flt-3 ligand as adjuvant for DNA vaccination augments immune responses but does not skew TH-1/TH-2 polarization. <i>Gene Therapy</i> 11: 1048-1056.....	72
4.3.2	CCL19 (ELC) als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung: Induktion einer TH-1-T-Zell-Antwort und Verstärkung der Anti-Tumor-Immunität (2007) Westermann J, Nguyen-Hoai T, Höpken UE, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A CCL19 (ELC) as adjuvant for DNA vaccination: Induction of a TH-1-type T cell response and enhancement of antitumor immunity. <i>Cancer Gene Therapy</i> (in press).....	82
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>119</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung gemäß Habilitationsordnung.....</b>	<b>120</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Tumorstimmimpfung ist ein Verfahren der aktiven Immuntherapie zur Induktion einer Antigen-spezifischen zellulären und/oder humoralen Immunantwort. Ziel der hier zusammengefassten Arbeiten war die gezielte Modifikation der Antigenpräsentation in der Absicht, eine Tumor-spezifische Immunantwort zu induzieren. Dabei erfolgte die Beeinflussung der Antigenpräsentation einerseits *ex vivo* durch den Einsatz von autologen Dendritischen Zellen (DC) als Vakzine bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML), andererseits direkt *in vivo* durch Applikation von Zytokinen (GM-CSF und Flt-3L) oder Chemokinen (CCL19/ELC), welche die Antigenpräsentation beeinflussen.

Bei CML-Patienten wurde zunächst mittels funktioneller und struktureller T-Zell-Assays untersucht, ob T-Zellen gegen Leukämie-spezifische oder Leukämie-assoziierte Antigene im peripheren Blut nachweisbar sind. Bei einem Teil der Patienten konnten CD8+T-Zellen detektiert werden, welche CML-assoziierte Antigene erkennen. Diese T-Zellen hatten jedoch zum Teil ein aberrantes Zytokin-Sekretionsprofil mit dominanter TNF- $\alpha$ - und fehlender  $\gamma$ -IFN- Sekretion. Möglicherweise ist dies Ausdruck einer funktionellen Beeinträchtigung der T-Zellen, z.B. Folge einer „nicht immunogenen“ Antigen-Präsentation durch die Leukämiezellen. Erst nach In-Vitro-Prästimulation konnten vorwiegend  $\gamma$ -IFN-sezernierende Leukämie-spezifische CD8+ T-Zellen detektiert werden. In einer Phase-I/II-Vakzinierungs-Studie wurden unbestrahlte bcr/abl+ autologe DC als subkutane Vakzine bei CML-Patienten in chronischer Phase eingesetzt. Die Vakzinierung war gut durchführbar, wesentliche Toxizität wurde nicht beobachtet. Bei allen Patienten führte die Vakzinierung zur T-Zell-Aktivierung. Bei 4/10 Patienten kam es im Verlauf von 3-4 Monaten zu einem Abfall von bcr/abl+ mononukleären Zellen im peripheren Blut, bei drei dieser Patienten wurden CD8+ T-Zellen gegen CML-assoziierte Antigene induziert. In einer In-Vitro-Studie wurde bei gesunden Donoren und bei CML-Patienten gezeigt, dass die Kryokonservierung von DC ein geeignetes Verfahren ist, um DC zu lagern, ohne dass es zu einer wesentlichen Beeinflussung von Phänotyp und Funktion kommt. Dieses Ergebnis ist für die praktische Durchführbarkeit von klinischen Studien von großer Bedeutung. Mit dem Ziel einer weiteren Verbesserung der T-Zell-aktivierenden Eigenschaften wurde eine retrovirale Transduktion von DC mit dem Interleukin-7-Gen untersucht. Sowohl bei DC von gesunden Donoren als auch von CML-Patienten konnte die T-Zell-stimulatorische Kapazität durch Transduktion mit IL-7 um einen Faktor 2-3 gesteigert werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die *direkte In-Vivo-Modifikation der Antigen-Präsentation* untersucht. GM-CSF, ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor für DC wurde

bei Patienten mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom (NCC) in Kombination mit den T-Zell-aktivierenden Zytokinen  $\alpha$ -Interferon und Interleukin-2 innerhalb einer Phase-I/II-Studie eingesetzt. Klinisch war die Verträglichkeit der Therapie moderat, schwere Toxizität trat jedoch nicht auf. Beim Monitoring fanden sich Zeichen einer immunologischen Aktivierung durch GM-CSF, jedoch lassen die klinischen Ansprechraten weitere Studien mit GM-CSF nicht erfolgversprechend erscheinen.

Eine weitere Strategie der direkten Modifikation von Antigen-Präsentation in vivo stellt die DNA-Vakzinierung dar, denn die In-Vivo-Transfektion von DC ist wesentlicher Teilaspekt des immunologischen Wirkmechanismus einer DNA-Vakzine. Im Hinblick auf den klinischen Einsatz als Tumorstoffe bietet DNA mehrere Vorteile im Vergleich zu zellulären Impfstoffen, insbesondere sind hier die allgemeine Anwendbarkeit bei geringerem Produktionsaufwand, die Expression zahlreicher MHC-Klasse-I/II-Epitope und die Immunogenität von DNA zu nennen. In einem Mausmodell zur DNA-Vakzinierung wurde der adjuvante Effekt der immunmodulatorischen Moleküle Flt-3L und CCL19(ELC) untersucht. In einem Mausmodell mit  $\beta$ -Gal als Modellantigen konnte gezeigt werden, dass Flt-3L zu einer massiven Expansion von myeloischen und lymphoiden DC führt, die Antigen-spezifische Immunantwort verstärkt, jedoch nicht zu einer möglicherweise wünschenswerten TH-1-Polarisierung der Immunantwort führt.

CCL19(ELC) war in dem murinen  $\beta$ -Gal-Tumormodell ein potentes Adjuvans für die DNA-Vakzinierung. In Tumor-Challenge-Experimenten wurde eine Verbesserung des Tumor-protaktiven Effektes der Vakzine durch Koexpression von CCL19 beobachtet. CCL19 verstärkte dabei eine TH-1-polarisierte Antigen-spezifische Immunantwort gegen  $\beta$ -Gal, wobei hier ursächlich wahrscheinlich eine vermehrte Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und DC, z.B. in regionalen Lymphknoten, eine entscheidende Rolle spielt.

Die hier zusammengefassten Arbeiten haben die Voraussetzungen für zukünftige Tumorstoffe-Vakzinierungsstudien geschaffen, bei denen die klinische Situation der minimalen Resterkrankung im Vordergrund stehen soll. Bei der CML ist eine multizentrische Vakzinierungsstudie mit autologen Peptid-gepulsten DC bei Patienten mit zytogenetischer/molekularer Resterkrankung nach Ansprechen auf Imatinib in Vorbereitung. Für die DNA-Vakzinierung ist die Entwicklung eines Her2/neu-CCL19-Plasmidvektors zur Immunisierung von Patientinnen mit metastasiertem Mamma-Karzinom geplant, welche unter einer vorangegangenen systemischen Therapie eine sehr gute partielle oder eine komplette Remission erreicht haben.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Tumorimmunologie: Im Wandel der Konzepte*

Der Gedanke der Tumorthherapie durch Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort ist mehr als 100 Jahre alt: Bereits der New Yorker Chirurg William Coley beobachtete, dass lokale Infektionen die Rückbildung von Tumoren induzieren können (1). Die zentrale Frage der Tumorimmunologie, welche im Laufe der Zeit zu verschiedenen Konzepten führte, war die nach den grundlegenden immunologischen Mechanismen der Koexistenz von Immunität gegenüber externen Pathogenen und Toleranz gegenüber Autoantigenen. Das erste moderne Konzept hierzu wurde 1959 von Burnet entwickelt: Die klonale Selektionstheorie postuliert, dass autoreaktive T-Zellen im Thymus eliminiert werden. Auf diese Weise würde das periphere T-Zell-Repertoire so geformt, dass pathologische Autoimmunität vermieden wird (2,3). Konsequenz dieses Konzeptes ist, dass spezifische Immunität ausschließlich gegen streng Tumor-spezifische Antigene auftreten kann. In den 1960er Jahren formulierte Burnet als Weiterentwicklung daraus die „Immunosurveillance-Theorie“, welche dem Immunsystem eine zentrale Bedeutung als Kontrollinstanz gegen die Entstehung maligner Tumoren zuschreibt (4). Da hierdurch weder Autoimmunität noch die i.d.R. insuffiziente Tumorimmunität hinreichend erklärt werden, entstanden im Verlauf der 1990er Jahre zwei wesentliche neue Konzepte: die „Dominant Tolerance Theory“ und die „Danger Theory“. Erste Hinweise auf die Existenz physiologischer Autoreaktivität von T-Zellen stammten aus Experimenten mit Mäusen, welche in keimfreier Umgebung gehalten wurden: Bei diesen Mäusen konnte eine spontane Aktivierung von T-Zellen nachgewiesen werden (5). Sakaguchi et al. zeigten dann erstmals, dass autoreaktive T-Zellen und T-Zellen mit regulatorischer Funktion koexistieren (6). Das Konzept der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) wurde später erweitert durch die Unterscheidung von natürlichen  $T_{reg}$ , welche im Thymus entstehen, und peripheren  $T_{reg}$ , welche einen anderen Phänotyp aufweisen (7-9). Die Entdeckung der  $T_{reg}$  führte dann Mitte der 1990er Jahre zur „Dominant Tolerance Theory“ (10). Hiernach besteht eine physiologische Balance zwischen autoreaktiven T-Zellen und Suppression durch  $T_{reg}$ . Eine Störung dieser physiologischen Balance ist demnach die Erklärung sowohl für Autoimmunität als auch für Toleranz gegenüber Tumoren. So kann z.B. eine transiente Lymphopenie (und damit Depletion von  $T_{reg}$ ) zu Organ-spezifischer Autoimmunität oder sogar zur Tumor-Abstoßung in experimentellen Mausmodellen führen. Weiterhin kann die

Depletion von  $T_{reg}$  im Mausmodell zu einer Amplifikation des immunprotektiven Effektes von Tumorstoffen führen (11,12). Parallel zu dieser Entwicklung wurde die Bedeutung des „angeborenen“ (innate) Immunsystems für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems immer deutlicher. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass effektive T-Zell-Aktivierung zwei wesentliche Voraussetzungen hat: 1) Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und MHC-Peptid-Komplex (Signal 1) und 2) Kostimulation durch Interaktion von CD28 und /oder CD40L auf der T-Zelle mit den entsprechenden Liganden CD80/CD86 bzw. CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (Signal 2) (13,14). Das „Zwei-Signal-Modell“ interpretiert spezifische Immunität vor dem Hintergrund der klonalen Selektionstheorie in erster Linie als Folge einer Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“. Die Differenzierung kommt dadurch zustande, dass die Antigenerkennung durch T-Zellen in zwei Schritte aufgeteilt wird: Zum einen die eigentliche Antigenerkennung durch klonale T-Zell-Rezeptoren, welche i.d.R nicht gegen „Selbst“ gerichtet sind, zum anderen die Erkennung des „Antigen-Präsentations-Kontextes“ durch Liganden auf Zellen des angeborenen Immunsystems. Im Rahmen dieses Modells sind Tumorzellen nicht immunogen, weil ihnen das zweite Signal fehlt. Autoantigene auf APC sind ebenfalls nicht immunogen weil die reaktiven T-Zellen vorher deletiert wurden. Für die Antigenpräsentation spielen APC, insbesondere Dendritische Zellen (DC), sowie das Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle. Nur reife, aktivierte DC können naive T-Zellen primen (15). In vivo wird dieser Prozess der DC-Reifung von zahlreichen Faktoren bestimmt. Wesentlichen Einfluss auf die DC-Reifung haben evolutionär stark konservierte molekulare Strukturen von Mikroben (und nekrotischen Zellen), welche von nicht-klonalen „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) auf APC erkannt werden. Diese molekulare Interaktion führt zur Reifung von DC, ein gutes Beispiel hierfür ist die Familie der „Toll-Like-Receptors“ (TLR)(16). Die Entdeckung der sog. „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMP) hat zur Entwicklung zahlreicher molekular definierter Adjuvantien für die Tumorstoffinierung geführt (17). PRR können auch durch bestimmte Moleküle auf Säugerzellen, insbesondere durch Stressproteine aktiviert werden (18).

Diese experimentellen Ergebnisse unterstützten die von P.Matzinger Anfang der 1990er Jahre postulierte „Danger Theory“, welche wesentliche Teile dieser o.g. experimentellen Ergebnisse antizipiert. Auch Autoimmunität findet hierdurch eine Erklärung. Der Danger-Theorie zufolge unterscheidet das Immunsystem nicht zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ sondern zwischen potenziell „gefährlichen“ und „harmlosen“ antigenen Stimuli (19). Antigene Stimuli, welche als „Gefahrensignal“ erkannt werden, führen über eine Aktivierung von DC

zur Induktion von T-Zell-Immunität. Dagegen können Antigene ohne ein solches „Gefahrensignal“ DC nicht ausreichend aktivieren, was eine tolerogene Antigenpräsentation zur Folge hat.

Sowohl die „Dominant Tolerance Theory“ als auch die „Danger Theory“ setzten neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Tumorstabilisierung in Gang, da sie eine Rationale dafür schafften, dass eine Vakzinierung nicht notwendigerweise gegen streng Tumor-spezifische Antigene, welche ausschließlich im Tumor exprimiert werden, sondern auch gegen Tumor-assoziierte Antigene sinnvoll ist. Anti-Tumor-Immunität kann demzufolge eben auch dadurch erreicht werden, dass ein Tumor-assoziiertes Antigen immunogen, d.h. im Kontext von „Gefahrensignalen“, präsentiert wird oder/und dass regulatorische Mechanismen inhibiert werden. Als „Gefahrensignale“ im Sinne von Matzingers Danger Theory werden heute insbesondere PAMP betrachtet, welche über PRR von APC erkannt werden, ein Beispiel hierfür ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), welches an TLR-9 auf APC bindet.

Während der letzten Jahre ist nun eine erneute Diskussion um die ursprünglich von Burnet entwickelte Immunosurveillance-Theorie aufgetreten, welche postuliert, dass das Immunsystem die Entstehung maligner Zellen überwacht bzw. verhindern kann (4,20). Die Immunosurveillance-Theorie war stets ein in hohem Maße kontrovers diskutiertes Konzept, weil sie sich experimentell und auch epidemiologisch nicht untermauern ließ. Während der letzten Jahre hat die Immunosurveillance-Theorie jedoch erneut Auftrieb bekommen, insbesondere durch experimentelle Daten aus Knock-out-Mausmodellen, in welchen wesentliche Effektormoleküle des Immunsystems fehlen (IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ R, Stat-1, Ja281, RAG-1, RAG-2, TCR, Pfp, FasL). In diesen Mausmodellen ist die Inzidenz spontaner oder chemisch induzierter Tumoren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht (Übersicht in 21). Das Konzept der Immunosurveillance wurde vom adaptiven sogar auf das angeborene Immunsystem ausgedehnt, da Tumorzellen Stressproteine exprimieren können, welche von PRR erkannt werden (22). All diese experimentellen Befunde haben trotz einiger Einwände gegen den artifiziellen Charakter solcher Mausmodelle in den letzten Jahren dazu geführt, dass der Frage, wie sich der Tumor einer möglichen Immunüberwachung entzieht, wieder besondere Beachtung geschenkt wurde. Insbesondere sind hier zwei, sich z.T. ergänzende bzw. überlappende theoretische Konzepte zu nennen: die Theorie des Immunoediting und der Tumor-induzierten Immunsuppression (23,24). Die Immunoediting-Theorie basiert auf der genetischen Instabilität von Tumoren und einer parallel bestehenden (natürlichen) Anti-Tumor-Immunität. Hieraus folgt für den Tumor ein Selektionsdruck in Richtung von schwach immunogenen Varianten (21). Immunoediting beinhaltet jedoch auch zusätzliche



Mechanismen wie Herunterregulation von Antigenexpression oder Antigen-Prozessierung/Präsentation sowie verstärkte Expression des proapoptotischen FasL-Moleküls in Tumoren. Einige dieser Veränderungen sind in der Tat mit maligner Progression assoziiert. Die Immunoediting-Theorie unterscheidet drei wesentliche Ergebnisse einer Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor: Elimination, Equilibrium und Escape. Bei immunogenen Tumoren und effektiver angeborener und/oder adaptiver Immunreaktion kommt es zur Elimination des Tumors, die Selektion von schwach immunogenen Tumorvarianten infolge genetischer Instabilität und immunologischem Selektionsdruck führt zum „Equilibrium“ mit Persistenz von Tumorzellen. Die komplette Inhibition von Immunreaktionen infolge von Interaktionen zwischen Tumor und Umgebung sowie Immunselektion führen zum „Escape“ mit Tumorprogression. (21,24,25). Die zum Escape führenden Mechanismen beruhen nach heutigem Verständnis aber nur teilweise auf Veränderungen der Tumorzelle selbst, zum anderen Teil auf aktiver Suppression einer Immunantwort durch den Tumor. Für dieses Konzept der Tumor-induzierten Immunsuppression spielen im Wesentlichen folgende Prozesse eine Rolle: funktionelle Beeinträchtigung von DC (26) sowie Induktion von  $T_{reg}$  (27) und myeloischen Suppressorzellen (28,29). Auch molekulare Veränderungen im Tumor können Immunsuppression induzieren, so führt z.B. eine Aktivierung des Stat-3-Gens nicht nur zu verstärktem Tumorzellwachstum sondern gleichzeitig zu einer Beeinträchtigung der Funktion von DC (30). Die Beobachtung, dass experimentelle Tumoren im Mausmodell den Effekt einer Vakzinierung mit Neoantigen inhibieren können, passt gut zum Konzept der Tumor-induzierten Immunsuppression (31).

Es ist anzunehmen, dass neben dem genauen Verständnis der Induktion von Immunität insbesondere auch die Aufklärung inhibitorischer regulatorischer Mechanismen sowie der Rolle des Tumorstromas neue Perspektiven für die Tumorummunologie eröffnen wird. Eine derartige Entwicklung befindet sich gerade erst in ihren Anfängen.

## **2.2 Strategien der Immuntherapie**

Es können zwei prinzipielle Formen der Immuntherapie unterschieden werden: passive Immuntherapie mit Antikörper oder Transfer von T-Zellen sowie aktive Immuntherapie in Form der therapeutischen Immunisierung (Vakzinierung).

Im letzten Jahrzehnt hat die Vakzinierung gegen Tumoren sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen erste ermutigende Ergebnisse erzielt (15,32-36).

Eine wichtige Voraussetzung für immuntherapeutische Strategien war die Charakterisierung von Tumor-assoziierten Antigenen als Zielstruktur einer möglichen Immunantwort. Molekularbiologische und immunologische Methoden haben zur Definition einer Vielzahl verschiedener Tumorantigene geführt (37). Weitere wichtige Voraussetzungen für die Tumorstimmung waren das Verständnis der Bedeutung einer MHC-restringierten T-Zell-Antwort bei der Abstoßung von Tumoren (38) sowie der Schlüsselrolle von Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen (DC) bei der Induktion einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort (15).

Grundlage der Induktion von MHC-restringierter T-Zell-Immunität ist die Präsentation von Peptidfragmenten in der Grube von MHC-Molekülen. Hierzu sind die meisten Zellen des Organismus und auch die meisten Tumorzellen befähigt: Ständig werden endogene Proteine zu kleinen 8 bis 12 Aminosäuren langen Peptidfragmenten prozessiert, welche dann im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Solche MHC-Peptid-Komplexe können vom T-Zell-Rezeptor (TCR) von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden. Die alleinige Interaktion zwischen dem TCR einer naiven T-Zelle, d. h. einer T-Zelle, welche vorher keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatte, und einem solchen MHC-Klasse-I-Peptidkomplex führt jedoch nicht zur T-Zell-Aktivierung. Ganz im Gegenteil kann durch eine solche Interaktion Peptid-spezifische Anergie induziert werden (39,40). Dieser Mechanismus kann physiologischerweise der Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber autologen Geweben dienen. Da Tumorzellen in der Regel MHC-I-Peptidkomplex an ihrer Oberfläche tragen, jedoch nicht die zur T-Zell-Aktivierung erforderlichen weiteren Signale aufweisen, kommt es i.d.R. nicht zur Aktivierung Tumor-spezifischer T-Zellen. Dies ist auch ein wesentlicher Grund für das Versagen einer Vakzinierung mit nicht modifizierten (Wildtyp-) Tumorzellen. Erst die Anwesenheit zusätzlicher Signale (Kostimulation über CD28-CD80/86, CD40-CD40L-Interaktion, Adhäsionsmoleküle, Zytokine u.a.) kann zur Aktivierung von T-Zellen gegenüber dem im MHC-Kontext präsentierten Peptid führen (41) (s. auch vorheriger Abschnitt).

Dendritische Zellen sind physiologischerweise in großer Dichte an äußeren und inneren Körperoberflächen lokalisiert, kommen aber auch im Interstitium von Geweben vor. Nach Aufnahme von Antigen sowie Aktivierung exprimieren sie als "reife" DC sowohl MHC- als auch kostimulatorische Moleküle auf sehr hohem Niveau und sind in der Lage, in regionale Lymphknoten einzuwandern. In der T-Zell-Zone der Lymphknoten können sie Antigen-spezifische naive T-Zellen gegen einen MHC-Peptid-Komplex aktivieren. Hierbei ist es jedoch essenziell, dass die DC selbst zuvor durch einen Maturationsstimulus zur terminalen

Ausreifung gebracht, d.h. selbst "aktiviert" wurde. Im nicht-aktivierten bzw. immaturren Zustand können selbst DC tolerogen wirken. Der Reifungsgrad resp. Aktivierungszustand der Antigen-präsentierenden DC entscheidet somit wesentlich über die Induktion von Immunität oder Toleranz. Entgegen anfänglichen Hypothesen ist es dabei weniger der spezifische DC-Subtyp (z.B. myeloisch vs. lymphatisch) sondern das spezifische „Microenvironment“, in dem die DC aktiviert wurde, welches über die Induktion von Immunität vs. Toleranz entscheidet (42). Einmal aktiviert, können T-Zellen dann unabhängig von weiterer Kostimulation Tumorzellen abtöten, welche den entsprechenden MHC-Peptid-Komplex an ihrer Oberfläche tragen. Neben MHC-I-Molekülen exprimieren DC auch MHC-II-Moleküle in hoher Dichte: diese dienen zur Präsentation von Peptiden aus phagozytierten, exogenen Proteinen. Diese im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Peptide führen zur Aktivierung von CD4+ T-Zellen, welche im Sinne einer „T-Zell-Hilfe“ die Antigen-spezifische CD8+ zytotoxische T-Zell-Antwort verstärkt. Die wichtige Rolle einer MHC-Klasse-II-restringierten T-Zell-Hilfe für eine effiziente CTL-Antwort ist experimentell ausreichend belegt (43).

Bei der Tumorstimmung können wiederum drei prinzipielle Strategien unterschieden werden (34-36):

- 1) Vakzinierung mit Tumorantigen in Form von Peptid, Protein oder Tumorlysat sowie als DNA oder rekombinante Virus-Vakzine
- 2) Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DC (Antigenbeladung mit Peptid, Protein, Tumorlysat oder durch Transfektion)
- 3) Vakzinierung mit (genetisch) modifizierten Tumorzellen

Die direkte Vakzinierung mit Tumorantigen zielt auf eine In-Vivo-Beladung von ortsständigen DC mit konsekutiver Induktion von spezifischer Immunität. Hierbei wird neben dem Tumorantigen in Form von Peptid, Protein oder Tumorlysat i.d.R. zusätzlich ein unspezifisches Immun-Adjuvans appliziert, welches die immunogene Präsentation des Antigens (Adjuvantien sind ein „Gefahrensignal“ im Sinne der Danger Theory von P. Matzinger) ermöglichen soll. Ein erfolgreiches Beispiel für eine Vakzinierung mit Tumorantigen (Lysat aus Tumorzellen) ist eine prospektiv randomisierte, adjuvante Vakzinierungsstudie beim Nierenzellkarzinom, welche einen Überlebensvorteil der vakzinierten Gruppe zeigt (44).

Im Falle der Vakzinierung mit DNA oder rekombinatem Virus haben die (fremde) DNA resp. das virale Vehikel selbst die Funktion eines Adjuvans.

Im Hinblick auf den klinischen Einsatz vereinigen sich in der DNA-Vakzinierung bei der direkten Injektion von Plasmid-DNA eine Reihe von günstigen Eigenschaften einer Vakzine – sowohl unter immunologischen Gesichtspunkten als auch unter dem Aspekt der Praktikabilität (s. 2.5) (Übersicht in 45,46).

Für die DNA-Vakzinierung konnte gezeigt werden, dass in vivo transfizierte DC eine Schlüsselrolle für die Induktion von T-Zell Immunität haben (47-49). Die Rolle weiterer Zellen wie Myozyten und Keratinozyten bei der Antigenpräsentation bzw. T-Zell-Aktivierung wird kontrovers diskutiert (45,46).

Vakzinierungen mit Tumorzellen wurden bereits vor mehr als 100 Jahren durchgeführt und sind bis in die letzten Jahre (meist in Kombination mit Adjuvans im Sinne einer unspezifischen Immunstimulation) Gegenstand klinischer Forschung geblieben. Mit wenigen Ausnahmen (Aktive Spezifische Immuntherapie beim Colon-Karzinom) (35,50,51) waren die Ergebnisse meist enttäuschend. Tumorzellen exprimieren in den meisten Fällen Tumorspezifische Peptide im Kontext von MHC-Klasse I-Molekülen, jedoch fehlt ihnen der immunogene Antigen-Präsentationskontext, d.h. eine Interaktion zwischen Tumorzelle und T-Zelle kann per se nicht zur Induktion von T-Zell-Immunität führen. Vakzinierungsstrategien beinhalten daher eine Modifikation der Tumorzelle mit dem Ziel, eine "immunogene" Präsentation von Tumorpeptiden zu erreichen. Hierzu werden meist Gene in die Tumorzelle eingeführt, welche für kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80) und/oder immunstimulatorische Zytokine kodieren (GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, Interferon u.a.) (Übersicht in 35,36,52,53). In ersten Phase-I-Studien konnte eine Tumor-spezifische T-Zell-Antwort durch solche Vakzine induziert werden, der klinische Erfolg ist bislang jedoch unbefriedigend, wobei hierbei zu bedenken ist, dass das meist weit fortgeschrittene Tumorstadium der Patienten in diesen Studien eine denkbar ungünstige Ausgangssituation für eine Vakzinierung bietet (54).

### ***2.3 Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) als Modell einer immunresponsiven Erkrankung***

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, bei ca. 95% der Patienten wird der maligne Zellklon durch eine Translokation 9:22 (q34.1;q11.21) („Philadelphia-Chromosom“) gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene entspricht dem Philadelphia-Chromosom (Ph) eine reziproke Translokation der abl-Tyrosinkinase auf Chromosom 9 in die „breakpoint cluster region“

(bcr) auf Chromosom 22. Das resultierende Genprodukt ist das chimärische Fusionsprotein bcr/abl, welches aufgrund seiner deregulierten Tyrosinkinase-Aktivität zentrale Bedeutung in der Pathogenese der CML hat (55,56). Nach wie vor stellt die allogene Blutstammzelltransplantation (SZT) die einzige gesicherte potenziell kurative Therapieoption dar (55). Die klinisch außerordentlich erfolgreiche Einführung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib Ende der neunziger Jahre kann aber als Meilenstein in der CML-Therapie betrachtet werden, der optimale Einsatz der allogenen SZT in der CML-Therapie musste infolgedessen neu definiert werden.

Der stärkste Hinweis auf die Existenz CML-spezifischer Immunmechanismen sind die höheren Rezidivraten bei der allogenen Blutstammzelltransplantation im Falle von syngener Zwillingstransplantation, T-Zell-Depletion des Transplantates oder maximaler Immunsuppression sowie die Korrelation zwischen Überleben und moderater GvHD bei der allogenen Stammzelltransplantation. Die Annahme, dass Immunabwehr bei der CML eine Rolle spielt, wird durch folgende Punkte gestützt: 1) Nachweis von zellulärer Immunität gegen Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHA) bei Patienten, welche eine Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) als Rezidivtherapie nach allogener Stammzelltransplantation erhalten haben, 2) präklinische und klinische Daten, welche eine T-Zell-Reaktivität gegenüber Leukämie-assoziierten Antigenen belegen, 3) Wirksamkeit der Therapie mit  $\alpha$ -Interferon, 4) Nachweis von humoraler Immunität gegen Leukämie-assoziierte Antigene und 5) epidemiologische Daten, welche die Expression bestimmter HLA-Klasse-I-Allele mit einer niedrigeren Inzidenz der CML korrelieren.

### ***2.3.1 Zelluläre Immunität/ Zielantigene bei der CML***

Der überzeugendste klinische Beweis für die Existenz von anti-leukämischer Immunität bei der CML und zugleich auch der bislang größte klinische Erfolg der zellulären Immuntherapie ist zweifellos die Donor-Lymphozyten-Infusion bei Rezidiven nach allogener Blutstammzelltransplantation (57). Zunächst war der immunologische Wirkmechanismus unklar, später wurden mHA als Zielantigene identifiziert. Immunität gegen mHA beruht auf Polymorphismen von Gewebe-spezifischen Peptidantigenen, welche im HLA-Kontext präsentiert werden. Immunität gegen mHA wie z.B. mHA-1 und mHA-2 ist mit Graft-versus-Host-Disease (GvHD), aber auch mit Graft-versus-Leukemia (GvL) assoziiert. Es kann angenommen werden, dass eine gegen mHA gerichtete T-Zell-Immunität in der Lage ist, die Rezidivrate zu senken (58,59). Da manche mHA präferenziell auf hämatopoetischen Zellen

exprimiert werden, ergibt sich theoretisch die Möglichkeit der Induktion von GvL ohne GvHD (60).

### ***Bcr/abl***

In den letzten Jahren konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass neben mHA auch andere Leukämie-spezifische oder Leukämie-assoziierte Antigene potenzielle Targetstrukturen für T-Zell-Immunität sind. T-Zell-Immunität gegen bcr/abl wurde bereits Anfang der neunziger Jahre beschrieben (61). Damit wurde klar, dass bcr/abl nicht nur unter zellbiologischen Aspekten eine interessante Targetstruktur darstellt. Bcr/abl ist von ursächlicher Bedeutung für die Leukämogenese. Die Fusionsregion der bcr/abl-Tyrosinkinase ist als Neoantigen Leukämie-spezifisch und bcr/abl-Verlustvarianten als immunologischer Escapemechanismus werden i.d.R nicht beobachtet, da dies mit dem Verlust des malignen Phänotyps einherginge (62). Bcr/abl hat somit Eigenschaften eines idealen Tumorantigens. Bei der CML findet man im Wesentlichen zwei unterschiedliche Spleißvarianten des bcr/abl-Gens, aus welchen im Wesentlichen zwei 210kD große Fusionsproteine resultieren: bcr2/abl2 und bcr3/abl2. Bocchia et al. identifizierten Peptide aus der Fusionsregion von bcr3/abl2, welche an HLA-A3, -A11 und -B8 binden und darüber hinaus in der Lage sind, in vitro bei gesunden Donoren zytotoxische T-Zellen (CTL) zu induzieren (63,64). Ein weiteres HLA-A2-bindendes bcr3/abl2-Peptid wurde wenig später beschrieben (65). Zunächst fehlte der Nachweis, dass diese CTL auch nicht-gepulste primäre CML-Zellen erkennen, so dass die Bedeutung von bcr/abl als abstoßungsrelevantes Antigen („rejection antigen“) sehr kontrovers beurteilt wurde und auch noch wird. In den letzten Jahren gibt es jedoch mehrere Hinweise darauf, dass bestimmte bcr3/abl2-Fusionspeptide auf der Oberfläche von CML-Zellen präsentiert werden und auch von spezifischen T-Zellen in vitro erkannt werden können (65-69). Die Bedeutung von bcr/abl-spezifischen T-Zellen in vivo ist jedoch weiterhin unklar.

### ***Andere Antigene (Proteinase-3, WT-1, abl/bcr)***

Weitere immunologisch relevante Antigene bei der CML sind der Gruppe der Tumor (Leukämie)-assoziierten Antigene zuzuordnen. Hierbei handelt es sich um Autoantigene, welche in der Leukämiezelle überexprimiert werden. Obwohl eine primäre Toleranz gegenüber diesen Antigenen angenommen werden muss, gibt es hinreichend Evidenz dafür, dass diese Toleranz gegenüber Tumorzellen unter bestimmten Umständen überwunden werden kann (70). Proteinase-3 (Pr-3) ist eine 26kD große Serin-Protease und wird physiologischerweise in der Granulopoese exprimiert. Bei systemischen Vaskulitiden spielen

Pr-3 und Myeloperoxidase eine wichtige Rolle als Autoantigene. Es wurden neben Autoantikörpern auch autoreaktive T-Zellen beschrieben. Bei CML-Patienten ist Pr-3 in etwa 75% der Fälle überexprimiert und stellt daher eine potenzielle Targetstruktur für die Immuntherapie dar (71-73). T-Zellen mit Spezifität für PR-1, ein HLA-A2-restringiertes Nonapeptid aus Pr-3, lassen sich bei CML-Patienten in Remission ex vivo expandieren und sind auch bei gesunden Probanden in sehr niedriger Frequenz nachweisbar (74,75). Mittels Tetramer-Färbung konnte bei CML-Patienten gezeigt werden, dass die Frequenz von PR-1-spezifischen T-Zellen mit anhaltender Remission unter  $\alpha$ -Interferon-Therapie und nach SZT positiv korreliert (76). Allerdings scheinen im T-Zell-Repertoire von neu diagnostizierten CML-Patienten hochaffine PR-1-spezifische T-Zellen deletiert zu sein, während diese in zytogenetischer Remission unter  $\alpha$ -Interferon nachgewiesen werden können. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Leukämie das T-Zell-Repertoire durch selektive Deletion hochaffiner T-Zellen formt (77).

Wilms-Tumor-Protein (WT-1) bildet ein weiteres potenzielles Target für die Immuntherapie und ist bei der CML überexprimiert. WT-1-spezifische CD8- (78,79) und CD4-T-Zellen (80), welche Leukämiezellen erkennen, wurden beschrieben.

Das reziproke Fusionsprodukt der t 9:22, das abl/bcr-Fusionsgen, fand lange Zeit wenig Beachtung, zumal dessen Expression auf Proteinebene nicht endgültig geklärt ist. Neuere experimentelle Daten haben nun jedoch nahegelegt, dass T-Zell-Immunität gegen HLA-Klasse-I- und -II-restringierte Peptide aus dem abl/bcr-Fusionsprotein klinische Bedeutung haben könnte (81).

### ***Vakzinierung***

Neben Peptiden sind insbesondere bei der CML autologe DC als Vakzine geeignet. Bei einer Vakzinierung mit DC ergibt sich für die CML eine Besonderheit: Da DC und Leukämiezelle von einer gemeinsamen bcr/abl-positiven Progenitorzelle abstammen, sind DC von CML-Patienten zu einem großen Teil nicht nur bcr/abl-positiv, sondern es ist anzunehmen, dass sie auch andere Leukämie-assoziierten Antigene konstitutiv exprimieren können. Solche DC sind in der Lage, in vitro Leukämie-spezifische zytotoxische T-Zellen zu induzieren (82,83).

DC können ex vivo sowohl aus CD34+ Stammzellen (84) als auch aus peripheren Monozyten (85) generiert werden. CD34+ Zellen werden in der Klinik mittels Leukapherese angereichert, es kann sich dann eine weitere Selektion durch immunomagnetische Methoden anschließen. Aus pragmatischen Gründen (Kosten, Durchführbarkeit) werden DC in der Klinik meist aus peripheren Monozyten generiert. Die Selektion der Monozyten aus Leukapheresat oder

peripherem Blut erfolgt durch Plastikadhärenz oder immunomagnetische Techniken. Während einer 4-6-tägigen Kultur in Medium mit GM-CSF und IL-4 differenzieren diese Zellen zu unreifen DC. Es folgt dann eine weitere Kultivierung unter Zusatz eines Reifungsstimulus, welcher den Phänotyp einer terminal reifen DC induziert. Als Maturationsstimulus werden TNF- $\alpha$ , Monocyte-conditioned Medium, CD40L oder auch ein Zytokin-Cocktail bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und Prostaglandin-E2 eingesetzt, wobei die Verfügbarkeit als "clinical grade" Präparation hier limitierend ist. Für präklinische Zwecke sind auch LPS und ds-RNA (poly I:C) potente Maturationsstimuli.

Erste ermutigende klinische Ergebnisse für DC-Vakzine liegen vor beim Non-Hodgkin-Lymphom, beim malignen Melanom, beim Prostata-Karzinom und beim Nierenzell-Karzinom (Übersicht in 33).

#### **2.4 Das Nierenzell-Karzinom (NCC)**

Bei den bösartigen Tumoren des Erwachsenen hat das Nierenzell-Karzinom einen Anteil von ca. 3%, wobei die Inzidenz angestiegen ist (86,87). Das NCC wird vorwiegend bei Patienten jenseits des 50. Lebensjahres diagnostiziert, wobei das männliche Geschlecht überwiegt (Männer:Frauen = ca. 1,5:1) (87). Histologisch wird in ca. 80-85% d.F. ein „klarzelliges“ Nierenzell-Karzinom diagnostiziert, die übrigen Fälle schließen papilläre und chromophobe NCC, Sammelrohr-Karzinome sowie unklassifizierbare Karzinome ein. Schlecht differenzierte Karzinome, in denen typische histologische Kriterien nicht klar erkennbar sind, werden oft als „sarkomatoid“ bezeichnet. Ein sarkomatoides Wachstumsmuster wird aber auch bei Anteilen der anderen histologischen Subtypen beobachtet (86). Patienten mit Von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom entwickeln häufig ein NCC und Studien dieser Tumoren haben wesentlich zum Verständnis der molekularen Pathogenese bei sporadischen NCC beigetragen: das VHL-Gen hat Tumor-Suppressorgen-Funktion und ist bei ca. 70% aller sporadischen Fälle mutiert. (86). Das VHL-Protein bildet normalerweise einen Komplex mit anderen Proteinen (Elongin-B und -C, Cullin-2). Bei normaler Sauerstoffkonzentration bindet dieser Komplex an eine Untereinheit von HIF (heat inducible factor) und wird im Proteasom abgebaut. Defekte im VHL-Protein oder Hypoxie verhindern den Abbau dieses VHL-Protein-Komplexes und es kommt zur Akkumulation von HIF-Protein und konsekutiv zu einer Überexpression von Hypoxie-induzierbaren Genen wie VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ).



Diese Faktoren binden an Rezeptoren auf Endothel und auf perivaskulären Zellen und führen im Ergebnis zu einer Verstärkung von Proliferation und Angiogenese. Tyrosinkinase haben eine zentrale Rolle in diesen Signalkaskaden, was die klinische Wirksamkeit neuer Multikinase-Inhibitoren wie Sorafenib und Sunitinib erklärt. (86-88). Auch die Wirksamkeit des Anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab, des EGFR (epidermal growth factor receptor)-Inhibitors Erlotinib und der mTOR(mammalian target of rapamycin)-Inhibitoren Temsirolimus (CCI-779) und Everolimus (RAD001) können über die Hemmung solcher Signalkaskaden erklärt werden.

#### **2.4.1 *In-Vivo-Amplifikation der Antigenpräsentation durch GM-CSF beim NCC***

Seit jeher gilt das NCC als „immunresponsiver“ Tumor. Hierzu haben einerseits die selten (<1%) auftretenden Spontanremissionen, andererseits die Wirksamkeit von Interleukin-2 (IL-2) und  $\alpha$ -Interferon ( $\alpha$ -IFN) beigetragen. In lokalisierten Stadien ist die Tumornephrektomie eine potenziell kurative Therapie (86). Im metastasierten Stadium hat die Therapie i.d.R. rein palliativen Charakter. Bis vor kurzem galt die Zytokintherapie mit IL-2 und/oder  $\alpha$ -IFN als Standardtherapie des metastasierten NCC (86). Die Rate an objektiven Remissionen (CR+PR) liegt mit diesen Therapien im Allgemeinen bei 10-20% (86). Negative prädiktive Faktoren im Hinblick auf ein Ansprechen unter Zytokintherapie sind: Karnofsky-Performance-Status < 80%, erhöhte LDH, Anämie, hohes Serum-Calcium und unterlassene Tumornephrektomie. Patienten ohne Risikofaktor haben ein medianes Überleben von 20 Monaten, Patienten mit 3 oder mehr Risikofaktoren von 4 Monaten (89).

Neben der direkten Aktivierung von zytotoxischen Effektorzellen durch T/NK-Zell-aktive Zytokine wie IL-2 und  $\alpha$ -IFN, stellt auch die Modifikation der Antigenpräsentation mit dem Ziel der Induktion einer Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort eine therapeutische Strategie dar. Antigen-präsentierende Zellen (APC) haben eine zentrale Funktion für die Induktion von MHC-restringierter Antigen-spezifischer Immunität (15). Verschiedene immuntherapeutische Ansätze zielen auf eine quantitative oder qualitative Modifikation von APC in vivo, um durch eine verstärkte Antigenpräsentation Tumormunität zu induzieren. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die In-Vivo-Applikation von Zytokinen zu nennen, welche Wachstums-/Differenzierungsfaktoren von APC sind: Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Fms-like tyrosine kinase-3 Ligand (Flt-3L). GM-CSF ist in vitro ein Wachstums-/Differenzierungsfaktor für humane und murine DC (84,85,90). In der Maus führt die intraperitoneale Applikation von GM-CSF zu einer Expansion von DC (91). Zusätzlich wurden für GM-CSF aber auch

verschiedene verstärkende Wirkungen auf humorale und zelluläre immunologische Effektormechanismen beschrieben (92-95). Durch diese Kombination von Effekten auf die Antigenpräsentation und Immuneffektorzellen war GM-CSF frühzeitig Bestandteil verschiedener immuntherapeutischer Ansätze. Insbesondere ist hier die Anwendung von GM-CSF-transfizierten Tumorzellen als Vakzine in präklinischen (96,97) und klinischen Modellen (98) zu nennen. GM-CSF wurde auch als rekombinantes Protein beim metastasierten Nierenzellkarzinom eingesetzt, zeigte dabei aber in der Monotherapie nur eine unbefriedigende Wirkung (99,100). Eine Kombination von GM-CSF und T-Zell-aktivierenden Zytokinen wie Interleukin-2 und  $\alpha$ -Interferon (beide für die Therapie des metastasierten NCC zugelassen) hatte aufgrund vorhandener Daten eine gute Rationale.

## **2.5 *Präklinische Modelle zur Modifikation der Antigenpräsentation in vivo: Koexpression von Flt-3L und CCL19(ELC) bei der DNA-Vakzinierung***

Für die DNA-Vakzinierung konnte gezeigt werden, dass in vivo transfizierte DC eine Schlüsselrolle für die Induktion von T-Zell Immunität haben (47-49). Die Rolle weiterer Zellen wie Myozyten und Keratinozyten wird kontrovers diskutiert (45).

Im Hinblick auf den klinischen Einsatz bei der Tumorstimmung ist die direkte Injektion von nackter DNA gegenüber dem Einsatz von Gen-modifizierten DC unter Gesichtspunkten der Praktikabilität von besonderem Vorteil (Übersicht in 45). Die Verwendung einer DNA-Vakzine umgeht die Zeit- und Kosten-intensive Ex-Vivo-Generierung von DC. Potenzielle Vorteile einer DNA-Vakzine gegenüber einer ex vivo generierten DC-Vakzine sind:

DNA-Vakzine 1) kodieren gleichzeitig mehrere MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-restringierte Epitope, 2) führen zu einer preferentiellen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation 3) sind nicht nur individuelle Vakzine, sie können als „universelle Vakzine“ bei verschiedenen Patienten über HLA-Barrieren hinaus Verwendung finden, 4) haben unter Sicherheitsaspekten Vorteile gegenüber viral transfizierten DC und 5) enthalten CpG Repeats, welche stark immunogen sind und als Adjuvans wirken. CpG-Repeats bestehen aus sich wiederholenden Dinukleotid-Sequenzen, in welchen Cytosin über eine Phosphodiester-Bindung mit Guanosin verknüpft ist. Bakterielle DNA enthält besonders viele solcher unmethylierter CpG-Sequenzen. Über eine Bindung von CpG an „Toll-like“ Rezeptoren (TLR)(bei der Maus insbesondere TLR9) auf APC wird Reifung und Zytokinfreisetzung ausgelöst, dadurch wirken CpG-Sequenzen immunogen (Übersicht in 45,46).

Obwohl DNA-Vakzine humorale und T-zelluläre Immunreaktionen induzieren können, ist die Wirksamkeit als Tumorstoffimpfung meist unbefriedigend. Mittels verschiedener Strategien wurde deshalb versucht, die Immunogenität von DNA-Vakzinen zu verbessern: 1) Koexpression von immunmodulatorischen Molekülen wie Zytokine, kostimulatorische Moleküle und Chemokine; 2) Steigerung der In-Vivo-Transfektion von DC über DC-assoziierte Oberflächenrezeptoren (DEC-205, Fc-R, Mannose-Rezeptor) und 3) Amplifikation der Anzahl von DC, welche DNA aufnehmen können, z.B. durch Flt-3L (101-103).

Flt-3 gehört zur Familie der Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinase. In normalem Knochenmark wird Flt-3L von frühen myeloischen und B-Progenitorzellen exprimiert. Flt-3L ist ein Typ-I-Transmembranprotein, welches von Knochenmarkstromazellen sowie von myeloischen und lymphatischen Zellen exprimiert wird (104). In der Maus sowie im Menschen induziert Flt-3L eine massive Expansion von lymphoiden und myeloischen DC (102,103). Aus diesem Grunde ist Flt-3L ein interessantes Zytokin für die Koapplikation mit einer Tumorstoffimpfung, z.B. im Rahmen der DNA-Vakzinierung.

Chemokine, welche in vivo über einen Konzentrationsgradienten zu einer lokalen Akkumulation von DC führen, kommen ebenfalls als potenzielle Adjuvantien für die DNA-Vakzinierung in Betracht. Hierbei sind insbesondere die CC-Chemokine Epstein-Barr-Virus-induced-molecule-1-ligand-chemokine (ELC/CCL19) und Secondary Lymphoid organ Chemokine (SLC/CCL21) zu nennen (Übersicht in 105).

CCL19(ELC) spielt neben CCL21(SLC) eine zentrale Rolle für die Interaktion von DC mit T-Zellen im Lymphknoten, dem Ort des „T-Zell-Priming“. Beide CC-Chemokine werden in der T-Zell-Zone von Lymphknoten, in der Milz und in den Peyerschen Plaques konstitutiv exprimiert (106-111). Der Rezeptor für CCL19 und CCL21 ist CCR7, welcher sowohl auf reifen DC als auch auf bestimmten T-Zell-Subpopulationen (naive und zentrale Memory-T-Zellen) exprimiert wird. Damit haben sowohl CCL19 als auch CCL21 wesentliche Bedeutung für die Induktion von primären und sekundären T-Zell-Antworten, was die Rationale für ihre Anwendung als Adjuvantien bei der Tumorstoffimpfung mit DNA bildet.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der hier zusammengefassten Arbeiten war die gezielte Manipulation der Antigenpräsentation zur Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort. Die Antigenpräsentation wurde einerseits *ex vivo* durch Applikation einer DC-Vakzine beeinflusst, andererseits zielte die In-Vivo-Applikation von Zytokinen/Chemokinen mit Wirkung auf Antigen-präsentierende Zellen auf eine direkte Manipulation der Antigenpräsentation.

Bei CML-Patienten wurde zunächst untersucht, ob im peripheren Blut T-Zellen nachgewiesen werden können, welche Leukämie-assoziierte Antigene spezifisch erkennen. Ferner wurde eine Methode für die „Large-scale“-GMP-Herstellung von DC aus Monozyten bei CML-Patienten etabliert und nachfolgend eine klinische Phase-I/II-Studie mit solchen DC durchgeführt. Mit dem Ziel einer Verbesserung der Funktion wurde mittels retroviralem Gentransfer eine genetische Modifikation von DC durchgeführt, speziell eine Transduktion mit Interleukin-7 zur Amplifikation der T-Zell-aktivierenden Eigenschaften von DC.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, Antigenpräsentation direkt *in vivo* zu beeinflussen, und zwar durch Applikation von Zytokinen oder Chemokinen, welche eine direkte Wirkung auf APC *in vivo* haben:

GM-CSF wurde zusammen mit IL-2 und  $\alpha$ -Interferon im Rahmen einer Phase-I-Studie beim metastasierten Nierenzellkarzinom eingesetzt, um die Antigenpräsentation zu verstärken.

In einem präklinischen Maus-Tumormodell zur DNA-Vakzinierung wurde der Effekt von Flt-3L und CCL19(ELC) auf die Induktion von Antigen-spezifischer Immunität und Tumorabstoßung untersucht. Ziel war eine verbesserte Funktion und Migration von APC und somit die Amplifikation der immunogenen Präsentation von Tumorantigenen.

#### 4.1 Anti-Leukämie-Immunität bei der Chronischen Myeloischen Leukämie

##### *Kommentar:*

Die verschiedenen Arbeiten in diesem Abschnitt haben folgende Zielsetzungen:

- 1) Nachweis von T-Zellen mit Spezifität für CML-assoziierte Antigene im Blut von CML-Patienten (4.1.1) sowie Detektion von bcr/abl-spezifischen T-Zellen im Blut von CML-Patienten und gesunden Donoren nach In-Vitro-Prästimulation (4.1.2).
- 2) GMP-Produktion und klinischer Einsatz von autologen bcr/abl+ DC als Vakzine bei Patienten mit CML in chronischer Phase (Phase-I/II-Studie) (4.1.3) sowie Prüfung des Einflusses einer Kryokonservierung auf Phänotyp und funktionelle Eigenschaften von DC im Hinblick auf die klinische Anwendung (4.1.4)
- 3) Genetische Modifikation von DC mit dem Ziel einer Verbesserung der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften. Es erfolgte eine retrovirale Transduktion von humanen DC mit Interleukin-7, zunächst bei DC von gesunden Donoren im Sinne eines „Proof of Principle“ (4.1.5) und dann von bcr/abl+ DC von CML-Patienten (4.1.6).

#### 4.1.1

*Simultane Zytokin-Analyse mittels Cytometric Bead Array (CBA) zum Nachweis Leukämie-reaktiver T-Zellen bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (2005)*

*Simultaneous cytokine analysis by Cytometric Bead Array (CBA) for the detection of Leukaemia-reactive T cells in patients with chronic myeloid leukemia.*

Westermann J, van Lessen A, Schlimper C, Baskaynak G, le Coutre P, Dörken B, Pezzutto A  
**Br J Haematol 132: 32-35**

#### **Zusammenfassung**

Ziel der Untersuchung war die Detektion von T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML), welche spezifisch Leukämie-assoziierte Antigene erkennen. Die T-Zell-Detektion erfolgte mit 1) einem neuen T-Zell-Assay (Cytometric Bead Array= CBA), 2)  $\gamma$ -Interferon Enzyme-linked Immunospot ( $\gamma$ -IFN-ELISpot) und 3) Tetramer-Färbung von CD8+ T-Zellen im peripheren Blut von CML-Patienten. Mittels CBA konnte bei einigen Patienten eine Peptid-spezifische Zytokin-Sekretion nachgewiesen werden, wohingegen  $\gamma$ -IFN-ELISpot und Tetramer-Färbung bei fast allen Patienten negativ waren. Die Peptid-spezifische Zytokinsekretion im CBA bestand in erster Linie aus Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , woraus sich Fragen zu den sezernierenden Effektorzellen und deren funktionellem Status ergeben. Die Untersuchungen zeigen, dass CML-spezifische T-Zellen im peripheren Blut von CML-Patienten unter Imatinib-Therapie nachweisbar sind, diese aber möglicherweise funktionell beeinträchtigt sind. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen, dass der CBA allgemein gut für die Detektion von Leukämie-reaktiven T-Zellen geeignet ist.

#### 4.1.2

##### *Erkennung von bcr/abl durch T-Zellen bei gesunden Spendern und bei Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (2004)*

##### *T cell recognition of bcr/abl in healthy donors and in patients with chronic myeloid leukaemia.*

Westermann J, Schlimper C, Richter G, Mohm J, Dörken B, Pezzutto A  
**Br J Haematol 125: 213-216**

#### **Zusammenfassung**

Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) deuten sowohl In vitro- also auch In-Vivo-Daten darauf hin, dass bestimmte Bcr/abl-Fusionspeptide in der Lage sind, eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen Leukämiezellen zu induzieren. Insbesondere Peptide aus der Bcr3/abl2-Fusionsregion, welche an HLA-A3 und HLA-B8 binden, scheinen eine Rolle für die anti-leukämische T-Zell-Immunität zu spielen. Die Fragestellung dieser Untersuchung war, ob Bcr3/abl2-spezifische T-Zellen im Blut von gesunden Donoren und CML-Patienten nach In-Vitro-Prästimulation detektiert werden können. T-Zell-Antworten wurden mittels  $\gamma$ -Interferon-ELISpot-Assay analysiert. PBMC (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Donoren und von CML-Patienten wurden mit CD3-Antikörpern und Interleukin-2 für 12 Tage in vitro prästimuliert, um den Anteil an CD8+ T-Zellen zu expandieren. Bei 6 von 14 gesunden Donoren und bei 2 von 5 CML-Patienten mit dem HLA-Merkmal A3 oder B8 konnten T-Zellen nachgewiesen werden, welche spezifisch die Bcr3/abl2-Fusionsregion erkennen. Die Spezifität der T-Zellantwort wurde durch Blockierungsexperimente mit HLA-Klasse-I-Antikörpern bestätigt. Interessanterweise bestand bei den beiden Patienten, in deren Blut Bcr3/abl2-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten, ein komplettes zytogenetisches Ansprechen unter Interferon-Therapie. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass T-Zell-Immunität gegen Bcr/abl klinisch relevant sein könnte. Eine Vakzinierung gegen Leukämie-assoziierte Antigene ist ein vielversprechender experimenteller Ansatz zur Postremissionstherapie bei CML, z. B. nach STI-571 (Imatinib).

### 4.1.3.

#### *Vakzinierung von CML-Patienten mit autologen, nicht-bestrahlten bcr/abl+ Dendritischen Zellen (2007)*

#### *Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia*

Westermann J, Kopp J, Hecker A, van Lessen A, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A

**Br J Haematol, in press**

#### **Zusammenfassung**

Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) stammen dendritische Zellen (DC) und Leukämiezellen von einer gemeinsamen Bcr/abl-positiven Progenitorzelle ab. Dies führt zur konstitutiven Expression von Leukämie-assoziierten Antigenen in diesen Bcr/abl-positiven DC. In dieser klinischen Phase-I/II-Studie wurden autologe DC als Vakzine bei Patienten mit bcr/abl-positiver CML in chronischer Phase eingesetzt. Die Patienten hatten unter einer Vortherapie mit  $\alpha$ -Interferon oder Imatinib kein adäquates zytogenetisches Ansprechen erreicht. Es wurden 10 Patienten eingeschlossen, DC wurden aus Monozyten generiert, die Vakzinierung bestand aus vier subkutanen Injektionen mit ansteigenden Zahlen an DC ( $1-50 \times 10^6$  Zellen pro Injektion) an den Tagen 1, 2, 8 und 21. Die Vakzinierung war gut durchführbar und sicher. Bei 4/10 Patienten stand eine Verbesserung des zytogenetischen Remissionsstatus (Bestimmung erfolgte durch FISH an PBMC) in möglichem Zusammenhang mit der Vakzinierung. Bei drei dieser Patienten konnten T-Zellen gegen Leukämie-assoziierte Antigene nachgewiesen werden. Bei allen auswertbaren Patienten kam es im Verlauf der Vakzinierung zu einem Anstieg der Proliferation von PBMC nach Stimulation mit autologen DC. Die Studie zeigt, dass eine Vakzinierung mit autologen, unbestrahlten „leukämischen“ DC durchführbar und sicher ist. Darüberhinaus kann die Vakzine bei einigen Patienten eine Leukämie-spezifische T-Zell-Antwort induzieren.

Die Vakzinierung mit DC ist ein interessanter Ansatz in der Postremissionstherapie der CML, z.B. nach Vorbehandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren.



#### 4.1.4

*Kryokonservierung von reifen, aus Monozyten generierten humanen Dendritischen Zellen für die Vakzinierung: Einfluss auf Phänotyp und funktionelle Eigenschaften (2003)*

*Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties*

Westermann J, Körner IJ, Kopp J, Kurz S, Zenke M, Dörken B, Pezzutto A  
**Cancer Immunol Immunother 52:194-198**

### **Zusammenfassung**

Im letzten Jahrzehnt hat es zunehmend experimentielle Evidenz dafür gegeben, dass Antigen-beladene dendritische Zellen (DC) in der Lage sind, eine gegen den Tumor gerichtete T-Zell-Antwort zu induzieren. Erste klinische Daten bei verschiedenen Tumorentitäten sind ermutigend, bei einzelnen Patienten konnten objektive Remissionen beobachtet werden. Da die GMP-konforme Produktion von DC für die klinische Anwendung ein äußerst Zeit- und Kosten-intensives Verfahren ist, stellt die Kryokonservierung eine wesentliche Vereinfachung dar. Gegenstand dieser Untersuchungen war die Frage, ob der Phänotyp oder die funktionellen Eigenschaften von DC durch Einfrieren und Auftauen verändert wird. DC von gesunden Donoren und von Patienten mit CML wurden nach Einfrieren/Auftauen auf deren Vitalität, Morphologie, Immunphänotyp (FACS-Profil), deren T-Zell-stimulierende Eigenschaften (mixed lymphocyte reaction = MLR) und deren Mobilität (Zeitraffer-Videomikroskopie) untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kryokonservierung bei DC keine wesentliche Änderung von Phänotyp oder funktionellen Eigenschaften verursacht, weder bei gesunden Donoren noch bei CML-Patienten. Die Daten zeigen, dass die Kryokonservierung von DC innerhalb von Immuntherapieprotokollen ein geeignetes Verfahren ist.

#### 4.1.5

##### ***Retroviraler IL-7-Gentransfer in humane Dendritische Zellen verstärkt die T-Zell-Aktivierung (1998)***

##### ***Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation***

Westermann J, Aicher A, Qin Z, Cayeux Z, Daemen K, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A

**Gene Therapy 5: 264-271**

#### **Zusammenfassung**

Tumorstimmung mit dendritischen Zellen (DC), welche Tumorentigene präsentieren, ist ein vielversprechender Ansatz in der Immuntherapie. Das Ziel dieser Studie war es, die T-Zell-stimulatorische Eigenschaft von humanen DC durch retrovirale Expression des Interleukin-7(IL-7)-Gens zu steigern. In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass IL-7 ein starkes Signal für die Proliferation von T-Zellen und die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) darstellt. DC wurden aus humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes hergestellt. Die DC wurden mit Licht- und Elektronenmikroskopie, Durchflusszytometrie und funktionellen Assays charakterisiert. Aufgrund dieser Kriterien waren 75 – 85 % der Zellen in der Zellkultur DC. Es konnte weder eine spontane IL-7-Produktion noch eine IL-7-Rezeptorexpression auf diesen Zellen nachgewiesen werden. Für die weiteren Experimente wurde ein retroviraler IL-7-Expressionsvektor hergestellt. Die retrovirale Infektion wurde entweder mit LXSNI-hIL-7 oder der Mock-Variante LXSNI durchgeführt. Durch LXSNI-hIL-7 konnte im Mittel eine IL-7-Produktion von 2296 pg/ 10<sup>6</sup> Zellen pro 24 Stunden erreicht werden. Die Transduktion der DC wurde mittels RT-PCR in einer CD1a-angereicherten Zellfraktion bestätigt. Die Transduktionseffizienz, welche mittels eines  $\beta$ -Galaktosidase-Kontroll-Virus bestimmt wurde, lag in der Größenordnung von 30 %. In der autologen mixed lymphocyte reaction (MLR) kam es bei Verwendung von IL-7-transduzierten DC als Stimulatorzellen zu einer Steigerung der T-Zellproliferation um einen Faktor 2 im Vergleich zu unmodifizierten oder Mock-transduzierten DC. In der allogenen MLR konnte die T-Zell-Proliferation um einen Faktor 2,7 gesteigert werden. Die Steigerung der T-Zell-Proliferation korrelierte mit der IL-7-Sekretion durch DC. Genetisch modifizierte, IL-7-produzierende DC, welche gleichzeitig Peptid-beladen sind, könnten zu einer Amplifikation der Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen führen.

#### 4.1.6

##### *Bcr/abl+ autologe Dendritische Zellen zur Vakzinierung bei Chronischer Myeloischer Leukämie (2000)*

##### *Bcr/abl+ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia*

Westermann J, Kopp J, Körner IJ, Richter G, Qin Z, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A  
**Bone Marrow Transplant 25: S46-49**

#### **Zusammenfassung**

Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) werden ex vivo generierte DC durch die konstitutive Expression von Bcr/abl oder möglicherweise auch anderen, bislang noch nicht definierten Leukämie-assoziierten Antigenen charakterisiert. Dies ist dadurch bedingt, dass DC und Leukämiezelle von einer gemeinsamen Progenitorzelle abstammen. In vitro wurde die Induktion einer gegen Leukämiezellen gerichteten T-Zell-Antwort durch solche DC beschrieben. Für eine Phase-I-Vakzinierungsstudie wurden autologe Bcr/abl-positive DC unter GMP-Bedingungen aus Monozyten von CML-Patienten in chronischer Phase generiert. Linien-Marker-negative, CD80+, CD86+, CD83+, HLA-DR+ DC konnten in ausreichender Anzahl für die Vakzinierung mit  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  DC generiert werden. Bei Verwendung von Monozyten als DC-Vorläuferzellen lag die Ausbeute an DC bezogen auf die Anzahl eingesetzter PBMC in der Größenordnung von 1 – 6 %. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die T-Zell-stimulierenden Eigenschaften von aus CD34+ Zellen generierten DC durch retrovirale Transduktion mit einem für Interleukin 7-kodierenden Gen um einen Faktor 2–3 gesteigert werden kann. DC-basierte Vakzinierungsstrategien sind ein vielversprechender klinischer Ansatz, insbesondere für die Postremissions-Immuntherapie nach autologer Stammzelltransplantation.

## 4.2 In-Vivo-Modifikation der Antigenpräsentation durch GM-CSF beim NCC

### 4.2.1

#### *Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor plus Interleukin-2 plus Interferon-alpha in der Behandlung des metastasierten Nierenzell-Karzinoms (2001)*

#### *Granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor plus interleukin-2 plus interferon-alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study.*

Westermann J, Reich G, Kopp J, Haus U, Dörken B, Pezzutto A

**Cancer Immunol Immunother 49: 613-620**

#### **Zusammenfassung**

Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) spielt eine zentrale Rolle bei Differenzierung und Funktion von Dendritischen Zellen (DC). DC sind wiederum eine wesentliche Voraussetzung für die Induktion von MHC-restringierten T-Zell-Antworten. Präklinische und erste klinische Daten bilden eine Rationale für die Applikation von GM-CSF bei der Immuntherapie von Krebserkrankungen. 10 Patienten mit Nierenzellkarzinom (NCC) im Stadium IV (Holland/ Robson) wurden in dieser Pilotstudie behandelt. Die Therapie wurde mit GM-CSF alleine begonnen (2 Wochen), IL-2 und  $\alpha$ -Interferon wurden sequentiell hinzugefügt (3 Wochen GM-CSF plus IL-2 oder  $\alpha$ -Interferon, 3 Wochen GM-CSF plus IL-2 plus  $\alpha$ -Interferon). Die Therapie wurde ambulant durchgeführt. Klinische Verträglichkeit, klinisches Ansprechen sowie die immunmodulatorischen Effekte der Zytokintherapie (FACS-Analyse von PBMC, mixed lymphocyte reaction (MLR) und Zytotoxizitäts-Assays an PBMC) wurden untersucht. Die GM-CSF-Behandlung verursachte einen signifikanten Anstieg von PBMC mit Expression kostimulatorischer Moleküle. Zusätzliche Gabe von IL-2 und  $\alpha$ -Interferon führte zu einem Anstieg von CD3+, CD4+, CD8+ und CD56+ PBMC in Woche 9. In der autologen MLR konnte ein 2,1-facher Anstieg der T-Zell-Proliferation nach 2 Wochen GM-CSF-Behandlung beobachtet werden. Die Zytotoxizitäts-Assays zeigten Veränderungen in der NK- und Non-NK-vermittelten Zytotoxizität bei einzelnen Patienten. 2 Patienten erreichten eine partielle Remission (PR), ein Patient hatte eine „mixed response“ (MR). Die Toxizität des Therapieschemas war gering bis moderat: Fieber, grippeartige Symptome und Übelkeit wurde bei den meisten Patienten beobachtet. Schwere Organtoxizität trat nicht auf. Diese Daten erlauben die Schlußfolgerung, dass GM-CSF für die Immuntherapie des NCC geeignet sein könnte, insbesondere in Kombination mit T-Zell-aktivierenden Zytokinen. Diesbezüglich sind jedoch weitere klinische Studien erforderlich.

**Kommentar:** Eine Nachfolgestudie (unpublizierte Daten) sowie die aktuelle Literatur zum Thema legen nahe, dass der Einsatz von GM-CSF beim NCC nicht zu einer Verbesserung der mit IL-2/ $\alpha$ -IFN erzielten klinischen Ergebnisse führt.

### 4.3 In-Vivo-Modifikation der Antigenpräsentation im Mausmodell durch Flt-3L und CCL19(ELC)

#### 4.3.1

*Flt-3L als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung führt zur Verstärkung der Immunantwort, jedoch nicht zur Veränderung der TH-1/TH-2-Polarisierung (2004)*

*Flt-3 ligand as adjuvant for DNA vaccination augments immune responses but does not skew TH-1/TH-2 polarization.*

Westermann J, Nguyen-Hoai T, Mollweide A, Richter G, Schmetzer O, Kim HJ, Blankenstein T, Dörken B, Pezzutto A

**Gene Therapy 11: 1048-1056**

#### Zusammenfassung

Die Transduktion von Dendritischen Zellen (DC) ist von zentraler Bedeutung für die DNA-Vakzinierung. Die In-Vivo-Expansion von DC stellt eine Möglichkeit dar, die Effizienz einer DNA-Vakzine zu steigern. Gegenstand dieser Untersuchungen war die Frage, ob FMS-like-tyrosine-kinase-3-ligand (Flt-3L), ein Wachstumsfaktor für DC, als Adjuvans für die DNA-Vakzinierung geeignet ist. In C57BL/6-Mäusen wurde  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) als Modellantigen verwendet. Die Mäuse wurden intramuskulär mit  $\beta$ -Gal-kodierender DNA mit oder ohne zusätzliche Applikation von Flt-3L immunisiert. In beiden Fällen konnten nach der Vakzinierung Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu DNA alleine führte die zusätzliche Gabe von Flt-3L zu einer signifikanten Zunahme der Antigen-spezifischen proliferativen Immunantwort. Eine Steigerung der zytotoxischen T-Zell-Antwort konnte jedoch nicht beobachtet werden. Splenozyten immunisierter Mäuse zeigten nach In-Vitro-Prästimulation mit Antigen ein TH-2-Zytokinsekretionsprofil. Die humorale Immunantwort gegen  $\beta$ -Gal bestand präferenziell aus IgG1-Antikörpern. Die Untersuchung von DC, welche durch Flt-3L-Behandlung induziert worden waren, ergab einen unreifen Phänotyp mit schwacher Expression bzw. Negativität von CD80, CD86 und CD40. Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass Flt-3L nicht generell zu einer TH-1-Polarisierung der Immunantwort führt. Viel wahrscheinlicher wird die TH-Polarisierung der Immunantwort durch Faktoren bestimmt, welche mit dem Antigen und/oder der Art der Vakzinierung selbst zusammenhängen. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen, wie in unseren Untersuchungen, kann Flt-3L sogar zur Suppression von TH-1-T-Zell-Immunität führen, möglicherweise bedingt durch die Expansion von unreifen/unaktivierten DC.

### 4.3.2

***CCL19 (ELC) als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung: Induktion einer TH-1-T-Zell-Antwort und Verstärkung der Anti-Tumor-Immunität (2007)***

***CCL19(ELC) as adjuvant for DNA vaccination: Induction of a TH-1-type T cell response and enhancement of antitumor immunity.***

Westermann J, Nguyen-Hoai T, Höpken UE, Lipp M, Dörken B, Pezzutto A  
**Cancer Gene Therapy, in press**

### **Zusammenfassung**

Die Koexpression von Tumorantigenen und immunmodulatorischen Molekülen stellt eine Strategie für die DNA-Vakzinierung dar, welche auf die Amplifikation einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort zielt. Epstein-Barr-Virus-Induced-Molecule-1-Ligand-Chemokine (ELC/CCL-19) ist ein CC-Chemokin, welches an den Chemokin-Rezeptor CCR-7 bindet. CCR-7 wird auf reifen DC und bestimmte T- und B-Zell-Subpopulationen exprimiert. CCL19(ELC) wird hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen exprimiert und hat eine zentrale Bedeutung für die Regulation von Interaktionen zwischen DC und T-Zellen. Fragestellung dieser Arbeit war, ob CCL19 die Immunogenität einer DNA-Vakzine in einem C57BL/6-Mausmodell mit syngenem MCA-205( $\beta$ -Gal)-Tumoren steigern kann. Die Mäuse wurden zweimal intramuskulär an den Tagen 1 und 15 immunisiert, ein Tumor-Challenge erfolgte dann subkutan an Tag 25. Koapplikation von pDNA( $\beta$ -gal) plus pDNA(CCL19) wurde mit pDNA( $\beta$ -gal), Mock-Vektor und PBS alleine verglichen. Die Koexpression von CCL19 führte zur Verstärkung einer TH-1-polarisierten Immunantwort mit wesentlicher Verbesserung des Tumor-protectiven Effektes der DNA-Vakzine. Immunhistochemische Färbungen zeigten eine verstärkte CD8+T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe der Mäuse, welche mit pDNA( $\beta$ -Gal) plus pDNA(CCL19) immunisiert worden waren. Die Untersuchungen zeigen, dass CCL19 ein interessantes Adjuvans für die DNA-Vakzinierung ist. CCL19 führt zu einer Amplifikation der Anti-Tumor-Immunität, wobei dieser Effekt zumindest partiell durch eine vermehrte Rekrutierung von CD8+T-Zellen bedingt zu sein scheint.

## 5. Diskussion

### 5.1 *Anti-Leukämie Immunität bei der Chronischen Myeloischen Leukämie*

Zahlreiche präklinische und klinische Studien haben während der letzten 10-15 Jahre zu der Auffassung geführt, dass Immunabwehr bei der CML eine Rolle spielt (Übersicht in 112). Neben einer der klinischen Wirksamkeit der Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) zugrunde liegenden T-Zell-Antwort gegenüber Minor-HLA-Antigenen (mHLA) wurden von zahlreichen Gruppen auch autologe Leukämie-assoziierte Antigen wie bcr/abl, Proteinase-3 und WT-1 als potenzielles Target einer Immunantwort beschrieben. Die Möglichkeit einer Induktion oder auch Amplifikation solcher Leukämie-reaktiven T-Zellen bildet die Grundvoraussetzung für die Vakzinierung bei CML. Darum wurde zunächst untersucht, ob Leukämie-reaktive T-Zellen im Blut von CML-Patienten nachweisbar sind.

#### 5.1.1 *Nachweis von T-Zellen gegen Leukämie-assoziierte Antigene im Blut von CML-Patienten*

Unsere Ergebnisse (4.1.1) zeigen, dass Leukämie-reaktive T-Zellen mittels  $\gamma$ -IFN-ELISpot nur äußerst selten im Blut von CML-Patienten unter Imatinib-Therapie nachzuweisen sind: nur bei 1/11 Patienten konnte eine schwache T-Zell-Antwort gegen ein HLA-A2-restringiertes Peptid aus Proteinase-3 detektiert werden. Gegen andere Antigene wie bcr/abl, c-abl und SOCS-2 gerichtete T-Zellen konnten mittels  $\gamma$ -IFN-ELISpot bei keinem der untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten T-Zellen gegen CML-assoziierte Antigene bei einigen Patienten mittels Cytometric Bead Array (CBA) nachgewiesen werden. Hierbei waren es insbesondere die Peptide VLQELNVTV (Proteinase-3, 3/11 Patienten), VLLYMATQI (c-abl, 3/11 Patienten) und YLEEYKFQV (SOCS-2, 4/11 Patienten), welche im CBA als immunogen identifiziert werden konnten. Die Peptide VLLYMATQI und YLEEYKFQV wurden durch uns erstmals als potenzielle T-Zell-Epitope beschrieben. Auffällig war jedoch das im CBA gemessene Zytokin-Profil der Leukämie-reaktiven T-Zellen: die stärkste Peptid-spezifische Zytokinsekretion wurde für TNF- $\alpha$  beobachtet, während  $\gamma$ -IFN nur in Einzelfällen sezerniert wurde. Im Falle von bcr/abl konnte trotz fehlender  $\gamma$ -IFN-Produktion bei zwei Patienten mittels Tetramer-Färbung der Nachweis erbracht werden, dass HLA-B8-restringierte bcr3/abl2-spezifische T-Zellen im Blut vorkommen, wenn auch in sehr niedriger Frequenz. Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass

Leukämie-spezifische T-Zellen im T-Zell-Repertoire von CML-Patienten vorkommen, dass ihre Frequenz jedoch sehr gering ist und dass die T-Zellen offensichtlich zum Teil funktionell alteriert sind und kein klassisches TH-1-oder TH-2-Zytokin-Sekretionsprofil aufweisen. Insbesondere die dominante TNF- $\alpha$ -Sekretion bei fehlender  $\gamma$ -IFN-Produktion kann als Hinweis auf eine funktionelle Alteration gewertet werden, ursächlich kommen hier verschiedene Mechanismen in Betracht. Die niedrige Frequenz wird sehr gut durch selektive Deletion erklärt, welche insbesondere für hoch-affine T-Zellen gegen PR-1, ein Peptid aus Proteinase-3, bei CML-Patienten beschrieben wurde (77). Eine Erklärung des TNF- $\alpha$ -dominierten Zytokinprofils der CML-reaktiven T-Zellen muss aufgrund der vorhandenen Daten rein hypothetisch bleiben. Das aberrante Zytokinprofil könnte einerseits Ausdruck einer (partiellen) Anergie der T-Zelle sein, z.B. als Folge einer „tolerogenen“ Antigenpräsentation durch Leukämiezellen wie dies für leukämische Blasten bei AML beschrieben wurde (113). Ferner muss diskutiert werden, dass das veränderte Zytokinprofil Folge einer funktionellen Alteration der T-Zelle durch Imatinib sein könnte. Tatsächlich sind inhibitorische Wirkungen von Imatinib auf Immuneffektorzellen beschrieben (114-116), allerdings sprechen andere Studien dafür, dass Imatinib zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der T-Zell-Immunität führt (117-119). Weiterhin könnte das aberrante Zytokinsekretionsprofil ein spezifisches Merkmal bei CML-Patienten sein. Ähnliche Beobachtungen bei der AML (Leukämie-spezifische T-Zellen mit dominanter TNF- $\alpha$ - und fehlender  $\gamma$ -IFN-Sekretion) (120) sprechen jedoch gegen einen Imatinib-induzierten Effekt als auch gegen ein CML-spezifisches Phänomen. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass der CBA neben anderen funktionellen und strukturellen T-Zell-Assays einen klaren Stellenwert bei der Detektion Tumorspezifischer T-Zellen hat. Insbesondere die simultane Bestimmung mehrerer Zytokine ermöglicht es, Antigen-spezifische T-Zellen nachzuweisen, auch wenn diese aufgrund ihrer niedrigen Frequenz und/oder eines aberranten Zytokin-Sekretionsprofils mit anderen Assays wie z.B. der Tetramer-Färbung oder dem  $\gamma$ -IFN-ELISpot nicht detektiert werden können. Darum kann der CBA auch für die Charakterisierung Tumorspezifischer T-Zell-Epitope hilfreich sein.

Unsere Daten zeigen weiterhin (4.1.2), dass  $\gamma$ -IFN-sezernierende bcr/abl-spezifische T-Zellen nach In-Vitro-Stimulation von PBMC bei CML-Patienten nachgewiesen werden können. Hierzu wurden PBMC von CML-Patienten mit CD3-Antikörper und IL-2 in vitro vorstimuliert und dann mit Peptid-gepulsten maturierten autologen DC als Stimulatorzellen im  $\gamma$ -IFN-ELISpot-Assay untersucht. Die Prästimulation führte zu einer Expansion von T-Zellen, nach 12 Tagen bestand die Zellkultur zu mehr als 90% aus T-Zellen. Bei 2/5 CML-



Patienten in chronischer Phase unter Therapie mit  $\alpha$ -Interferon konnten HLA-A3-restringierte bcr3/abl2-spezifische T-Zellen detektiert werden. Interessanterweise waren beide Patienten in kompletter zytogenetischer Remission, während die 3 Patienten ohne Nachweis von bcr/abl-spezifischen T-Zellen keine Zeichen eines zytogenetischen Ansprechens hatten. Obwohl diese Daten eine Korrelation zwischen zytogenetischem Ansprechen und Immunantwort nahe legen, ist zu bedenken, dass die Immunantwort bei Patienten mit komplettem zytogenetischen Ansprechen durchaus auch nur Ausdruck einer allgemeinen Verbesserung von T-Zell-Immunität nach kompletter Remission der Leukämie sein könnten. Guarini et al. (121) haben eine solche allgemeine Verbesserung von Immunantworten bei CML-Patienten beschrieben. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten bcr/abl-spezifische T-Zellen nach In-Vitro-Prästimulation auch bei 6/14 HLA-A3- und -B8-positiven gesunden Donoren nachgewiesen werden. Die MHC-I-Restriktion der T-Zell-Antwort wurde durch Blockierungsexperimente mit MHC-Klasse-I-Antikörpern bestätigt. Diese Daten lassen unterschiedliche Interpretationen zu: Der Nachweis von bcr/abl-spezifischen T-Zellen könnte als In-Vitro-Phänomen gedeutet werden, welches durch In-Vitro-Priming von naiven T-Zellen während der Prozedur zu erklären ist. Dies erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, weil eine Stimulation von T-Zellen mit CD3-Antikörpern und IL-2 i.d.R. nicht ausreicht, um naive T-Zellen zu primen und weil die Inkubationszeit mit Peptid-gepulsten DC im ELISpot-Assay für ein In-Vitro-Priming zu kurz ist. Jedenfalls beweisen unsere Ergebnisse, dass bcr/abl-spezifische T-Zellen im T-Zell-Repertoire von CML-Patienten enthalten sind. Eine weitere mögliche Erklärung der Ergebnisse nach In-Vitro-Prästimulation wäre eine Reaktivierung von zuvor funktionell defekten T-Zellen durch die Stimulation oder auch lediglich eine Anhebung der relativen Frequenz von spezifischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen über das untere Detektionslimit als Folge der Prästimulation mit Expansion von T-Zellen. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass T-Zellen mit Spezifität für bcr/abl sowohl bei Gesunden als auch bei CML-Patienten vorkommen. Dieses Ergebnis wurde auch durch andere Untersuchungen bestätigt (122). In diesem Zusammenhang sind PCR-Daten zweier unterschiedlicher Gruppen interessant, welche nahe legen, dass die Bcr/abl-Translokation auch bei Gesunden häufiger ist als bisher angenommen wurde (123,124): Bei gesunden Erwachsenen bestand eine positive Korrelation zwischen Lebensalter und Häufigkeit eines (passageren) Nachweises von bcr/abl mittels PCR. Diese Daten können so interpretiert werden, dass die Bcr/abl-Translokation Ausdruck einer allgemeinen genetischen Instabilität ist, welche physiologischerweise durch molekularbiologische und möglicherweise auch immunologische Mechanismen kontrolliert wird. Unter diesem Aspekt wäre die Entwicklung einer CML zumindest teilweise als Folge

eines Versagens dieser physiologischen Kontrollmechanismen zu betrachten. Auch die epidemiologischen Daten von Posthuma et al. (125), welche eine deutliche Reduktion der CML-Inzidenz bei Koexpression der HLA-Merkmale A3 und B8 zeigen, unterstützen die Hypothese, dass anti-leukämische Immunität klinische Bedeutung hat, denn HLA-A3 und -B8 sind genau die HLA-Moleküle, welche Peptide aus der bcr3/abl2-Fusionsregion immunogen präsentieren können (64). Auch unsere Ergebnisse sprechen für eine Korrelation zwischen zytogenetischem Ansprechen und Leukämie-spezifischer T-Zell-Antwort wie sie für Proteinase-3 bei CML-Patienten gezeigt werden konnte (76). Dennoch bleibt diese Interpretation aufgrund der vorliegenden Daten hypothetisch, eine Verifizierung muss innerhalb einer größeren Kohorte von CML-Patienten erfolgen.

### **5.1.2 Vakzinierung mit autologen bcr/abl+ DC bei CML**

Unsere Phase-I/II-Vakzinierungsstudie bei CML-Patienten in chronischer Phase unter Therapie mit  $\alpha$ -Interferon oder Imatinib zeigt, dass eine subkutane Immunisierung mit autologen, nicht-bestrahlten „leukämischen“ DC durchführbar und sicher ist (4.1.3). Eine „large scale“ GMP-Produktion einer ausreichenden Anzahl an funktionellen DC war bei allen Patienten möglich. Dies zeigt, dass unser Protokoll auch für größere Phase-III-Studien geeignet ist. Unsere Studie ist die erste DC-Vakzinierungsstudie bei CML, in welcher bis zu  $50 \times 10^6$  unbestrahlte reife bcr/abl+ DC pro Vakzinierung subkutan injiziert wurden. Delayed Type Hypersensitivity (DTH)-Reaktionen der Haut gegenüber den KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)-gepulsten DC sowie eine nach Vakzinierung zunehmende Proliferation von PBMC nach Stimulation mit autologen bcr/abl+ DC zeigen, dass die DC-Vakzine immunogen ist. Die CML-Spezifität der Immunantwort kann aus diesen Daten jedoch nicht abgeleitet werden, da die DTH-Reaktionen wesentlich durch KLH getriggert waren und die ansteigende Proliferation von PBMC nach Stimulation mit autologen bcr/abl+ DC nicht notwendigerweise CML-spezifisch ist, sondern gegen jedes von den DC präsentierte Antigen gerichtet sein kann. Eine Analyse der T-Zell-Antwort gegenüber CML-assoziierten Antigenen (bcr/abl, abl/bcr, proteinase-3 and WT-1) konnte nicht bei allen Patienten durchgeführt werden, da passende Peptide nicht für alle HLA-Haplotypen verfügbar sind. T-Zell-Antworten gegen CML-assoziierte Antigene konnten jedoch bei drei Patienten detektiert werden, bei denen vor der Vakzinierung keine CML-spezifischen T-Zellen nachweisbar waren. Die T-Zellen waren gegen Proteinase-3, bcr3/abl2 und abl/bcr gerichtet. T-zelluläre Immunantworten gegen die Fusionsregion von bcr3/abl2 wurden von mehreren Gruppen beschrieben (65,75,122,126). T-

Zellen mit Spezifität für abl/bcr wurden von Wagner et al. (81) beschrieben, jedoch wird die Expression von abl/bcr auf Proteinniveau kontrovers diskutiert (127). Bei Untersuchung mittels CBA zeigten die CML-spezifischen T-Zellen nur zum Teil ein klares TH-1/TH-2-Zytokinprofil. Wie bereits bei nicht vakzinierten CML-Patienten beschrieben (s. vorheriger Abschnitt), fand sich insbesondere bei einem der drei Patienten im CBA eine dominante TNF- $\alpha$ -Sekretion, welche die negativen Ergebnisse im  $\gamma$ -IFN-ELISpot-Assay erklärt. Antigen-spezifische T-Zellen mit verminderter  $\gamma$ -IFN-Produktion wurden bei CML-Patienten auch von Gannagé et al. (126) beschrieben. Sowohl unsere Daten als auch die von Gannagé et al. zeigen jedoch, dass eine Reaktivierung mit konsekutiver Sekretion von  $\gamma$ -IFN möglich ist, so dass eine Interpretation im Sinne eines reversiblen funktionellen Defektes, z.B. in Folge einer nicht immunogenen Antigenpräsentation durch Leukämiezellen, eine plausible Arbeitshypothese darstellt.

In unserer Studie kam es bei 4/10 Patienten zu einer Verbesserung des zytogenetischen Remissionsstatus, welche nicht durch Veränderungen in der anti-leukämischen Begleitmedikation erklärt werden konnte. Bei drei dieser Patienten wurden durch die Vakzinierung T-Zellen gegen CML-assoziierte Peptide induziert. Diese Daten legen einen Zusammenhang zwischen Immunantwort und zytogenetischem Ansprechen nahe, jedoch kann diese Korrelation aufgrund der geringen Patientenzahl und der fehlenden Randomisierung nicht bewiesen werden. Unsere Daten zeigen, dass die Immunantwort offensichtlich langsam über einen Zeitraum von drei Monaten nach Vakzinierung entsteht und nach dieser Zeit wieder langsam abfällt. Unter dem Aspekt der klinischen Wirksamkeit war die Dauer der Vakzinierung in unserer Phase-I/II-Studie wahrscheinlich viel zu kurz, um die entstandene Immunantwort aufrechtzuerhalten. Eine längere Vakzinierung wurde nicht durchgeführt, da es sich um eine frühe klinische Prüfung der Phase I/II handelte. In der Zukunft sollten darum wiederholte Vakzinierungen über einen deutlich längeren Zeitraum durchgeführt werden. Unsere Studie liefert die Basis und die Rationale für ein solches Vorgehen.

Bei den publizierten CML-Vakzinierungsstudien der letzten Jahre war meist bcr/abl das Targetantigen. Insbesondere wurden bcr/abl-spezifische CD4+T-Zell-Antworten in zwei Phase-I/II-Studien mit HLA-Klasse-I- und -II-Peptiden aus der Bcr/abl-Fusionsregion und QS-21 als Adjuvans beschrieben. Ein eindeutiger klinischer Effekt konnte in diesen Studien nicht beobachtet werden (128,129). In einer kürzlich publizierten Studie mit einer Bcr/abl-Multi-peptid-Vakzine und GM-CSF und QS-21 als Adjuvantien konnte hingegen eine Verbesserung des zytogenetischen und/oder molekularen Ansprechens in Zusammenhang mit einer bcr/abl-spezifischen CD4+T-Zell-Antwort bei einem Teil der Patienten dokumentiert

werden (117). In diese Studie wurden CML-Patienten unter Imatinib-Therapie mit stabiler residueller zytogenetischer/molekularer Erkrankung aufgenommen. Drei andere sehr kleine Studien führten bis zu vier Vakzinierungen mit DC bei CML-Patienten in chronischer oder akzelerierter Phase durch. Bei einzelnen dieser Patienten fand sich eine Immunantwort, ein eindeutiges hämatologisches Ansprechen konnte jedoch nicht erreicht werden (130-132). In der Studie von Litzow et al. zeigte sich allerdings auch ein Trend zu einer Abnahme von bcr/abl+ PBMC in der FISH-Analyse. In den genannten Studien wurde eine DC-Dosis im Bereich von  $0,5-80 \times 10^6$  Zellen pro Vakzinierung eingesetzt. Der Applikationsweg war intradermal, subkutan, intravenös oder intranodal (regionale Lymphknoten). Die Vakzinierungsperiode war ebenfalls sehr kurz. Bislang wurde eine Vakzinierung nur bei CML-Patienten durchgeführt, welche auf eine vorangegangene Therapie gar nicht oder nur unzureichend angesprochen hatten. Darum ist in diesen Studien einschließlich unserer eigenen eine Selektion von biologisch therapieresistenten und darum besonders ungünstigen Krankheitsverläufen anzunehmen. Die Immunisierung von Patienten, welche auf eine zytoreduktive Therapie, z.B. mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, angesprochen haben und nur noch eine (zytogenetische oder molekulare) minimale Resterkrankung aufweisen, ist ein vielversprechender Ansatz für die Zukunft (117). DC-Vakzine bieten dabei einen konzeptuellen Vorteil gegenüber Peptid/Protein-Vakzinen: DC von CML-Patienten können konstitutiv ein breites Spektrum von CML-assoziierten Antigenen exprimieren und sind zumindest in vitro in der Lage, eine anti-leukämische T-Zell-Antwort zu induzieren (82,83). In unserer Studie zeigt jedoch der niedrige Anteil von bcr/abl+ DC bei Patienten, welche auf Imatinib angesprochen haben, dass bei Patienten mit komplettem zytogenetischem Ansprechen unter Imatinib im Falle einer Vakzinierung mit autologen DC eine zusätzliche Beladung mit Peptiden erforderlich ist, um eine ausreichende Antigenpräsentation zu gewährleisten. Die Verwendung von Peptiden verschiedener Antigene scheint insbesondere darum vorteilhaft, weil es Hinweise darauf gibt, dass bcr/abl bei der CML kein immundominantes Antigen ist (133). Wie bereits dargestellt, wird die Wirkung von Imatinib auf Immuneffektorzellen kontrovers diskutiert, neue klinische Daten legen jedoch nahe, dass eine klinisch relevante Inhibition der T-Zell-Funktion durch Imatinib zumindest wenig wahrscheinlich ist (114-119).

Nachdem DC in unserer Studie zunächst für jede Applikation einzeln hergestellt worden waren, konnten wir in weiteren Untersuchungen an reifen DC zeigen, dass eine Kryokonservierung von DC mit Auftauen kurz vor der klinischen Applikation keine wesentliche Beeinträchtigung von Vitalität, Immunphänotyp, T-Zell-stimulatorischen

Eigenschaften (Proliferationsassay) und Motilität (Zeitraffer-Videomikroskopie) zur Folge hat (4.1.4). Diese Ergebnisse haben wesentliche Bedeutung für die klinische Praktikabilität einer Vakzinierung mit DC bei CML. So ist die Möglichkeit der Kryokonservierung die praktische Voraussetzung für die Durchführung einer größeren multizentrischen Phase-II- oder -III-Studie mit DC bei der CML, da die DC-Herstellung unter GMP-Bedingungen ein sehr aufwendiges Verfahren ist.

Eine weitere Amplifikation der Immunogenität von ex vivo generierten DC durch Transfektion mit immunstimulierenden Molekülen wurde in vitro für humane DC und in vivo im Tiermodell erfolgreich durchgeführt (Übersicht in 134). Gegenstand eigener Untersuchungen war die retrovirale Transduktion von humanen DC mit Interleukin-7, einem T-Zell-aktivierenden Zytokin. Ziel dieser Untersuchungen war eine zusätzliche Aktivierung der T-Zelle während der Interaktion mit der DC. Eine retrovirale Transduktion wurde zunächst an DC von gesunden Donoren erfolgreich durchgeführt (4.1.5). Ergebnis war eine Steigerung der T-Zell-Aktivierung im Proliferationsassay um einen Faktor 2-3. Diese Ergebnisse konnten dann an DC von CML-Patienten reproduziert werden (4.1.6). Eine klinische Umsetzung dieser Strategie ist zunächst unter dem Aspekt der Nutzen/Risiko-Abwägung und der ermutigenden Ergebnisse mit genetisch unmodifizierten DC nicht geplant. Der klinische Einsatz von Gen-modifizierten DC bietet dennoch eine Perspektive für die Zukunft, dies insbesondere bei Verwendung nicht-viraler Vektoren. Erste Ergebnisse mit Tumor-RNA-gepulsten DC als Vakzine (135) zeigen eine der klinisch interessantesten Strategien, deren klinische Relevanz keinesfalls auf die CML beschränkt ist.

## ***5.2 In-Vivo-Amplifikation der Antigenpräsentation durch GM-CSF beim metastasierten Nierenzell-Karzinom***

Ziel des klinischen Einsatzes von GM-CSF war die In-Vivo-Amplifikation der Antigenpräsentation in Kombination mit den T-Zell-aktiven Zytokinen IL-2 und  $\alpha$ -Interferon, welche beide für die Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms zugelassen sind. Rationale für die zusätzliche Gabe von GM-CSF waren zum damaligen Zeitpunkt präklinische (92-97,136) und erste klinische Daten (98), welche auf eine immunologische Anti-Tumor-Aktivität von GM-CSF hinwiesen. Da GM-CSF alleine keine ausreichende Anti-Tumor-Aktivität bei Patienten mit NCC hat (99,100), wurde eine Kombination mit IL-2 und  $\alpha$ -Interferon gewählt. So sollte gleichzeitig die Antigenpräsentation und die Aktivität von

Effektorzellen des Immunsystems verstärkt werden, um eine Amplifikation von Tumorspezifischer T-Zell-Immunität zu erreichen. Unsere Phase-I/II-Pilotstudie zeigt, dass die kombinierte Therapie mit GM-CSF, IL-2 und  $\alpha$ -Interferon klinisch durchführbar ist, schwerwiegende Toxizität wurde nicht beobachtet. Bei 2/10 Patienten konnte eine partielle Remission (PR), bei einem Patienten eine „mixed response“ (MR) dokumentiert werden. Die immunologischen Daten zeigen einen signifikanten Anstieg von CD80+ und CD86+ PBMC unter GM-CSF-Therapie, welcher in erster Linie durch einen Anstieg von CD14+ Monozyten zu erklären war. Da eine Differenzierung von Monozyten in DC durch transendotheliale Migration beschrieben ist (137), könnte ein solcher Anstieg von Monozyten auch zu einer Vermehrung von DC in verschiedenen Geweben führen. T- und NK-Effektorzellen wurden quantitativ durch GM-CSF alleine nicht wesentlich beeinflusst. Erst nach zusätzlicher Gabe von IL-2 oder  $\alpha$ -Interferon konnte ein Anstieg von CD3+, CD4+, CD8+ und CD56+ PBMC beobachtet werden. Ein Anstieg der T-Zell-Proliferation in der autologen MLR nach 2 Wochen GM-CSF-Therapie konnte sowohl durch eine Steigerung der Antigenpräsentation als auch der T-Zell-Funktion erklärt werden. Zytotoxizitätsassays mit verschiedenen Targetzellen zeigten, dass GM-CSF alleine nach 14-tägiger Therapie die Non-NK-vermittelte Zytotoxizität von PBMC steigern kann. Trotz der beobachteten immunmodulatorischen Effekte durch GM-CSF muss bei Zusammenschau unserer Studie und anderen zwischenzeitlich publizierten Studien mit GM-CSF beim NCC (99,100,138-145) festgestellt werden, dass GM-CSF alleine kaum klinische Wirksamkeit beim NCC hat und dass die Ergebnisse der Kombinationstherapie (GM-CSF + IL-2 +  $\alpha$ -Interferon) die aus der Zytokintherapie mit  $\alpha$ -Interferon plus IL-2 bekannten objektiven Remissionsraten nicht verbessern konnten. Weitere Studien mit GM-CSF erscheinen daher beim NCC nicht erfolgversprechend. Zusätzlich ist zu betonen, dass die klinische Entwicklung verschiedener Substanzen mit gezieltem molekularem Angriffspunkt („targeted therapies“) bis hin zur kürzlich erfolgten Zulassung von Sunitinib in der Erstlinientherapie zu einer erheblichen Veränderung der therapeutischen Standards beim metastasierten NCC führen wird bzw. schon geführt hat. Dennoch sollten in diesem Kontext immunologische Therapieansätze weiterhin in der therapeutischen Sequenz oder auch als Kombinationspartner für neue zielgerichtete Medikamente Berücksichtigung finden (86,146), da die Therapie des metastasierten NCC trotz aller Fortschritte zunächst ihren palliativen Charakter behalten wird.

### 5.3 *Präklinische Modelle zur Modifikation der Antigenpräsentation in vivo: Flt-3L und CCL19(ELC) als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung*

Während der letzten 15 Jahre hat die Verwendung von DC als Tumorstoffe innerhalb von Tiermodellen, aber auch in klinischen Studien das Verständnis der grundlegenden immunologischen Mechanismen einer gegen den Tumor gerichteten T-Zell-Antwort wesentlich erweitert. Für einzelne Tumorentitäten (Melanom, NCC, Prostata-Karzinom) liegen zudem ermutigende klinische Ergebnisse vor (35,36). Dennoch wird der breite klinische Einsatz von autologen DC als Tumorstoffe durch den hohen Zeit- und Kostenaufwand limitiert. In Studien mit größeren Patientenzahlen wurden nicht zuletzt darum andere Stoffe (meistens Peptid/Protein plus Adjuvans) benutzt, deren Herstellung leichter zu bewältigen ist. Auch DNA-Stoffe haben das Potenzial, als „generelle“ Stoffe über HLA-Barrieren hinweg Verwendung zu finden. Zudem haben DNA-Stoffe verschiedene Vorteile gegenüber Peptid-Impfstoffen, insbesondere ihre durch CpG-Sequenzen bedingte Immunogenität und die Expression multipler potenzieller MHC-Klasse-I- und -II-Epitope.

Da der alleinige Einsatz von Tumorstoffe-kodierender DNA als Tumorstoffe trotz Induktion von humoralen und zellulären Immunantworten beim Menschen bislang eher enttäuschend war, wurden verschiedene immunmodulatorische Moleküle als Adjuvantien eingesetzt, um die Anti-Tumor-Immunantwort zu amplifizieren (45,101).

Bei der genetischen Immunisierung mit DNA stellt die In-Vivo-Transfektion von DC einen wesentlichen Schritt dar (47-49,147). Die In-Vivo-Expansion von DC ist somit eine Strategie, um eine verstärkte Antigenpräsentation nach DNA-Vakzinierung zu erreichen. In unseren Untersuchungen wurden Flt-3L und CCL19(ELC) als Adjuvantien bei der DNA-Vakzinierung eingesetzt, um eine In-Vivo-Expansion von DC bzw. eine Verstärkung der Antigenpräsentation zu erreichen.

Das  $\beta$ -Gal-Modellantigen wurde in unseren Experimenten benutzt, weil die Untersuchungen mehr auf den Effekt des Adjuvans als auf ein bestimmtes Tumorstoffe fokussiert waren. Das  $\beta$ -Gal-Maus-Modell ist gut etabliert und bietet einige Vorteile:  $\beta$ -Gal ist ein Reporter-Gen, dessen Expression durch X-Gal-Färbung leicht überprüft werden kann und es stehen eine Reihe von Reagenzien für das Immunmonitoring zur Verfügung (MHC-restringierte Peptide, rekombinantes Protein,  $\beta$ -Gal-Antikörper, verschiedene Plasmidvektoren) (148,149).

Nach Applikation von Flt-3L ist eine massive Expansion von lymphoiden und myeloischen DC in Maus und Mensch vorbeschrieben (102,103). Unsere Daten (4.3.1) bestätigen eine

Expansion von lymphoiden und myeloischen DC in einem C57BL/6-Mausmodell nach s.c. Applikation von rekombinantem Flt-3L. Eine  $\beta$ -Gal-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort konnte mittels  $\gamma$ -Interferon-Sekretionsassay sowohl nach Vakzinierung mit pDNA( $\beta$ -Gal) alleine als auch nach Ko-Applikation von rekombinantem Flt-3L nachgewiesen werden. Die Ko-Applikation von rekombinantem Flt-3L führte hierbei zu einer Amplifikation der  $\beta$ -Gal-spezifischen proliferativen T-Zell-Antwort um einen Faktor 3-4. Überraschenderweise konnte jedoch keine  $\beta$ -Gal-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort nachgewiesen werden: weder bei den mit pDNA( $\beta$ -Gal) alleine noch bei den zusätzlich mit Flt-3L behandelten Mäusen konnten  $\beta$ -Gal-spezifische zytotoxische T-Zellen nach In-Vitro-Prästimulation detektiert werden. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Zytotoxizität trotz des Nachweises  $\beta$ -Gal-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bot das Zytokinmilieu in den Splenozytenkulturen 5 Tage nach In-Vitro-Prästimulation mit  $\beta$ -Gal-Peptid und IL-7: niedrige  $\gamma$ -IFN- und IL-12-Konzentrationen bei gleichzeitig hohen IL-4- und IL-10-Spiegeln waren Indikator für eine TH-2-polarisierte T-Zell-Antwort bei den mit pDNA( $\beta$ -Gal) immunisierten Mäusen. Dieses TH-2-Milieu war bei zusätzlicher Gabe von Flt-3L noch stärker ausgeprägt. Die TH-2-Immunantwort wurde auch durch die humorale Immunantwort bestätigt, welche von IgG-1 dominiert wurde. Unsere Daten zeigen, dass Flt-3L die primär durch die Vakzine induzierte TH-2-Polarisierung verstärkt. Die Untersuchung des Phänotyps der durch Flt-3L in vivo expandierten DC an Splenozyten der Maus ergab einen unreifen Phänotyp mit schwacher oder fehlender Expression von CD80, CD86 und CD40. Jedoch hatten diese DC in vollem Umfang die Fähigkeit zur Ausreifung nach Zugabe von LPS zur Zellkultur. Der primär unreife Phänotyp bietet eine mögliche Erklärung für die fehlende zytotoxische T-Zell-Antwort, da unreife DC bei der Antigenpräsentation nicht ausreichend immunogen sind (42). In der Literatur existieren teils widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Induktion von Immunität oder Toleranz nach Gabe von Flt-3L als Adjuvans (150-163).

Unsere Hypothese ist, dass Flt-3L per se weder Immunität noch Toleranz induziert und ebenso wenig bestimmend für die TH-1/2-Polarisierung ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass Signale, welche aus der Vakzinierung selbst resultieren, über die Induktion von Immunität oder Toleranz bzw. über die TH-1/2-Polarisierung entscheiden. So sind manche Impfstoffe ein Trigger für die IL-12-Produktion und induzieren so eine TH-1-Polarisierung, anderen fehlt dieser Trigger, was zu TH-2-Polarisierung oder sogar zu Toleranz führen kann. Auch wurde eine „Erschöpfung“ der Zytokinproduktion beschrieben, welche die TH-Polarisierung durch Reversion von TH-1-Zellen in TH-2- oder nichtpolarisierte T-Zellen beeinflusst (164). Die für die TH-Polarisierung entscheidenden Signale sind wahrscheinlich eng assoziiert mit der



Fähigkeit der Vakzine, eine DC-Reifung zu induzieren, jedoch haben auch Dosierung und präferenzielle Antigenpräsentation (MHC-I vs. MHC-II) hier Einfluss (165-168). Auch die Menge an CpG-Sequenzen entscheidet bei einer DNA-Vakzine, ob eine TH-1- oder eine TH-2-Immunantwort entsteht (164). Hierbei spielt die Bindung von CpG-Sequenzen an Toll-Like-Rezeptoren (TLR) die entscheidende Rolle. Möglicherweise enthält unsere  $\beta$ -Gal- DNA-Vakzine nicht ausreichend CpG-Sequenzen und ist damit nicht in der Lage, eine TH-1-Polarisierung zu induzieren. In anderen Studien wurde die Induktion von therapeutischer Immunität durch Ko-Applikation von Antigen, Flt-3L und CpG-Sequenzen beschrieben (169). In den letzten Jahren gab es zunehmende Evidenz dafür, dass das Ergebnis der Tumorzellvaksinierung ganz wesentlich von Faktoren wie dem Zytokin-Milieu, der T-Zell:DC-Ratio, der Antigen-Dosis und zusätzlichen (mikrobiellen) Stimuli bestimmt wird. Der DC-Subtyp spielt im Vergleich hierzu wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle (168,170), zumal die o.g. Faktoren die Ausreifung und die Funktion der DC wesentlich beeinflussen. Mosca et al. (171) zeigen, dass durch Flt-3L expandierte DC die  $\gamma$ -IFN-Produktion von alloge- neren T-Zellen nur stimulieren, wenn sie vorher mit Maturationsstimuli vorbehandelt wurden.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass Flt-3L alleine nicht zum Einsatz bei der Tumorthherapie geeignet ist. Eine Kombination mit anderen immunmodulatorischen Molekülen bietet jedoch interessante Perspektiven für die Immuntherapie (Vakzinierung).

Unsere Ergebnisse in einem Mausmodell zur DNA-Vakzinierung mit  $\beta$ -Gal als Modellantigen und pDNA(CCL19) als Adjuvans zeigen, dass die Koexpression von CCL19 eine TH-1-polarisierte Immunantwort induziert und zu einer verbesserten Tumorprotektion im Tumor-Challenge-Experiment bzw. zu einer Retardierung des Tumorwachstums führt. Bei Mäusen, welche mit pDNA( $\beta$ -Gal) plus pDNA(CCL19) immunisiert worden waren und die  $\beta$ -Gal<sup>+</sup>-syngene Tumorzellen im Challenge-Experiment komplett abgestoßen hatten, war eine verstärkte proliferative T-Zell-Antwort gegenüber  $\beta$ -Gal-Protein sowie eine verstärkte CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort gegen  $\beta$ -Gal-Peptid im  $\gamma$ -IFN-ELISpot-Assay nachweisbar. Im CBA konnte das TH-1-Zytokinprofil der Anti- $\beta$ -Gal-Immunantwort bestätigt werden, auch die humorale Immunantwort zeigte aufgrund einer dominanten IgG-2a-Antwort Zeichen einer TH-1-Polarisierung. Umso überraschender war die fehlende Verstärkung der zytotoxischen T-Zell-Antwort im <sup>51</sup>Cr-Release-Assay gegenüber  $\beta$ -Gal<sup>+</sup>-syngenem Tumorzellen. Vor dem Hintergrund einer verbesserten Tumorabstoßung nach Immunisierung mit pDNA( $\beta$ -Gal) plus pDNA(CCL19) gibt es unterschiedliche mögliche Erklärungen hierfür: 1) der <sup>51</sup>Cr-Release-Assay reflektiert nicht alle T-zellulären zytotoxischen Mechanismen (172), in vivo wurden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben, welche unabhängig von Perforin und FasL Zellen abtöten (173),

2) der CCL19-vermittelte Anti-Tumor-Effekt könnte (partiell) von Non-T-Zellen verursacht werden, 3) die schwache Zytotoxizität ist eine Eigenschaft des verwendeten  $\beta$ -Gal-Tumormodells wie auch anderweitig beschrieben wurde (174,175). Die Ergebnisse unserer Studie lassen zwei wesentliche Fragen offen: der genaue immunologische Mechanismus der CCL19-Wirkung und der anatomische Ort dieser Wirkung bleiben unklar. Da CCL19 sowohl auf reifen DC als auch auf T-Zell-Subpopulationen (naive und ein Teil der „central memory“ T-Zellen) exprimiert wird, könnte die CCL19-Wirkung durch DC, T-Zellen oder beide vermittelt werden. Da DC- und T-Zell-Funktion voneinander abhängig sind, ist es in vivo kaum möglich, diese Frage durch Depletionsexperimente oder in einem Knock-out-Modell zu beantworten. Die funktionelle Beeinträchtigung oder Depletion der einen Zellart würde den Anti-Tumor-Effekt sofort zunichte machen. Verschiedene experimentelle Untersuchungen weisen auf eine Verbesserung der Funktion von reifen DC unter Einwirkung von CCL19 hin (176,177). Diese Daten legen nahe, dass der in unserem experimentellen System beobachtete Effekt DC-vermittelt sein könnte. In unserem Modellsystem müsste dies dann aber ein rein qualitativer Effekt sein, denn es ergab sich kein Anhalt für eine Vermehrung von DC am Injektionsort, in der Milz oder im Tumor der mit CCL19 behandelten Mäuse. Es konnte jedoch eine deutliche Vermehrung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration im Tumor nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist die verstärkte Rekrutierung von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch CCL19 mit nachfolgender Infiltration des Tumors. Dies könnte sowohl durch quantitative oder qualitative Verbesserungen der DC-Funktion als auch durch eine verstärkte Migration von naiven oder zentralen Memory-T-Zellen in lymphatisches Gewebe infolge einer erhöhten CCL19-Expression erklärt werden. Die Frage, wo diese T-Zellen rekrutiert werden, hat zwei mögliche Antworten: An der Injektionsstelle als „De Novo“-Formation von lymphatischem Gewebe (178,179) oder in regionalen Lymphknoten.

Wir würden die letztere Möglichkeit favorisieren, denn unsere immunhistologischen Untersuchungen ergaben keinerlei Anhalt für lymphatisches Gewebe an der Injektionsstelle. Außerdem ist bekannt, dass in die Extremitäten der Maus injiziertes CCL19 in regionale Lymphknoten gelangt und dort nachweisbar ist. Intrakutan appliziertes CCL19 kann bei CCL19-defizienten Mäusen die T-Zell-Migration in regionale Lymphknoten wiederherstellen (180). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CCL19, welches von DC in lymphatischem Gewebe exprimiert wird, zu einer starken Einwanderung von T-Zellen führt (181-183). Unter Berücksichtigung all dieser Daten postulieren wir, dass nach intramuskulärer Injektion von pDNA( $\beta$ -Gal) plus pDNA(CCL19) hauptsächlich die in regionalen Lymphknoten auftretende CCL19-Expression zu einem verstärkten Einwandern von T-Zellen und möglicherweise auch

von DC führt. Die Folge wäre eine verstärkte Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen, welche konsekutiv in den Tumor einwandern und dort zu Abstoßung führen. Eine zusätzliche Amplifikation der DC-Funktion könnte Teil des Effektes sein. Zusätzliche Untersuchungen zur Aufklärung der CCL19-Wirkung mit Methoden des Bio-Imaging zur Darstellung von T-Zell-Migration sind geplant. Eine Verstärkung der Immunogenität einer Vakzine durch CCL19 wurde auch in einem HSV-Vakzinierungsmodell beschrieben (184,185). Andere Arbeiten zeigen, dass die CCL19-Transfektion von Tumorzellen zu einer Retardierung des Tumorstwachstums *in vivo* führt und dass die intratumorale/intranodale Injektion von rekombinantem CCL19 in einem Maus-Tumormodell systemische Immunität induziert (186,187). In der letzteren Studie wird im Tumorgewebe auch eine Vermehrung von CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie von DC beobachtet. Unsere Daten zeigen, dass CCL19 ein sehr interessantes Adjuvans für die Tumorstvakzinierung ist.

## 6. Ausblick

Die moderne Tumorstimmunologie ist ein junges Fach, wenn berücksichtigt wird, dass grundlegende Erkenntnisse zur Antigenpräsentation und zur MHC-restringierten T-Zell-Immunität aus den 1990er Jahren stammen. Diese Erkenntnisse waren Voraussetzung für die Entwicklung effektiver Vakzine. In diesem Zeitraum hat die Tumorstvakzinierung erkennbare Fortschritte gemacht und es sind tragfähige Konzepte zur Tumorstimmunität wie z.B. die „Danger-Theorie“ und die „Immunoediting-Theorie“ entstanden, welche die in der klassischen „Immunosurveillance-Theorie“ einerseits und in der generellen Annahme einer Nicht-Immunogenität von Tumoren andererseits liegenden Einseitigkeiten überwinden. Dennoch sind die klinischen Erfolge der Tumorstvakzinierung weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben. Die Gründe hierfür sind vielfältig, ein wesentlicher Grund ist aber in der Anwendung von Tumorstvakzinen in einer inadäquaten klinischen Situationen zu sehen: Die Erfahrung zeigt, dass eine weit fortgeschrittene Tumorerkrankung mit großer Tumormasse die ungünstigste Situation für die Tumorstvakzinierung ist, da sich in den meisten Fällen eine unüberwindbare Toleranz ausgebildet hat. Betrachtet man Impfstoffe gegen infektiöse Erkrankungen, die zu den größten Errungenschaften der Medizin überhaupt zählen, in analoger Weise, entspricht die bisherige Situation in der Tumorstvakzinierung einer aktiven Immunisierung im weit fortgeschrittenen Stadium einer Infektionserkrankung: Eine solche

Form der Immuntherapie wäre i.d.R. auch wirkungslos, die prinzipielle Wirksamkeit des Impfstoffes müsste dennoch nicht in Zweifel gezogen werden. In Analogie haben die letzten beiden Jahrzehnte in der Tumorummunologie in murinen Tumormodellen gezeigt, dass eine Tumorstoffimpfung am effektivsten ist, wenn die Tumormasse sehr klein bzw. (noch) nicht detektierbar ist, während die Impfung bei großen etablierten Tumoren meist ihre Wirksamkeit verliert (1,54,188,189). Hieraus folgt die Notwendigkeit eines Paradigmenwechsels für die Tumorstoffimpfung der Zukunft: klinische Erfolge erscheinen nur realistisch in der Situation von minimaler Resttumorlast (MRD) und Prophylaxe, wobei hier auch durchaus an eine Impfung nach vorangehender Tumorreduktion mit anderen Therapieverfahren im Sinne eines multimodalen Therapiekonzeptes zu denken ist. Bei der Entwicklung solcher neuer Therapiekonzepte werden voraussichtlich auch zukünftige Ergebnisse der Tumorthherapie durch adoptiven T-Zell-Transfer eine Rolle spielen (Übersicht in 190).

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist in unserer Gruppe eine Impfung mit autologen DC bei CML-Patienten mit minimaler zytogenetischer/ molekularer Resttumorlast in Vorbereitung. Der klinische Erfolg der Tyrosinkinase-Inhibitoren hat bei der CML ideale Voraussetzungen für die Impfung geschaffen: MRD mit einer Rest-Tumorzellmasse, welche nur noch mit moderner PCR-Technologie erfasst werden kann.

Bei der DNA-Impfung konnten die ursprünglich in einem murinen  $\beta$ -Gal-Tumormodell gewonnenen Daten mit CCL19 als Adjuvans in einem Her2/neu-Tumormodell reproduziert werden. Ein möglicher klinischer Einsatz dieser Impfung wird beim Mamma-Karzinom gesehen. Auch hier wird die Impfung in einer MRD-Situation angestrebt, z.B. zunächst bei kompletter Remission/sehr guter partieller Remission nach vorangegangener systemischer Therapie im metastasierten Stadium. Nach einer sicherlich notwendigen Phase-I/II-Studie im fortgeschrittenen Tumorstadium ist die Zukunftsperspektive einer solchen Impfung die adjuvante Therapie von Hochrisikopatientinnen im Kontext mit anderen Therapiemodalitäten. Speziell in der adjuvanten oder auch „sekundär adjuvanten“ Situation erscheint die Induktion von Anti-Tumor-Immunität mit dem Ziel der Eradikation residueller Tumorzellen realistisch und aufgrund vorliegender Daten erfolgversprechend.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Coley WB (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of ten original cases. *History of cancer immunotherapy. Am J Med Sci* 105: 487-511
2. Burnet FM. (1959) *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Vanderbilt Univ. Press: Nashville, TN, USA
3. Burnet FM (1967) Immunological Aspects of Malignant Disease. *Lancet* 1: 1171-1174
4. Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27
5. Pereira P, Forni L, Larsson EL, Cooper M, Heusser C, Coutinho A (1986) Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur J Immunol* 16: 685-688
6. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164
7. Bach JF (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3: 189-198
8. Battaglia M, Roncarolo MG (2004) The role of cytokines (and not only) in inducing and expanding T regulatory type I cells. *Transplantation* 77: S16-18
9. Bluestone JA, Abbas AK (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253-257
10. Modigliani Y, Bandeira A, Coutinho A (1996) A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol Rev* 149: 155-200
11. Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, Chang JH, McHugh RS, Ronchese F (2005) Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 174: 90-98
12. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ (2001) Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194: 823-832
13. Janeway CA Jr, Medzhitov R (1998) Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Sem Immunol* 10: 349-350
14. Bernard A, Lamy AL, Alberti I (2002) The two-signal-model of T cell activation after 30 years. *Transplantation* 73: S31-35
15. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
16. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376
17. Mesa C, Fernandez LE (2004) Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 82: 644-650
18. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12: 1539-1546
19. Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045
20. Thomas L (1982) On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55: 329-333

21. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360
22. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA (2001) A fresh look at tumor surveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2: 293-299
23. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998
24. Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21: 807-839
25. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
26. Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic cell defects. *Nat Rev Immunol* 4: 941-952
27. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wie S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *J Immunol* 10: 942-949
28. Kusmartsev S, Gabrilovich D (2002) Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 51: 293-298
29. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S (2005) Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 174: 636-645
30. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signalling in tumor cells. *Nat Med* 10: 48-54
31. Danna EA, Sinha P, Gilbert M, Clements VK, Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S (2004) Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res* 64: 2205-2211
32. Pardoll DM (1998) Cancer vaccines. *Nat Med* 4 (Suppl 5): 525-531
33. Dallal RM, Lotze M (2000) The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 12: 583-588
34. Stevenson FK (2005) Update on cancer vaccines. *Curr Opin Oncol* 17: 573-577
35. Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D (2004) Part I: Vaccines for solid tumors. *Lancet Oncol* 5: 681-689
36. Mocellin S, Semenzato G, Mandruzzato S, Rossi CR (2004) Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncol* 5: 727-737
37. Rosenberg SA (1999) A new era for Cancer Immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10: 281-287
38. Greenberg P (1991) Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49: 281-355
39. Linsley PS, Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell response to antigen. *Annu Rev Immunol* 11: 191-212

40. Wick M, Dubey P, Koeppen H, Siegel CT, Fields PE, Chen L, Bluestone JA, Schreiber H (1997) Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 186: 229-238
41. Hurwitz AA, Kwon ED, van Elsas A (2000) Costimulatory wars: the tumor menace. *Curr Opin Immunol* 12: 589-596
42. Moser M (2003) Dendritic cells in immunity and tolerance- do they display opposite functions? *Immunity* 19: 5-8
43. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Löwenstein C, Pardoll D, Levitsky H (1998) The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188: 2357-2368
44. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C (2004) Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: Phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 363: 594-599
45. Guronathan S, Klinman DM, Seder RA (2000) DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annu Rev Immunol* 18: 927-974
46. Choo AY, Choo DK, Kim JJ, Weiner DB (2005) DNA vaccination in immunotherapy of cancer. *Cancer Treat Res* 123: 137-156
47. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr (1996) DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 2: 122-1128
48. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM (1996) Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 873-883
49. Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA (1997) Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 186: 1481-1486
50. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM (1999) Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: A randomized trial. *Lancet* 353: 345-350
51. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AI B, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr (2000) Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 18: 148-157
52. Blankenstein T, Cayeux S, Qin Z (1997) Genetic approaches to cancer immunotherapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 129: 3-49
53. Mach N, Dranoff G (2000) Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr Opin Immunol* 12: 571-575
54. Sobol RE (2006) The rationale for prophylactic cancer vaccines and need for a paradigm shift. *Cancer Gene Therapy* 13: 725-731
55. Goldman JM (2004) Chronic myeloid leukemia – still a few questions. *Exp Hemat* 32: 2-10
56. Ren R (2005) Mechanisms of bcr-abl in the pathogenesis of chronic myelogenous Leukemia. *Nature Rev Cancer* 5: 172-183

57. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Blood* 86: 2041-2050
58. Kloosterboer FM, van Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, Barbui AM, van Egmond HM, Strijbosch MP, Kester MG, Marijt WA, Goulmy E, Willemze R, Falkenburg JH. (2004) Direct cloning of leukemia-reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells. *Leukemia* 18: 798-808
59. Kolb HJ, Schmid C, Barret AJ, Schendel DJ (2004) Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103: 767-776
60. Molldrem JJ, Kant S, Jiang W, Lu S (2002) The basis of T-cell-mediated immunity to chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21: 8668-8673
61. Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You SG, Cheever MA (1992) T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1468-1472
62. Huettner CS, Zhang P, Van Etten RA, Tenen DG (2000) Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* 24: 57-60
63. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, Sidney J, McGraw K, Scheinberg DA, Sette A (1995) Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood* 85: 2680-2684
64. Bocchia M, Korontsvit T, Xu, Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, Scheinberg DA (1996) Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 87: 3587-3592
65. Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P (1998) Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 101: 2290-2296
66. Osman Y, Takahashi M, Zheng Z, Koike T, Toba K, Liu A, Furukawa T, Aoki S, Aizawa Y (1999) Generation of bcr-abl specific cytotoxic T-lymphocytes by using dendritic cells pulsed with bcr-abl (b3a2) peptide: its applicability for donor leukocyte transfusions in marrow grafted CML patients. *Leukemia* 13: 166-174
67. Norbury LC, Clark RE, Christmas SE (2000) b3a2 BCR-ABL fusion peptides as targets for cytotoxic T cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 28: 2242-2250
68. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC, Madrigal JA (2001) Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood* 98: 2887-2893
69. Clark RE, Christmas SE (2001) Bcr/abl fusion peptides and cytotoxic T cells in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 42: 871-880
70. Pardoll DM (2002) Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2: 227-238
71. Sturrock AB, Franklin KF, Rao G, Marshall BC, Rebentisch MB, Lemons RS, Hoidal JR (1992) Structure, chromosomal assignment and expression of the gene for proteinase-3. The Wegener's granulomatosis autoantigen. *J Biol Chem* 267: 21193-21199



72. Müller-Berat N, Minowada J, Tsuji-Takayama K, Drexler H, Lanotte M, Wieslander J, Wiik A (1994) The phylogeny of proteinase-3/myeloblastin, the autoantigen in Wegener's granulomatosis, and myeloperoxidase as shown by immunohistochemical studies on human leukemic cell lines. *Clin Immunol Immunopathol* 70: 51-59
73. Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, Hausner I, Faderl S, Nerl C, Emmerich B (1995) Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase-3 (myeloblastin) in normal and leukemic myeloid cells. *Br J Haematol* 89: 250-257
74. Molldrem JJ et al. (1999) A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 59: 2675-2681
75. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, Sconocchia G, Fujiwara H, Price DA, Gostick E, Yamada K, Melenhorst J, Childs R, Hensel N, Douek DC, Barrett AJ (2003) Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood* 102: 2892-2900
76. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM (2000) Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 6: 1018-1023
77. Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, Wieder E, Jiang W, Lu S, Wang C, Davis MM (2003) Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest* 111: 639-647
78. Azuma T, Makita M, Ninomiya K, Fujita S, Harada M, Yasukawa M (2002) Identification of a novel WT1-derived peptide which induces human leukocyte antigen-A24-restricted anti-leukemia cytotoxic T lymphocytes. *Br J Haematol* 116: 601-603
79. Bellantuono I, Gao L, Parry S, Marley S, Dazzi F, Apperley J, Goldman JM, Stauss HJ (2002) Two distinct HLA-A\*0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood* 100: 3835-3837
80. Müller L, Knights A, Pawelec G (2003) Synthetic peptides derived from the Wilms' tumor 1 protein sensitize human T lymphocytes to recognize chronic myelogenous leukemia cells. *Hematol J* 4: 57-66
81. Wagner W., Ouyang Q, Pawelec G (2003) The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 52: 89-96
82. Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, Popat U, Claxton DF, Kliche KO, Andreef M, Champlin RE (1997) Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia Chromosome-positive Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 89: 1133-1142
83. Eibl B, Ebner S, Duba C, Bock G, Romani N, Erdel M, Gachter A, Niederwieser D, Schuler G (1997) Dendritic cells generated from blood precursors of Chronic Myelogenous Leukemia patients carry the Philadelphia Translocation and can induce a CML-specific primary cytotoxic T cell response. *Genes Chrom Cancer* 20: 215-223
84. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J (1992) GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261
85. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93
86. Harrison ML, Montes A, Gore ME (2007) New drug therapies for advanced renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 7: 57-71

87. Schöffski P, Dumez H, Clement P, Hoeben A, Prenen H, Wolter P, Joniau S, Roskams T, Van Poppel H (2006) Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. *Ann Oncol* 10: 1-12
88. Motzer RJ, Bukowski RM (2006) Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24: 5601-5608
89. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J (1999) Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 17: 2530-2540
90. Scheicher C, Mehlig M, Zecher R, Reske K (1992) Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Immunol Meth* 154: 253-264
91. Daro E, Pulendran B, Brasel K, Maraskovsky E, McKenna HJ (1998) Antigen capture, intracellular class II distribution and costimulatory molecule expression in GM-CSF and Flt 3 ligand generated murine dendritic cells. 5th International symposium on dendritic cells in fundamental and clinical immunology. Pittsburgh (abstract )
92. Kushner BH, Cheung NK (1989) GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* 73: 1936-1941
93. Stewart-Akers AM, Cairns JS, Tweardy DJ, McCarthy SA (1993) Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on lymphokine-activated killer cell induction. *Blood* 81: 2671-2678
94. Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shaddock RK (1989) Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor and interferon in cancer patients. *Blood* 73: 643-646
95. Richard C, Alsar-MJ, Calavia J, Bello-Fernandez C, Baro J, Loyola I, Clavel M, Gaston R, Oskam R, Philip T, Rios R, Cuadrado MA, Gonzalez-Pardo C, Iriando A (1993) Recombinant human GM-CSF enhances T cell mediated cytotoxic function after ABMT for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 11: 473-478
96. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci* 90: 3539-3543
97. Hsieh CL, Pang VF, Chen DS, Hwang LH (1997) Regression of established mouse leukemia by GM-CSF- transduced tumor vaccine: implications for cytotoxic T lymphocyte responses and tumor burdens. *Hum Gene Ther* 8: 1843-1854
98. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Meutzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G (1998) Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13141-13146
99. Wos E, Olencki T, Tuason L, Budd, GT, Peereboom D, Sandstrom K, Mc Lain D, Finke J, Bukowski RM (1996) Phase II trial of subcutaneously administered granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 77: 1149-1153
100. Rini BI, Stadler WM, Spielberger RT, Ratain MJ, Vogelzang NJ (1998) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 82: 1352-1358
101. Scheerlinck JY. Genetic adjuvants for DNA vaccines (2001) *Vaccine* 19: 2647-2656

102. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ (1996) Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184: 1953-1962
103. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ (2000) In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96: 878-884
104. Gilliland DG, Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532-1542
105. Kutzler MA, Weiner DB (2004) developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J Clin Invest* 114: 1241-1244
106. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23-33
107. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460
108. Cyster JG (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098-2102
109. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA (1999) Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 19: 1-47
110. Sallusto F, Lanzavecchia A (2000) Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177: 134-140
111. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG (2000) Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12694-12699
112. Kurbegov D, Molldrem JJ (2004) Immunity to chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol North Am* 18: 733-752
113. Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y (2001) Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 29: 709-719
114. Appel S, Boehmle AM, Grunebach F, Müller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brummendorf TH, Brossart P (2004) Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* 103: 538-544
115. Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, Cayuela JM, Maarek O, Charron D, Degos L, Dombret H, Toubert A, Rea D (2004) Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate. *Leukemia* 18: 1656-1661
116. Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, Dunbar CE, Wiestner A (2005) Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood* 105: 2473-2479
117. Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, Fanelli A, Iuliano F, Tabilio A, Amabile M, Forconi F, Gozzetti A, Raspadori D, Amadori S, Lauria F (2005) Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease. A multicentre observational trial. *Lancet* 363: 657-662
118. Bocchia M, Abruzzese E, Forconi F, Ippoliti M, Trawinska MM, Pirrotta MT, Raspadori D, Tozzi M, Gozzetti A, Lauria F (2006) Imatinib does not impair specific antitumor T-cell immunity in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 20: 142-143

119. Westers TM, Janssen JJWM, Houtenbos I, Snoijs NCL, van de Loosdrecht AA, Ossenkoppele GJ (2006) Maintained immunogenicity of chronic myeloid leukemia-derived dendritic cells in the presence of imatinib mesylate: implication for vaccination regimen. *Leukemia* 20: 154-157
120. Westermann J, van Lessen A, Terwey T, Baskaynak G, le Coutre P, Arnold R, Dörken B, Pezzutto A (2006) Anti-leukemic T cells in Myeloid Neoplasia: Abnormal cytokine secretion pattern may prevent immunological detection and might reflect functional impairment. *Blood* 108(11), 494a
121. Guarini A, Breccia M, Montefusco E, Petti MC, Zepparoni A, Vitale A, Foa R (2001) Phenotypic and functional characterization of the host immune compartment of chronic myeloid leukaemia patients in complete haematological remission. *Br J Haematol* 113: 136-142
122. Butt NM, Wang L, Abu-Eisha HM, Christmas SE, Clark RE (2004) BCR/ABL-specific T cells can be detected in healthy donors and in chronic myeloid leukemia patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 103:3245-
123. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P (1995) Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86: 3118-3122
124. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV (1998) The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92: 3362-3367
125. Posthuma EF, Falkenburg JH, Apperley JF, Gratwohl A, Roosnek E, Hertenstein B, Schipper RF, Schreuder GM, D'Amato J, Oudshoorn M, van Biezen JH, Hermans J, Willemze R, Niederwieser D (1999) HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. The Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood* 93: 3863-3865
126. Gannagé M, Abel M, Michallet AS, Delluc S, Lambert M, Giraudier S, Kratzer R, Niedermann G, Saveanu L, Guilot F, Camoin L, Varet B, Buzyn A, Caillat-Zucman S (2005) Ex vivo characterization of multi-epitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J Immunol* 174: 8210-8218
127. Melo JV, Gordon DE, Cross NCP, Goldmann JM (1993) The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81: 158-165
128. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg D (2000) Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood* 95: 1781-1787
129. Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, Schwartz J, Zakhaleva V, Papadopoulos EB, Scheinberg D (2004) A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103: 1037-1042
130. Litzow MR, Dietz AB, Bulur PA, Butler GW, Gastineau DA, Hoering A, Fink SR, Letendre L, Padley DJ, Paternoster SF, Tefferi A, Vuk-Pavlovic S (2006) Testing the safety of clinical-grade autologous myeloid DC in a phase I clinical immunotherapy trial of CML. *Cytotherapy* 8: 290-298
131. Ossenkoppele GJ, Stam AGM, Westers TM, de Gruijl TD, Janssen JJWM, van de Loosdrecht AA, Scheper RJ (2003) Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemic dendritic cells. *Leukemia* 17: 1424-1426
132. Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, Juji T, Shibata Y, Hirai H (2003) Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 27: 795-802
133. Grunebach F, Mirakaj V, Müller MR, Brummendorf T, Brossart P (2006) BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 66: 5892-5900

134. Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS (2002) Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther* 2: 57-78
135. Grunebach F, Müller MR, Brossart P (2005) New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother* 54: 517-525
136. Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, Oesch F, Knuth A (1996) Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 67: 54-62
137. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282: 480-483
138. Schiller JH, Hank JA, Khorsand M, Storer B, Borchert A, Huseby-Moore K, Burns D, Wesley O, Albertini MR, Wilding G, Sondel PM (1996) Clinical and immunological effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor coadministered with interleukin 2: A phase IB study. *Clin Cancer Res* 2: 319-330
139. De Gast GC, Klumpen HJ, Vyth-Dreese FA, Kersten MJ, Verra NC, Sein J, Batchelor D, Nooijen WJ, Schornagel JH (2000) Phase I trial of combined immunotherapy with subcutaneous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, low-dose interleukin-2, and interferon alpha in progressive metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 1267-1272
140. Schmidinger M, Steger G, Wenzel C, Locker GJ, Budinsky AC, Brodowicz T, Kramer G, Marberger M, Zielinski CC (2001) Sequential administration of interferon-gamma, GM-CSF and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial. *J Immunother* 24: 257-262
141. Tate J, Olencki T, Finke J, Kottke-Merchant K, Rybicki LA, Bukowski RM (2001) Phase I trial of simultaneously administered GM-CSF and IL-6 in patients with renal cell carcinoma: clinical and laboratory effects. *Ann Oncol* 12: 655-659
142. Smith II JW, Kurt RA, Baher AG, Denman S, Justice L, Doran T, Gilbert M, Alvord WG, Urba WJ (2003) Immune effects of escalating doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor added to a fixed, low-dose, inpatient interleukin-2 regimen: a randomized phase I trial in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Immunother* 26: 130-138
143. Lissoni P, Mengo S, Bucovec R, Brivio F, Fumagalli L, Tancini G, Gardani GS (2003) Clinical and biological effects of interleukin-2 with or without a concomitant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in metastatic cancer patients. *In Vivo* 17: 73-75
144. Verra N, Jansen R, Groenewegen G, Mallo H, Kersten MJ, Bex A, Vyth-Dreese FA, Sein J, van de Kastele W, Nooijen WJ, de Waal M, Horenblas S, de Gast GC (2003) Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN- $\alpha$  in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 88: 1346-1351
145. Koulova L, Novik Y, Caliendo G, Wiernik P, Dutcher J (2005) A phase 2 study of moderate dose interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma. *J Immunother* 28: 576-581
146. Sosman JA, Puzanov I, Atkins MB (2007) Opportunities and Obstacles to Combination Targeted Therapy in Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* 13 (Suppl 2): 764-769s
147. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN (1998) Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 188: 1075-1082
148. Cayeux S, Richter G, Noffiz G, Dörken B, Blankenstein Th (1997) Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation. *J Immunol* 158: 2834-2841

149. Overwijk WW, Surman DR, Tsung K, Restifo NP (1997) Identification of a K<sup>b</sup>-restricted CTL epitope of  $\beta$ -galactosidase: potential use in development of immunization protocols for "self" antigens. *Methods* 12: 117-123
150. Parajuli P, Pisarev V, Sublet J, Steffel A, Varney M, Singh R, LaFace D, Talmadge JE (2001) Immunization with wild-type p53 gene sequences coadministered with Flt-3 ligand induces an antigen-specific type 1 T cell response. *Cancer Res* 61: 8227-8234
151. Lynch DH, Andreasen A, Maraskovsky E, Whitmore J, Miller RE, Schuh JC (1997) Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat Med* 3: 625-631
152. Pawlowska AB, Hashino S, McKenna H, Weigel BJ, Taylor PA, Blazar BR (2001) In vitro tumor-pulsed or in vivo Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood* 97: 1474-1482
153. Braun SE, Chen K, Blazar BR, Orchard PJ, Sledge G, Robertson MJ, Broxmeyer HE, Cornetta K (1999) Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum Gene Ther* 10: 2141-2151
154. Hung CF, Hung CF, Hsu KF, Cheng WF, Chai CY, He L, Ling M, Wu TC (2001) Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of fms-like tyrosine kinase 3-ligand. *Cancer Res* 61: 1080-1088
155. Fong CL, Hui KM (2002) Generation of potent and specific cellular immune responses via in vivo stimulation of dendritic cells by pNGVL3-hFlex plasmid DNA and immunogenic peptides. *Gene Ther* 9: 1127-1138
156. Pulendran B, Smith JL, Jenkins M, Schoenborn M, Maraskovsky E, Maliszewski CR (1998) Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* 188: 2075-2082
157. Kim EM, Sivanandham M, Stavropoulos CI, Wallack MK (2002) Adjuvant effect of a Flt3 ligand (FL) gene-transduced xenogenic cell line in a murine colon cancer model. *J Surg Res* 108: 148-156
158. Kwon TK, Park JW (2002) Intramuscular co-injection of naked DNA encoding HBV core antigen and Flt3 ligand suppresses anti-HBc antibody response. *Immunol Lett* 81: 229-234
159. Evans TG, Hasan M, Galibert LDC (2002) The use of Flt3 ligand as an adjuvant for hepatitis B vaccination of healthy adults. *Vaccine* 21: 322-329.
160. McNeel DG, McNeel DG, Knutson KL, Schiffman K, Davis DR, Caron D, Disis ML (2003) Pilot study of an HLA-A2 peptide vaccine using flt3 ligand as a systemic vaccine adjuvant. *J Clin Immunol* 23: 62-72
161. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA (1998) Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 160: 5815-5825
162. Yunusov MY, Georges GE, Storb R, Moore P, Hagglund H, Affolter V, Lesnikova M, Gass MJ, Little MT, Loken M, McKenna H, Storer B, Nash RA (2003) FLT3 ligand promotes engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells without significant graft-versus-host disease. *Transplantation* 75: 933-940
163. Ciavarra RP, Ciavarra RP, Brown RR, Holterman DA, Garrett M, Glass WF 2nd, Wright GL Jr, Schellhammer PF, Somers KD (2003) Impact of the tumor microenvironment on host infiltrating cells and the efficacy of FLT3-ligand combination immunotherapy evaluated in a treatment model of mouse prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 52:535-545
164. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized cells. *Nat Immunol* 1: 311-316

165. Boonstra A, Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A (2003) Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197: 101-109
166. George TC, Billsborough J, Viney JL, Norment AM (2003) High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur J Immunol* 33: 502-511
167. Robinson HL (1999) DNA vaccines: basic mechanisms and immune response. *Int J Mol Med* 4: 549-555
168. Manickasingham SP, Edwards AD, Schulz O, Reis e Sousa C (2003) The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol* 33: 101-107
169. Merad M, Sugie T, Engleman EG, Fong L (2002) In vivo manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity. *Blood* 99: 1676-1682
170. Sato M, Iwakabe K, Kimura S, Nishimura T (1999) Functional skewing of bone marrow-derived dendritic cells by Th1- or Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 67: 63-68
171. Mosca PJ, Hobeika AC, Colling K, Clay TM, Thomas EK, Caron D, Lyerly HK, Morse MA (2002) Multiple signals are required for maturation of human dendritic cells mobilized in vivo with Flt3 ligand. *J Leukoc Biol* 72: 546-553
172. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner H (1996) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 14: 207-232
173. Lee SH, Bar-Haim E, Machlenkin A, Goldberger O, Volovitz I, Vadai E et al. (2004) In vivo rejection of tumor cells dependent on CD8 cells that kill independently of perforin and FasL. *Cancer Gene Ther* 11: 237-248
174. Westermann J, Nguyen-Hoai T, Mollweide A, Richter G, Schmetzer O, Kim HJ, Blankenstein Th, Dörken B, Pezzutto A (2004) Flt-3 ligand as adjuvant for DNA vaccination augments immune responses but does not skew TH1/TH2 polarization. *Gene Ther* 11: 1048-1056
175. Zöller M, Christ O (2001) Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination. *J Immunol* 166: 3440-3450
176. Yanagawa Y, Onoé K (2002) CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 100: 1948-1956
177. Yanagawa Y, Onoé K (2003) CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant upregulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* 101: 4923-4929
178. Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Nagura H, Yoshi O, Motegi K (2003) Differential expression of CCL19 by DC-Lamp+ mature dendritic cells in human lymph node versus chronically inflamed skin. *J Pathol* 199: 98-106
179. Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier B (2005) Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol* 7: 373-380
180. Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinhold FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, Haraldsen G (2001) The CCR7 ligand ELC (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193: 1105-1111
181. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG (1998) Epstein-Barr-Virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 188: 181-191

182. Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y (1998) EB11/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is upregulated upon maturation. *J Immunol* 161: 3096-3102
183. Lebre MC, Burwell T, Vieira PL, Lora J, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Clausen BE, De Jong EC (2005) Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* 83: 525-535
184. Eo SK, Lee S, Kumaraguru U, Rouse BT (2001) Immunopotential of DNA vaccine against herpes simplex virus via co-delivery of plasmid DNA expressing CCR7 ligands. *Vaccine* 19: 4685-4693
185. Toka FN, Gierynska M, Rouse BT (2003) Codelivery of CCR7 ligands as molecular adjuvants enhances the protective immune response against herpes simplex virus type 1. *J Virol* 77: 12742-12752
186. Hillinger S, Yang SC, Zhu L, Huang M, Duckett R, Atianzar K, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM, Sharma S (2003) EBV-induced molecule 1 ligand chemokine (ELC/CCL19) promotes ifn-g-dependent antitumor responses in a lung cancer model. *J Immunol* 171: 6457-6465
187. Hillinger S, Yang SC, Batra RK, Strieter RM, Weder W, Dubinett SM, Sharma S (2006) CCL19 reduces tumour burden in a model of advanced lung cancer. *Br J Cancer* 94: 1029-1034
188. Finn OJ (2003) Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3: 630-641
189. Hellstrom KE, Hellstrom I (2003) Novel approaches to therapeutic cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2: 517-532
190. Leen AM, Rooney CM, Foster AE (2006) Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 27: (Epub ahead of print)



## **8. Danksagung**

Für die langjährige wohlwollende Unterstützung und Förderung möchte ich meinem Chef, Herrn Prof. Dr. med. B. Dörken, und insbesondere auch Herrn Prof. Dr. med. A. Pezzutto ganz herzlich danken.

**ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum.....  
Unterschrift