

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Frequenzanalyse von tumorspezifischen T-Zellen nach
Hybridzellvakzinierung bei Melanompatienten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité -Universitätsmedizin Berlin

von

Karolina Wohlan
aus Wroclaw

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. med. U. Trefzer

2. Prof. Dr. med. K. Possinger

3. Prof. Dr. med. E. Späth-Schwalbe

Datum der Promotion: 19.03.2010

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
.....	5
TABELLENVERZEICHNIS.....	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 DAS MALIGNEN MELANOM	8
1.2 IMMUNANTWORT GEGEN TUMOREN	9
1.2.1 Zytotoxische T-Lymphozyten	9
1.3 TUMORANTIGENE	11
1.3.1 Melanom-assoziierte Antigene (MAA).....	12
1.3.2 Tumor/Testis Antigene.....	12
1.3.3 Melanozytäre Differenzierungs-Antigene.....	13
1.3.4 Mutierte oder aberrant exprimierte Antigene	15
1.4. TUMOR ESCAPE MECHANISMEN	15
IMMUNTHERAPIEN BEIM MALIGNEN MELANOM	18
1.5.1 Hybridzell-Vakzination.....	19
1.6. IMMUNMONITORING	20
1.6.1 Intrazelluläre Zytokinfreisetzung.....	20
2. FRAGESTELLUNG.....	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1. MATERIALIEN	23
3.1.1 Peptide.....	23
3.1.2 Antikörper.....	24
3.1.3 Patientenmaterialien	24
3.1.4 Immunkompetenztest.....	24
3.2. METHODEN.....	25
3.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut.....	25
Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
3.2.3 Durchflußzytometrie.....	26
Funktionelle Analyse von Lymphozyten.....	27
Auswertung der Messungen.....	28
.....	28
4. ERGEBNISSE.....	29
4.1. PATIENTEN	29
4.2 THERAPIEKONZEPT.....	29
4.3 KLINISCHES ANSPRECHEN.....	30
4.4 FREQUENZANALYSE DER PEPTID-SPEZIFISCHEN CD8+ T-ZELLEN UNTER THERAPIE.....	33

<i>Frequenzanalysen bei Patienten behandelt mit 1x10⁷ Hybridzellen subcutan oder intranodal</i>	35
<i>Frequenzanalyse bei Patienten behandelt mit 3x10⁷ Hybridzellen intranodal oder subcutan</i>	45
4.5 VERGLEICH DER 1X 10 ⁷ HYBRIDZELLVAKZINE UND DER 3X10 ⁷ HYBRIDZELLVAKZINE	52
5. DISKUSSION	60
5.1 IMMUNTHERAPIEN BEIM MALIGNEN MELANOM.....	60
5.2. HYBRIDZELL VAKZINATION	62
5.3 BEDEUTUNG DER FREQUENZANALYSE ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN	64
6. ZUSAMMENFASSUNG	66
7. LITERATURVERZEICHNIS	67

Abkürzungsverzeichnis

AICD:	activation induced cell death
APC:	antigen presenting Cell
BFA:	Brefeldin A
CDNA:	complementary Desoxyribonucleic acid
CMV:	Cytomegalie Virus
CT TAA:	Cancer/testis Tumour-associated Antigen
CTL:	cytotoxic T-Lymphocyte
DC:	dendritische Zellen
DMSO:	Dimethylsulfoxid
FACS:	Fluorescence-activated Cell Sorter
FKS:	fötales Kalbserum
HLA:	Human Leukocyte Antigen
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
KIR:	Killer inhibitory receptor
mAK :	monoklonaler Antikörper
MHC:	Major-histocompatibility-complex
MM:	malignes Melanom
NK:	natürliche Killerzellen
NO:	Stickstoffmonoxid
pCTL:	precursor CTL
PBMC:	peripher blood mononuclear cell
PBS:	phosphale buffered saline
PFA:	Paraformaldehyd
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RT:	Raumtemperatur
TCR:	T-cell-Rreceptor
TH:	T-Helfer Zelle
TIL:	Tumor infiltrierender Lymphozyt
TNF:	Tumornekrose Faktor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete HLA A1 und HLA A1 restringierte Peptide

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper

Tabelle 3: Ermittlung der benutzten Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 4: Patienten, die in die Untersuchung eingeschlossen wurden mit klinischen Daten

Tabelle 5: Frequenzen der peptidspezifischen CD8+/CD69+, IFN γ - produzierenden Zellen im peripheren Blut bei Pat. Nr. 18 vor Vakzination (0h) und jeweils 24h und 48h nach Vakzination

Tabelle 6: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 7 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Tabelle 7: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 10 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Tabelle 8: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 13 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Tabelle 9: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 17 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Tabelle 10: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 23 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Tabelle 11: %CD8+/CD69+ und IFN γ - produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 16 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: FACS Analyse bei Patient Nr. 7. 2. Vakzinationszyklus, 24h nach Injektion

Abbildung 2: Prozentsatz der CD8+CD69+IFN γ + Zellen im Zeitverlauf der Vakzinierung bei Patient Nr. 18

Abbildung 3: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 15

Abbildung 4: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 16

Abbildung 5: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 17

Abbildung 6: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 19

Abbildung 7: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 20
Abbildung 8: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 21
Abbildung 9: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 14
Abbildung 10: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 22
Abbildung 11: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 23
Abbildung 12: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 24
Abbildung 13: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 25
Abbildung 14: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 26
Abbildung 15: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 27
Abbildung 16: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 28
Abbildung 17: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 29
Abbildung 18: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 1
Abbildung 19: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 2
Abbildung 20: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 3
Abbildung 21: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 4
Abbildung 22: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 5
Abbildung 23: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 6
Abbildung 24: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 7
Abbildung 25: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 8
Abbildung 26: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 9
Abbildung 27: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 10
Abbildung 28: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 11
Abbildung 29: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 12
Abbildung 30: Frequenzdarstellung der CD8+/CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 13

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (MM) ist ein von den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut ausgehender Tumor, der sich primär an der Haut, aber auch an Schleimhäuten, Netzhaut und Hirnhäuten manifestiert und sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasiert kann. Lokal streut das Melanom um den Primärtumor in Form von „Satelliten Metastasen“ oder in Richtung der regionalen Lymphknoten (In-Transit-Metastasen). Fernmetastasen finden sich hauptsächlich an der Haut, in der Lunge, der Leber und im Gehirn. Eine Stadieneinteilung erfolgt beim Melanom nach klinischen und histologischen Kriterien, wobei die Tumordicke nach Breslow das wichtigste histologische Kriterium für die Prognosevorhersage ist. Die Stadien I a bis II c sind durch eine Tumordicke von $<1\text{mm}$ bis $>4\text{mm}$ definiert und können sowohl ulzeriert als auch nicht ulzeriert auftreten, allerdings finden sich keine Metastasen. Die Stadien III a bis III c sind durch Mikrometastasen, Satellitenmetastasen, In-Transit-Metastasen oder Lymphknotenmetastasen charakterisiert, während das Stadium IV durch die Diagnose von Fernmetastasen festgelegt ist ¹. Therapiert wird das MM durch chirurgische Exzision, die bei Metastasierung durch Chemotherapie und Immuntherapie unterstützt werden kann. Die Zehn-Jahres Überlebensrate beträgt im Stadium I a/ II c 98%-32%, im Stadium IIIa bis IIIc 32% bis 19% und im Stadium IV 3% ^{2,3}.

Das MM macht ca. 2% aller malignen Neuerkrankungen in Deutschland aus und ist durch eine steigende Inzidenz in den letzten Jahrzehnten aufgefallen. Die Neuerkrankungsrate hängt stark mit der geographischen Region und dem einzelnen Hauttypus zusammen, so beträgt sie in Australien z.B. >40 pro 100.000 Einwohner pro Jahr und in Mitteleuropa 12 -15 pro 100.000 Einwohner pro Jahr ⁴⁻⁶.

Die Inzidenz nimmt jährlich zwischen 4%-8% zu, das bedeutet, die Verdopplungsrate liegt bei 10-15 Jahren ⁷.

Zu den Risikofaktoren des MM zählen übermäßige UV-Licht Exposition während der Kindheit ¹⁴, kongenitale Naevi, wobei es auf Anzahl und Größe ankommt, dysplastische Naevi und eine positive Familienanamnese ⁸. Sichere virale oder chemische Karzinogene konnten bisher nicht definiert werden.

1.2 Immunantwort gegen Tumoren

Bei der Entstehung eines Melanoms gibt es klinische, histologische und immunologische Phänomene, die darauf hinweisen, dass ein intaktes Immunsystem in der Lage ist, der Tumorgenese entgegenzuwirken oder bestehende Tumorzellen zu zerstören.

So zeigen Patienten, die transplantiert wurden und eine immunsuppressive Therapie erhalten haben, eine erhöhte Inzidenzrate von Hauttumoren. So zeigten nach einem Jahr 7 % der Patienten einen Hauttumor, nach elf Jahren 45% und nach zweiundzwanzig Jahren 70% der Patienten einen Hauttumor⁹. Ferner konnten bei Melanompatienten, die mit in vitro aktivierten T-Lymphozyten behandelt wurden, in einzelnen Fällen eine Reduktion der Tumormasse festgestellt werden¹⁰. Bei in den letzten Jahren entwickelten und eingesetzten Immuntherapien konnte in Einzelfällen von positiven Therapieergebnissen berichtet werden¹¹⁻¹³. Beim Malignen Melanom sind tumorspezifische zytotoxische T- Lymphozyten (*CTL – engl.: cytotoxic T- lymphocyte*) zentral für eine Anti-Tumor Immunantwort¹⁴. Für die Entwicklung von Immuntherapien beim MM sind die Induktion und Aktivierung dieser Haupteffektorzellen von großer Wichtigkeit.

1.2.1 Zytotoxische T-Lymphozyten

Bei der Induktion der CTL sind drei Zelltypen beteiligt, die miteinander interagieren müssen: CTL-Vorläufer Zellen (pCTL- engl.: *precursor CTL*), CD4⁺ T- Helfer-Lymphozyten (T_H) und Antigen-präsentierende Zellen (APC- engl.: *antigen presenting cell*). Um ein Antigen erkennen zu können, muss es den CD4⁺ und CD8⁺- Lymphozyten im Zusammenhang mit dem MHC-Peptid-Komplex (MHC-engl.: Major-Histocompatibility- Complex) präsentiert werden, und dieser Komplex muss vom T-Zell-Rezeptor (TCR-engl. *T cell receptor*) erkannt werden.

APCs, wie z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen, können Antigene sowohl über MHC Klasse I Moleküle den CD8⁺ T-Zellen als auch über MHC Klasse II Moleküle den CD4⁺ T-Zellen präsentieren. Hinzu kommt, dass auf der Oberfläche der APCs kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimiert werden, die mit ihren entsprechenden Liganden auf den T-Zellen in Kontakt treten und gemeinsam mit dem TCR-MHC-Peptid-Komplex die Zelle aktivieren¹⁵. Die Aktivierung ist insgesamt

abhängig von dem Zusammenspiel vieler einzelner Faktoren, wie der Antigendichte, der Anzahl der kostimulatorischen Moleküle oder auch der Anzahl der TCR-Moleküle¹⁶. Nach Aktivierung differenzieren naive CD4⁺ Zellen entweder zu TH₁- oder TH₂- Zellen, die jeweils unterschiedliche Zytokine synthetisieren und freisetzen. Diese Zytokine steuern, ob eine humorale (Antikörper-vermittelte) oder eine CTL-vermittelte Antwort induziert wird¹⁷. TH₁- Zellen produzieren vor allem Interleukin 2 (IL-2), Interferon-γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α). Dies sind proinflammatorische Zytokine, die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von CTLs unterstützen. TH₂- Zellen wiederum sezernieren IL-4, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, welche vor allem B-Zellen aktivieren und CTLs inhibieren¹⁸. Die jeweilige Sekretion der Zytokine beeinflusst entscheidend die Entwicklung der Immunantwort; so produzieren durch den Einfluss der TH₁- Zytokine die Makrophagen und dendritischen Zellen Interleukin-12 (IL-12). IL-12 wiederum fördert die Differenzierung der CD4⁺ zu TH₁-Zellen. B-Zellen, die durch eine TH₂ vermittelte Antwort vermehrt aktiviert werden, sezernieren IL-4, welches die Differenzierung der naiven CD4⁺ Zellen in Richtung TH₂- Zellen stimuliert. Es sind allerdings auch TH-Zellen nachgewiesen worden, die beiden Gruppen zuzuordnen sind.

Wahrscheinlich sind drei Signale daran beteiligt CTLs aus pCTLs zu induzieren:

- 1.) eine Antigen-spezifische Stimulation des TCR nach Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes
- 2.) ein kostimulatorisches Signal vermittelt u.a. durch CD28 - CD80/CD86 Interaktion
- 3.) ein Signal, das über die Interaktion von IL-2 mit dem IL-2 Rezeptor (IL-2R) induziert wird.

Dies führt zur Differenzierung und Proliferation der Effektor-CTL. Nicht aktivierte pCTLs produzieren kein IL-2 oder IL-2R, proliferieren nicht und zeigen keine zytotoxische Aktivität. Die Expression des IL-2R und die Produktion geringer Mengen IL-2 werden über die Aktivierung durch ein Antigen herbeigeführt. Das zusätzlich benötigte IL-2 wird von den aktivierten TH₁ produziert. Die APCs präsentieren sowohl den T_H-Zellen als auch den CTLs die jeweils spezifischen Antigene im MHC Klasse I bzw. MHC Klasse II Molekül. Die APC wird über einen CD40-40L Kontakt mit der T_H-Zelle „aktiviert“ und gibt dieses Signal dann, durch Expression von kostimulatorischen Molekülen, an die CTL weiter¹⁹.

Durch verschiedene Interaktionen zwischen den oben erwähnten Zellen wird so die Effektivität der CTLs gesteigert und gleichzeitig der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD-engl.: activation induced cell death) inhibiert²⁰.

Die CTLs exprimieren nach Aktivierung unter anderem CD54 (ICAM-1, Adhäsionsmolekül) und CD44 (H-CAM, Adhäsionsmolekül), die eine Rolle beim *homing* zu den peripheren lymphatischen Organen und zu den Entzündungsstellen spielen. Nach der Reifung wandern die CTLs in die Peripherie. CTLs produzieren IFN γ und TNF α , wodurch die Expression der MHC-Moleküle auf den APCs erhöht wird. Die CTLs zerstören ihre Zielzellen durch mehrere Mechanismen, zum Beispiel durch die Freisetzung von zytotoxischen Enzymen aus Granula oder durch Expression von Rezeptoren wie CD95, die die Apoptose induzieren²¹. Die zytotoxischen Granula enthalten unter anderem Perforine und Granzyme, die nach Antigenkontakt ausgeschüttet werden und zur Apoptose der Zellen führen^{22,23}. Die CTLs haben mehrere Mechanismen, die aber noch nicht vollständig erforscht sind, entwickelt, um sich selbst vor den Enzymen zu schützen²⁴. Stark aktivierte CTLs sind durchaus in der Lage, mehrere Zielzellen zu zerstören. Die meisten CTLs werden nach Ihrer „Effektorphase“ durch AICD eliminiert, wobei einige CTLs dem entgehen können und zu Gedächtniszellen differenzieren, die viele Jahre überdauern können²⁵.

1.3 Tumorantigene

Antigene, die von Tumorzellen exprimiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden, bezeichnet man als Tumorantigene²⁶. Diese werden von Tumorzellen und spezialisierten APC über MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle den CD8+ bzw. den CD4+ T-Zellen präsentiert.

Generell unterscheidet man Tumor-spezifische Antigene, Tumor assoziierte Antigene und Differenzierungs-Antigene. Tumore, deren Antigene über zytotoxische T-Zellen eine Immunantwort induzieren, werden als stark immunogen bezeichnet, dazu zählt z.B. das maligne Melanom. Somit sind die Identifizierung von Tumorantigenen und die Charakterisierung der spezifischen Peptidsequenzen, welche die T-Zell Reaktionen auslösen, wichtig für die Entwicklung von Immuntherapien²⁷.

1.3.1 Melanom-assoziierte Antigene (MAA)

Die beim malignen Melanom identifizierten Tumor-Antigene wurden in 3 Gruppen eingeteilt ²⁸.

1. Tumor assoziierte Tumor/Testis Antigene (u.a. MAGE, BAGE, GAGE und NY-ESO-1)
2. melanozytäre Differenzierungs Antigene (u.a. Tyrosinase, MelanA/MART und gp100)
3. mutierte oder aberant exprimierte Antigene (u.a. β -Catenin, MUM-1, p15)

1.3.2 Tumor/Testis Antigene

Das erste durch T-Zellen erkennbare Tumor/Testis-Antigen, MAGE-1, wurde 1991 von van der Bruggen et. al. beschrieben ²⁹. Tumor/Testis spezifische Antigene (C/T TAA – engl.: *Cancer/Testis tumour-associated Antigens*) werden in den Testes und von zahlreichen malignen Tumoren exprimiert ³⁰. Die genetische Information ist hauptsächlich in Form von Multigen-Familien der MAGE-Gruppe sowie der BAGE-, GAGE- und PRAME-Gruppe auf dem X-Chromosom lokalisiert ³¹. Insgesamt wurden bisher weit über 40 verschiedene Antigene mit gleichem Expressionsmuster, wie z.B. NY-ESO-1 ³² oder SSx2/HOM-MEL-40 ³³, identifiziert und deren Expression auf unterschiedlichen Tumoren untersucht ³⁴. Sowohl MAGE-1 als auch MAGE-3 werden in hohem Maße in kutanen Melanomen exprimiert. So wurde in 75% aller primären Melanome eine MAGE-3 Expression nachgewiesen ³⁵. Allerdings findet man MAGE-3 auch in 44% der Blasenkarzinome, in 36% der „Head and Neck“ Tumoren und in bis zu 60% der Sarkome ³⁴.

Es wurde auch eine geringe Expression von MAGE-1 in anderen Tumoren wie Prostatakarzinom, Mamakarzinom, Ösophaguskarzinom oder Lungenkarzinom gefunden ³⁶. Beim Leberzellkarzinom konnte eine MAGE-1- Expression bei ca. 80% nachgewiesen werden ³⁷. Untersuchungen ergaben für das MAGE-3 Genprodukt eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation, während das MAGE-1 Genprodukt nur eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist ³⁸. Es wird eine wachstumshemmende Funktion des Proteins vermutet, da eine negative Korrelation zwischen der Expression des MAGE-3 Genprodukts und der proliferativen Kapazität der Melanomzellen nachgewiesen wurde. Die Ähnlichkeit zwischen dem Tumor-Suppressorprotein p53 und

dem MAGE-Protein ist auffällig, was vermuten lässt, dass die MAGE-Proteine ebenfalls an der Kontrolle der Proliferation der Tumorzellen beteiligt sein könnten³⁹.

NY-ESO-1, ein weiteres C/T-TAA, wurde durch die serologische Analyse von rekombinanten cDNA-Expressionsbibliotheken (engl: *complementary desoxyribonucleic acid*) der Keimbahngene mit autologen Antikörpern nachgewiesen^{32,40}.

NY-ESO-1 gehört zu den immunogensten Antigenen und wird in 34% der Melanome, in 30% der Mamakarzinome und in fast 80% der Blasenkarzinome exprimiert⁴¹.

Warum die Expression der C/T – TAA auf Tumoren stattfindet ist noch nicht geklärt⁴².

Es wurde festgestellt, dass Substanzen, die DNA - demethylisierend wirken, die Expression verstärken^{43,44}. So konnte auch eine Demethylierung der Promoterregion für die Gene der MAGE- sowie der GAGE-Gruppen nachgewiesen werden. Diesem Vorgang folgt ein Prozess, bei dem eine allgemeine Demethylierung der DNA stattfindet³¹. Demethylierung der DNA kann z.B. Chromosomen-Instabilität oder fehlerhafte Transkription zur Folge haben⁴⁵.

Die C/T-TAAs ermöglichen interessante Ansatzpunkte für Immuntherapien, da sie spezifische Immunantworten induzieren können und, bis auf die Keimbahnzellen in den Testes, nur in malignen Zellen exprimiert werden. Die Keimzellen würden durch eine Immuntherapie nicht mitgeschädigt werden, da sie keine MHC Klasse I Moleküle exprimieren, somit die Antigene nicht präsentieren und dadurch als Zielstruktur nicht in Frage kommen⁴⁶.

Wenn auch immer wieder einzelne ansprechende Patienten beobachtet werden, so sind die Ergebnisse der bisherigen Immuntherapien eher enttäuschend⁴⁷. Die Ursachen können zum Teil an der geringen Immunogenität der Antigene oder auch an verschiedenen Tumor-Escape Mechanismen liegen.

1.3.3 Melanozytäre Differenzierungs-Antigene

Durch CTL- Linien und –Klone wurden Peptide von Proteinen nachgewiesen, die während der Differenzierung von Melanozyten exprimiert werden⁴⁸. Diese Differenzierungs-Antigene wurden sowohl in Tumorzellen als auch in den unveränderten Zellen des Gewebes, aus denen der Tumor entstanden ist, gefunden⁴⁹.

Als erstes melanozytäres Differenzierungs-Antigen, das von spezifischen CTLs erkannt wird, ist Tyrosinase beschrieben worden^{50,51}. Tyrosinase ist ein aus 529 Aminosäuren bestehendes Protein, das an der Melaninsynthese beteiligt ist⁵². Das besondere an

Tyrosinase ist, dass neben den CD8+ T Zellen auch den CD4+ Zellen über MHC Klasse II Moleküle einzelnen Epitope des Antigen präsentiert werden⁵³. Nachgewiesen wurde dieses Antigen durch Tumor-infiltrierende Lymphozyten, aus denen man CD4+ Zellen isolierte, die fähig waren, die Epitope zu erkennen. Allgemein ist eine Tyrosinase spezifische Immunantwort eher selten und wurde bisher nur bei Patienten beobachtet, die generell auf viele Antigene mit Immunreaktionen reagierten^{54,55}.

Die häufigsten Immunreaktionen wurden gegen das Antigen Melan A / MART-1 bei HLA-A*0201-positiven Patienten festgestellt⁵⁶. Es handelt sich um ein 118 Aminosäuren großes Protein, dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist⁵⁷. Als ein immundominantes Epitop für Tumor-spezifische TILs (*Tumor infiltrierende Lymphozyten*) erwies sich die Epitopsequenz AAGIGILTV⁵⁸. So konnten *in vitro* aus PBMCs (engl.: *peripher blood mononuclear cells*) von Melanom Patienten und von gesunden Probanden Peptid-spezifische CTL-Klone induziert werden⁵⁹. Andere Melan A / MART-1 Peptide mit einer höheren Affinität für das HLA-A*0201 Molekül konnten keine CTLs induzieren.

Es müssen demnach T-Zellen mit einem stark affinen TCR für körpereigene Antigene und T-Zellen mit einem niedriger affinen TCR vorhanden sein. Generell zeigen die Melan A/MART-1 Peptide die höchste Immunogenität mit einer effektiven Induktion von Tumor-spezifischen CTLs⁵⁹. Jedoch konnte die Funktion der induzierten CTLs nur in vereinzelten Fällen mit einer Tumorregression in Verbindung gebracht werden⁶⁰.

Bei gp100 handelt es sich um ein 661 Aminosäuren großes Glykoprotein, das bei der Melaninsynthese eine enzymatische Funktion übernimmt. Das Protein wurde sowohl durch die Untersuchung von cDNA Expressionsbibliotheken mit Melanom-spezifischen Zellen als auch durch die Elution und Identifizierung von Peptiden eines HLA-A*0201 positiven Melanoms nachgewiesen^{61,62}. In den letzten Jahren wurden mehrere CTL-Epitope, die HLA-A*0301 und HLA-A*24 restingiert sind, beschrieben^{63,64}.

Das Antigen gp100 fällt durch eine signifikante Korrelation zwischen T-Tell Erkennung *in vitro* und der Tumorregression von Patienten, die mit entsprechenden TILs behandelt worden sind, auf und ist somit für eine Immuntherapie sehr interessant⁶³.

Generell wird den Differenzierungsantigenen eine geringe Immunogenität zugeschrieben. Es wird eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen vermutet, die eine Tumorabwehr verhindern könnte⁶⁵. Die Anergie kann aber auch durch fehlende Kostimulation induziert werden. Allerdings konnte in einzelnen Fällen eine spezifische Immunantwort beobachtet werden, die sich unter anderem durch eine unter

Therapie entstandene Vitiligo äußerte. Da die Differenzierungs-Antigene auch von normalen Melanozyten exprimiert werden, wurden auch diese eliminiert^{66,67}.

1.3.4 Mutierte oder aberrant exprimierte Antigene

Ebenfalls zu den MAAs zählen mutierte Melanom-spezifische Antigene, die von Melanomzellen, nicht aber von gesunden Melanozyten exprimiert werden⁶⁸. Da diese Antigene häufig in Primärtumoren zu finden sind und sie eventuell für Entstehung sowie Progression des Tumors zuständig sind, hat ihre Erforschung einen großen Stellenwert. Man vermutet, dass Mutationen von Onkogenen, Tumor-Suppressor-Genen oder Zell-Zyklus regulierenden Genen für die Tumortransformation verantwortlich sein können^{69,70}. Wenn Mutationen in regulatorischen Bereichen der Onkogene vorhanden sind, kann es zur Dysregulation des Zellzyklus kommen. Auch Punktmutationen können zu einem Aminosäureaustausch oder einer Verschiebung des Leserasters innerhalb des Gens führen⁷¹. Wird das kodierende Gen dennoch transkribiert und die mRNA translatiert, können die Peptidfragmente von den MHC- Molekülen präsentiert werden und eine Immunantwort auslösen.

Epitope aus Intron-Bereichen und Peptide aus kryptischen Translationsprodukten können ebenfalls über MHC-Moleküle präsentiert werden und Antigene für CTLs darstellen^{72,73}. Die genaue Funktion oder Bedeutung dieser Antigene ist bis heute noch nicht bekannt, jedoch ist deutlich, dass es sich um einzelne Veränderungen handelt, die demnach bei jedem Patienten individuell sind.

Die Erforschung Tumor assoziierter Antigene bietet neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Immunotherapien und hilft, die komplexen Mechanismen zwischen Immunsystem und Tumorgenese besser zu verstehen.

1.4. Tumor escape Mechanismen

Obwohl zahlreiche Immunantworten gegen Melanomzellen gefunden wurden, wird bei einigen Patienten eine Progression der Erkrankung beobachtet. Trotz weitgehend intaktem Immunsystem wächst der Tumor. Die genauen Ursachen sind noch nicht gefunden worden, allerdings gibt es mehrere Hypothesen, wie ein Tumor sich der Immunüberwachung entziehen kann.

Der Tumor kann z.B. eine geringe Immunogenität aufweisen, sowohl durch

HLA –Verlust, HLA-Herunterregulation, aberante Expression von HLA-Molekülen als auch durch inadäquate Expression von kostimulatorischen Molekülen wie z.B. CD80/CD86^{74,75}. Es wurden auch Defekte in der Antigen-Prozessierung und deren Präsentation nachgewiesen, die dazu führen, dass CTLs die Tumorzellen nicht erkennen und zerstören können^{76,77}. Diese Prozesse sind gerade beim Melanom des öfteren beschrieben worden. Es wurden auch Tumorvarianten nachgewiesen, vor allem nach Antigen-spezifischen Immuntherapien, die *in vivo* einen Antigen- oder HLA-Verlust aufweisen⁷⁸. Demnach kann es *in vivo* zu einer Selektion und zum Wachstum von Antigen-negativen Tumorzellen kommen. Jedoch wird von Fällen berichtet, in dem es zu einem Fortschreiten der Krankheit und einem Ausbleiben der Immunreaktion nach Therapie kommt, obwohl Antigen- und HLA-exprimierende Tumorzellen vorhanden waren. Es müssen also noch weitere Tumor-escape Mechanismen in Betracht gezogen werden⁷⁹.

So kann z.B. die Sekretion immunsuppressiver Substanzen wie Zytokinen, Prostaglandinen und anderen Verbindungen die Aktivität der CTLs stark beeinträchtigen⁸⁰. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die NO-Sekretion von Melanom-Metastasen inhibierend auf die T-Zell vermittelte Immunreaktion wirkt⁸¹. Eine effiziente T-Zellantwort kann auch durch die Umgebung des Tumors (Tumor microenvironment) verhindert werden. Enzyme und Zytokine interagieren mit den Geweben, wodurch sich die lokale extrazelluläre Matrix verändern kann. Das Migrationsverhalten von Zellen wird beeinflusst und damit die Proliferation und Überleben der Tumorzellen ermöglicht⁸².

Durch die Expression von pro-apoptotischen Molekülen wie FasL auf der Tumorzelle wird das Immunsystem ebenfalls beeinträchtigt. Der Fas-Ligand (FasL) gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und induziert nach Kontakt mit Fas-exprimierenden Zellen deren Zelltod⁸³. Die Expression von FasL in Melanom-Metastasen wird während der Erkrankung hochreguliert und somit können aktivierte, Fas-exprimierende T-Zellen zerstört werden^{84,85}. Es wurde beschrieben, dass FasL die Immunantwort von neutrophilen Zellen über noch unbekannte Mechanismen supprimiert⁸⁶. Man könnte vermuten, dass die Expression von FasL zu den Hauptmechanismen des *Immune escapes* gehört. Allerdings wurden beim Melanom CD4+ und CD8+ T-Zellklone nachgewiesen, die gegen FasL-induzierte Apoptose resistent sind⁸⁷. Auch andere Arbeiten konnten nachweisen, dass der FasL Mechanismus keine zentrale Rolle im *Immune Escape* des Melanoms spielt⁸⁸.

Bei den Tumor-Antigenen handelt es sich um körpereigene Antigene. Deswegen geht man davon aus, dass die CTL-Antwort wahrscheinlich kontrolliert wird und dementsprechend schwach ausfällt. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Autoreaktivität der Tumor-spezifischen T-Zellen durch physiologische Kontrollmechanismen unterdrückt wird und so eine Toleranz gegenüber Tumor-Antigenen entsteht⁸⁹. Eine zu niedrige IL-2 Produktion, eine niedrige Affinität des TCR für die Tumor-Peptide, fehlende Kostimulation und Expression von antagonistisch wirkenden Tumorpeptiden können eine Toleranz induzieren^{90,91}.

So wurden für das immundominante Peptid Melan A/ MART-1₂₇₋₃₅ natürliche analoge Peptide mit antagonistischer Wirkung nachgewiesen. Diese können *in vitro* die Wirkung der CTLs aufheben und eine Anergie induzieren, die dazu führt, dass IL-2 nicht mehr produziert wird⁹¹.

Auf NK-Zellen (natürliche Killer Zellen) werden Rezeptoren exprimiert, die eine regulatorische Funktion bei der Eliminierung von erkannten Zielzellen haben. So werden unter anderem KIRs (engl.: Killer inhibitory receptor) exprimiert, die spezifisch für bestimmte HLA-Moleküle sind und durch deren Bindung ein Aktivierungssignal verhindert werden kann⁹². Über solche Rezeptoren interagieren die NKs mit den jeweiligen Zellen und können über die Registrierung der Anzahl und Art der MHC-Moleküle körpereigene von körperfremden Zellen unterscheiden⁹³. Zellen, die z.B. die MHC Klasse I Moleküle herunterreguliert haben, was häufig bei Tumorzellen der Fall ist, werden meistens von NK- Zellen als „körperfremd“ erkannt und dann angegriffen⁹⁴. Es wurden auch NK-Rezeptoren auf Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen gefunden, die fähig sind, in die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen inhibitorisch oder aktivierend einzugreifen, und somit die Immunantwort beeinflussen^{94,95}. Die Expression dieser Rezeptoren scheint ein dynamischer Prozess zu sein, der durch verschiedene Zytokine beeinflusst wird. So induzieren IL-15, TGFβ und IL-10 inhibitorische Rezeptoren, wobei die beiden letzteren auch von Tumoren produziert werden⁹⁶.

Bei vielen untersuchten Melanomen wurde die Produktion von IL-10 nachgewiesen^{97,98}. IL-10 wirkt regulierend auf die Produktion der Th1-Zytokine (IL-2, IFNγ, TNFα) und kann somit die Aktivierung der CTLs verhindern. Insgesamt ist bei IL-10 eine regulatorische Wirkung auf die T-Zell-Proliferation bekannt⁹⁹.

Eine genaue Analyse der Tumor spezifischen T-Zellen ist somit von großer Bedeutung für das Verstehen der Tumorentwicklung sowie für die daraus entwicklungsfähigen Therapiekonzepte.

Immuntherapien beim malignen Melanom

In vielen Fällen wurde eine spezifische Immunantwort gegen Melanomzellen bei Patienten nachgewiesen¹⁰⁰. Zurzeit setzt man eine Antigenität des Tumors voraus, um Ansätze für Immuntherapien zu erforschen. Man versucht, das Immunsystem oder die Immunogenität des Tumors direkt oder indirekt zu steigern und eine Aktivierung und Expansion der zytotoxischen T- Effektorzellen zu bewirken. Zu den erprobten Immuntherapieansätzen zählen Vakzinationsversuche mit Peptiden, Hybridzellen, DNA, transgenen Vaccinia-Viren oder gentherapeutisch-modifizierte Tumorzellen und systemische oder lokale Interleukingaben^{101,102}. *In vitro* wurde die Anti-Tumor Aktivität von Tumor-spezifischen T-Zellen nachgewiesen. Jedoch hat man noch ungenügend Informationen über ihre Fähigkeit *in vivo* Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Durch einzelne klinische Erfolge bei Melanompatienten kann man allerdings von einer gewissen Effektivität ausgehen.

Es gibt unspezifische aktive Immuntherapien, die das Immunsystem generell aktivieren sollen. Patienten werden z.B. mit Zytokinen wie IL-2 behandelt, was auch in einzelnen Fällen zu einer komplettem oder partiellen Remission des Tumors führte¹⁰³.

Eine spezifische aktive Immuntherapie kann durch Vakzination mit bestrahlten autologen oder allogenen Tumorzellen, mit Tumorlysat gepulsten dendritischen Zellen oder mit Tumor-spezifischen Antigenen durchgeführt werden¹⁰⁴. Eine passive Immuntherapie kann mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern, mit Lymphokin-aktivierten Killerzellen oder mit TILs durchgeführt werden¹⁰⁵.

Um eine Antigenspezifische-Immuntherapie erfolgreich durchzuführen, müssen als Minimalkonsens bestimmte Kriterien erfüllt sein:

- 1.) die für die Therapie benutzten Antigene müssen vom Tumor exprimiert werden
- 2.) die MHC-Moleküle, die für die Aktivität der CTLs benötigt werden, müssen exprimiert werden
- 3.) das T-Zellrepertoire sollte auf die Antigene reagieren können.

Um eine optimale Stimulation der CTLs zu bewirken, kann man z.B. mit Hilfe von stimulatorischen Zytokinen eine Induktion erreichen. Es müssen allerdings auch andere Faktoren berücksichtigt werden. So muß eine bestimmte Anzahl von TCR-Molekülen

mit dem Peptid-MHC-Molekül in Kontakt treten, um eine Immunantwort auszulösen. Auch die Menge der exprimierten spezifischen Antigene ist entscheidend. Dementsprechend kann eine Herunterregulation der MHC-Moleküle die Immunantwort schwächen.

In verschiedenen Therapieansätzen wurde die Induktion einer spezifischen Antwort durch definierte Tumor-Antigene, zum Teil kombiniert mit immunstimulierenden Faktoren, untersucht. Es wurden bei diesen kombinierten Immuntherapien, wie zum Beispiel eine Peptid Vakzine in Kombination mit IL-2, öfters Erfolge erzielt als bei den Therapien, die nur mit spezifischen Peptiden durchgeführt worden sind ¹⁰⁶.

Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, welches der bekannten Antigene die effektivste Anti-Tumor-Antwort vermittelt und wie sie am besten eingesetzt werden sollte. Wichtig ist, dass während einer Immuntherapie die CTL-Funktion und Frequenz analysiert werden, um mehr über die ablaufenden Prozesse lernen zu können.

1.5.1 Hybridzell-Vakzination

Die Fusion aus autologen Tumorzellen und allogenen dendritischen Zellen (DC) von gesunden Spendern soll die Antigenität des Tumors und somit die Induktion der CTLs verstärken ¹¹²⁻¹¹⁴. Die Tumorzelle des Patienten präsentiert das gesamte Antigenpektrum des Tumors und dadurch verfügt die Vakzine auch über Informationen der tumorspezifischen Mutationen des einzelnen Patienten. Die Hybridzelle präsentiert sowohl über MHC Klasse I Moleküle als auch über vorhandene MHC Klasse II Moleküle, die Tumor-spezifischen Antigene. Dadurch wird eine intensivere Aktivierung der pCTLs induziert ^{115,116}. Es können demnach sowohl die CD4+ als auch die CD8+ vermittelten T-Zell Antworten ausgelöst werden. Ebenfalls werden sowohl bekannte Tumorantigene als auch auf diesen speziellen Tumor noch unbekannte Antigene präsentiert. Man geht also davon aus, daß unterschiedliche Wege des Immunsystems stimuliert werden.

Durch die an der Fusion beteiligten DCs werden kostimulatorische Moleküle auf der Hybridzelle präsentiert, die für eine effektive Stimulation der CTLs notwendig sind und die bewirken, dass der Tumor wieder als immunogen erkannt wird ¹¹⁷. Desweiteren geht man davon aus, dass bei vielen Tumorpatienten die immunologische Kapazität der dendritischen Zellen bereits beeinträchtigt ist und so wird das Immunsystem durch die immunkompetenten allogenen Zellen der gesunden Spender stimuliert.

Die Strategie der Hybridzell-Vakzine wurde zunächst erfolgreich an Tiermodellen eingesetzt^{118, 113}. Die Therapie führte zur Rückbildung der transplantierten Tumore und einer zum Teil langanhaltenden Immunität gegen den Tumor^{120, 121}. Es wurde zudem festgestellt, dass nur die fusionierten Tumor- und Antigen-präsentierenden Zellen einen Rückgang der Tumormasse und eine langanhaltenden Tumorimmunität induzierten, jedoch kokultivierte oder einfache Zellmixturen dieses nicht vermochten¹⁴³.

Die ersten klinischen Studien zu Hybridzellvakzinierung wurden bei Tumorpatienten im fortgeschrittenem Stadium durchgeführt. Dort zeigten sich selten komplette Remissionen, jedoch konnte bei vielen Patienten ein Tumorprogress unter Vakzinierung für längere Zeit aufgeschoben werden¹⁴².

Momentan erforschen mehrere Arbeitsgruppen die Optimierung des Konzepts der Hybridzell-Vakzinierung und deren klinische Umsetzung am Patienten^{122, 123}. So wurde zum Beispiel an einem Tiermodel ein deutlich verlangsamtes Tumorwachstum und unter anderem eine verstärkte Apoptose nachgewiesen, nachdem eine Kombination aus Hybridzellen-Vakzine und spezifischen T-Zellen injiziert worden war. In der untersuchten Tumormasse wurden nach der Vakzine zahlreiche CD4+ und CD8+ T-Zellen gefunden. Ebenfalls wurde bei den Mäusen eine vergrößerte Milz als Zeichen für eine verstärkte T-Zell Aktivität nachgewiesen¹⁴¹. Vielversprechend sind demnach Kombinationstherapien aus Hybridzellvakzinen und weiteren immuntherapeutischen Ansätzen.

1.6. Immunmonitoring

Die Analyse der CTL-Funktion und Frequenz vor und nach Therapie ist bei Immuntherapien notwendig. So sollte wenn möglich das Vorkommen dieser Zellen in mehreren Kompartimenten wie Tumor, peripherem Blut und Lymphknoten untersucht werden. Dafür gibt es mittlerweile mehrere Möglichkeiten wie z.B. die Limiting Dilution Analyse, der ELISPOT-Assay, der ⁵¹Cr- Freisetzungsversuch, Tertramerfärbungen oder die intrazelluläre Zytokinfreisetzung.

1.6.1 Intrazelluläre Zytokinfreisetzung

Durch die Durchflußzytometrie und Methoden zur Anfärbung intrazellulärer Zytokine haben sich neue Möglichkeiten zur Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen

ergeben. T-Zellen, die spezifisch aktiviert werden und ihr spezifisches Antigen erkennen, sezernieren Zytokine wie IFN γ , IL-2, IL-4 oder TNF- α . Durch die Zytokinexpressionsmuster kann man sowohl Lymphozyten-Subpopulationen und Störungen der normalen T-Zell Funktion nachweisen als auch die T-Zellen phänotypisch auf Einzelzellebene charakterisieren^{107,108}. Zunächst wurden diese Untersuchungen mit CMV-spezifischen Peptiden bei CMV-seropositiven (*CMV: Cytomegalie Virus*) Patienten durchgeführt und dann ebenfalls bei Tumor-spezifischen T-Zellen etabliert¹⁰⁹. Die Vollblutproben oder PBMC werden 4-6 Stunden mit Tumorantigenen unter Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A stimuliert, anschließend fixiert, permeabilisiert und intrazellulär mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern gegen die Zytokine angefärbt. Zusätzlich erfolgt eine Anfärbung der Oberflächenmarker mit T-Zell-spezifischen Antikörpern und dann die durchflußzytometrische Analyse. Von spezifischen T-Zellen aus Melanom-befallenen Lymphknoten wurden die Frequenzen der spezifischen CD8+T-Zellen gemessen. Für das Peptid Melan A/MART 1₂₇₋₃₅ lagen die Frequenzen zwischen 0-4,9%, für Tyrosinase₃₆₆₋₃₇₈ und für gp100₂₈₀₋₂₈₈ zwischen 0-9% bzw. 0-0,7%¹¹⁰.

2. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Frequenzanalyse von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen unter Immuntherapie bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom. Die Patienten wurden mit einer Hybridzell-Therapie behandelt, bei der allogene dendritische Zellen und autologe Tumorzellen fusionieren und zur Vakzine aufgearbeitet werden. Die Patienten wurden in vier Gruppen eingeteilt und erhielten entweder 1×10^7 Hybridzellen intracutan bzw. intranodal oder 3×10^7 Hybridzellen intracutan bzw. intranodal. Unter Verwendung durchflusszytometrischer Methoden wurde hierbei die spezifische Immunantwort im peripheren Blut der Patienten gemessen.

Die folgenden Fragen sollten beantwortet werden:

- Welche Immunantworten, gemessen an den Frequenzen tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen, werden durch die Hybridzellvakzinierung ausgelöst?
- Gibt es Unterschiede in Abhängigkeit von der Zahl der injizierten Hybridzellen?
- Gibt es Unterschiede in Abhängigkeit von der Art der Injektion der Hybridzellen?
- Gibt es eine Korrelation zwischen den Frequenzen tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen und dem Krankheitsverlauf der Patienten?

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1 Peptide

Die synthetischen Peptide wurden von Dr.Karl-Heinz Wiesmüller bei EMC Microcollections (Tübingen) hergestellt. Die präaktivierten Aminosäuren wurden an fester Phase mittels Fmoc Technik synthetisiert und anschließend per HPLC gereinigt. Durch Massenspektrometrie und HPLC wurde die Qualität der Peptide kontrolliert. Aufbewahrt wurden die Peptide bei -80°C in einer Stammlösung von 20mg/ml in DMSO. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

HLA-A2 restringiert

Antigen	Sequenz
MAGE-3 ₂₇₁₋₂₇₈	FLWGPRALV
Melan A/ MART-1 ₂₇₋₃₅	AAGIGILTV
Melan A/ MART-1 ₂₆₋₃₅	ELAGIGILTV
Tyrosinase ₃₆₆₋₃₇₈	YMNGTMSQV
gp100 ₁₅₄₋₁₆₂	KTWGQYWQV
gp100 ₂₈₀₋₂₈₈	YLEPGPVTA
gp100 ₄₇₆₋₄₈₅	VLYRYGSFSV
gp100 ₄₅₇₋₄₆₆	LLDGTATLRL
gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	ITDQVPFSV
CMVpp ₆₅	NLVPMVATV

HLA-A1 restringiert:

Antigen	Sequenz
MAGE-1 ₁₆₁₋₁₆₉	EADPTGHSY
MAGE-3 ₁₆₈₋₁₇₆	EVDOIGHLY
CMVpp ₆₅	NLVPMVATV

Tabelle 1: Verwendete HLA-A2 und HLA-A1 restringierte Peptide

3.1.2 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 unter Angabe ihrer jeweiligen Spezifität, des Klons und des Fluorochroms aufgelistet.

Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD3	SK7	Maus	IgG1	APC	Becton Dickinson
CD8	SK1	Maus	IgG1	PerCP	Becton Dickinson
CD69	L78	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
IFN γ	25723.11	Maus	IgG1	FITC	Becton Dickinson

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper

3.1.3 Patientenmaterialien

Natrium-Heparin Blut (20-40 ml) wurde den Patienten mit metastasiertem Melanom unmittelbar vor der Vakzinierung und jeweils 24 Stunden und 48 Stunden nach jeder in 4-Wochenabständen gegebenen Vakzinierung entnommen. Dieser Therapieversuch wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt und von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor,
Das Blut wurde unmittelbar nach Entnahme weiterverarbeitet und die PBMCs eingefroren.

3.1.4 Immunkompetenztest

Mit Hilfe des Multitest immignost® (Biosyn GmbH, Fellbach) wurde bei den Patienten vor der Vakzinierung die allgemeine Immunkompetenz bestimmt. Dieser Test enthielt 7 *Recall*-Antigene (Mérieux-Antigene), die bei vorangegangenen Impfungen oder Expositionen bei den meisten Menschen eine starke sekundäre Immunantwort induzieren. Dafür wurde Tetanus-Toxoid (550.000 U/ml), Diphtherie-Toxoid ($1,1 \cdot 10^6$ U/ml), Streptokokken-Antigen (2.000 U/ml), Alttuberkulin (300.000 U/ml), Candida-Antigen (2.000 U/ml), Trychophyton-Antigen (150 U/ml), Proteus-Antigen (150 U/ml) und Glycerin als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Jeder Stempel enthielt 30 µl der Antigen-Lösung wovon ca. 1 µl als intrakutane Injektion verabreicht wurde. Eine Rötung der Haut am jeweiligen Stempelabdruck 48 Stunden später wurde als positive zellvermittelte Immunität gewertet.

3.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium 1

RPMI 1640 mit Glutamax (Seromed, Berlin)

FKS 10% (engl.: *fetal calf serum*)

PBS

Phosphate buffered saline (10 x) (Seromed, Berlin)

1 : 10 mit aqua dest. verdünnt

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Den Patienten wurde Vollblut (20-40ml) mit Na-Heparin- versetzten Spritzen abgenommen. Aus dem Blut wurden die Lymphozyten mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Dazu wurden 2,5 Teile in PBS (engl.: *phosphate buffered saline*) verdünntes Blut auf 1 Teil Ficoll Paque (Pharmacia, Freiburg) geschichtet und 20 min. mit 600 x g bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 min.

bei 400 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten in 50 ml Zellkulturmedium 1 aufgenommen und nochmals für 10 min. bei 400 x g bei RT zentrifugiert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in 1 ml FCS und 10% DMSO (Serva, Heidelberg) bei einer Dichte von $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml aufgenommen und in einer mit Methanol gefüllten Einfrierbox (Nunc) bei -70° eingefroren. Dabei konnte ein kontrolliertes Absenken der Temperatur um ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$ gewährleistet werden. Gelagert wurden die Proben bei -140°C . Um mit den Zellen weiterarbeiten zu können, wurden sie schnell auf 37°C erwärmt dann mit Zellkulturmedium 1 in einer Verdünnung 1:50 versetzt und bei 400 x g, 10 min bei RT zentrifugiert. Daraufhin konnten die Zellen unter den für sie geeigneten Bedingungen weiter kultiviert werden.

3.2.3 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Lymphozyten zu untersuchen. Mit Fluorochromen besetzte Maus-Antikörper (*mAK*) sind geeignet, um die Expression und Dichte sowohl von Oberflächen, als auch von intrazellulären Rezeptoren festzustellen. Gleichzeitig werden dadurch die relative Zellgröße und die Granularität nachgewiesen.

Im Durchfluss werden die Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm oder 595 nm angeregt. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zur Streuung des Lichtes und zur Fluoreszenzlichtemission durch die Fluorochrome. Dieses gestreute und emittierte Licht wird von Photodetektoren erfasst. Gemessen wurden bei den Zellen das Vorwärtsstreulicht (Forward scatter FSC), welches für die Größe der Zelle steht, und das 90° -Streulicht, welches die Granularität erfasst. Die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurde in 90° - Richtung aufgenommen.

Die einzelnen Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3 aufgeführt. Dabei steht die erste Zahl für das Absorptionsmaximum und die zweite Zahl für das Emissionsmaximum der einzelnen verwendeten Farbstoffe.

Fluoreszenzfarbstoff 1: FITC	525/50 nm
Fluoreszenzfarbstoff 2: PE	575/25 nm
Fluoreszenzfarbstoff 3: PerCP	680/30 nm
Fluoreszenzfarbstoff 4: APC	660/40 nm

Tabelle 3 : Emittierungswellenlängen der benutzten Fluoreszenzfarbstoffe

Die Analysen erfolgten an einem FACS-Calibur™ (Becton Dickinson) mit der Software CellQuest™ (Becton Dickinson). Die für das Protokoll der funktionellen Analyse von Lymphozyten verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Funktionelle Analyse von Lymphozyten

Die Frequenz der antigen-spezifischen T-Zellen wurde aus isolierten PBMCs bestimmt. Um eine funktionelle Analyse der antigen-spezifischen T-Zellen von Lymphozyten aus dem peripheren Blut vornehmen zu können, wurde die intrazelluläre IFN γ Produktion nach Antigenstimulation gemessen ¹⁰⁸. Dazu wurden den Melanompatienten vor der Vakzinierung sowie 24 Stunden und 48 Stunden nach der Vakzinierung Blut entnommen und die PBMCs, wie (3.2.1 *Isolierung von Lymphozyten aus dem Blut und 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen*) beschrieben, weiterverarbeitet. Für die Frequenzanalyse wurden die Zellen ($2-3 \times 10^6$) in 500 μ l RPMI 1640 und 0,1% BSA aufgenommen, mit Peptiden (10 μ g/ml) versetzt und dann unter üblichen Kulturbedingungen in schräger Lage (5° Winkel) inkubiert. Nach einer Stunde wurden zu den Ansätzen 500 μ l RPMI 1640 mit 20% FCS und 10 μ g/ml BFA (*Brefeldin A*) hinzugefügt und die Inkubation fortgesetzt. Der Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat wird durch BFA inhibiert und dadurch kommt es zur Akkumulation von Proteinen in der Zelle ¹¹¹. Nach 5 Stunden wurde zu allen Ansätzen EDTA (1 mM) pipettiert und diese dann gevortext. Anschließend wurden die Ansätze 10-15 min. unter üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde nochmals gevortext und mit PBS gewaschen. Die Analyse von intrazellulären Molekülen erforderte, dass die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Daher wurden die Zellen mit FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) für 10 min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei handelt es sich um einen hypotonen Puffer, der auch für die Lyse von Erythrozyten verwendet wird und Paraformaldehyd (PFA) für

die Zellfixierung enthält. Nach einem Waschschrift mit PBS/0,1% BSA/0,1%NaN₃ erfolgte die Inkubation mit FACS™ Permeabilization Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) für 10 min. bei RT im Dunkeln. Dieser Puffer enthielt ebenfalls PFA und zusätzlich noch das Detergenz Saponin, welches die Zellmembran permeabilisiert. Dann wurden die Zellen wieder mit PBS/0,1% BSA/0,1%NaN₃ gewaschen und mit den mAK (monoklonale Antikörper), siehe Tabelle 2, 30 min. bei RT und im Dunkeln inkubiert.

Als Referenzen wurden auch Ansätze ohne Peptitstimulation und Ansätze mit Kontrollpeptiden untersucht. Für die HLA-A₁ positiven Patienten wurden das HLA-A₂ restringierte Peptid MAGE-3₂₇₁₋₂₇₈ und das CMV Peptid CMVpp₆₅ als Kontrollpeptide verwendet. Die Kontrollpeptide für die HLA-A₂ positiven Patienten waren das HLA-A₁ restringierte Peptid MAGE-3 und ebenfalls das CMV Peptid CMVpp₆₅. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA (50ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert und wie die anderen Zellen behandelt.

Auswertung der Messungen

Für die Auswertung der gewonnenen Daten aus den durchflußzytometrischen Messungen wurde die Software CellQuest™ (Beston Dickinson) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

Insgesamt wurde für diese Arbeit bei 29 Patienten, die die Vakzinationstherapie mit Hybridzellen erhalten hatten, die Frequenzanalyse durchgeführt. Die Patienten hatten bereits mehrere Therapieverfahren wahrgenommen und erhielten während der Vakzinationszyklen keinerlei weitere onkologische Therapie.

Die Patienten befanden sich bei Studienbeginn im Krankheitsstadium III oder IV. Den HLA-Typ betreffend waren 11 Patienten HLA-A1 positiv, 15 Patienten HLA-A2 positiv und 3 Patienten HLA-A1+2 positiv.

Die Immunantwort auf recall-Antigene bei den Patienten wurde vor der Behandlung anhand des Multitest Immignost® bestimmt. Es musste mindestens eine positive Antwort auf eines der *Recall*-Antigene vorhanden sein, um davon auszugehen, dass das Immunsystem noch intakt war. Diese Untersuchung konnte allerdings nur bei den allerersten Patienten durchgeführt werden, da dieses Produkt vom Hersteller dann nicht mehr vertrieben wurde und weltweit keine Ersatzteste zu beziehen waren.

Entsprechend gingen diese Untersuchungen auch nicht in die Analysen ein.

4.2 Therapiekonzept

Die Hybridzell-Vakzine wird durch Elektrofusion von autologen Tumorzellen und allogenen Dendritischen Zellen (engl.: *dendritic cells* - DC) eines gesunden Spenders hergestellt ¹²⁴. Aus frisch entnommenen Tumormetastasen oder Tumormaterial, das bei 4°C max. 24 Stunden lagerte, wurden die Tumorzellen durch mechanische Zerkleinerung und enzymatische Behandlung isoliert. Die von gesunden Spendern durch Leukapherese gewonnenen mononukleären Zellen wurden mit entsprechenden Zytokinen generiert und dann die beiden Zelltypen durch Elektrofusion miteinander verschmolzen. Die entstandenen Hybridzellen wurden mit 5% Glucose aufgenommen und anschließend mit 200 Gy bestrahlt. Die behandelten Patienten wurden nach der Anzahl der verwendeten autologen Tumorzellen in zwei Gruppen eingeteilt:

- 1.) 10 Millionen Arm

2.) 30 Millionen Arm

Diese gewonnenen Tumorzellen wurden mit der jeweils gleichen Anzahl DCs fusioniert. Die so entstandene Hybridzell-Vakzine wurde den Patienten dann im vierwöchigen Abstand in den Oberarm, Oberschenkel oder Abdomenbereich subcutan oder aber unter Ultraschallkontrolle intranodulär in einen Leistenlymphknoten eines nicht vom Tumor befallenen Beines gespritzt.

4.3 Klinisches Ansprechen

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Patienten, die für diese Arbeit eingeschlossen wurden. In der 11. Spalte wird das klinische Ansprechen der Vakzinationstherapie aufgeführt. Als klinisches Ansprechen wurden eine komplette Remission (CR), eine partielle Remission (PR) oder eine stabile Erkrankung (SD) gewertet. Bei Progredienz der Erkrankung (PD) nach 3 maliger Vakzine wurde die Therapie abgebrochen. Um das klinische Ansprechen zu bewerten, wurde ein komplettes Staging vor der Therapie und 4 Wochen nach der letzten Vakzine durchgeführt. Alle Studienteilnehmer erhielten vor der Vakzinationstherapie bereits andere Therapien. Insgesamt wurden 25 Patienten chirurgisch behandelt, 22 bekamen Immunotherapien wie IL-2 oder IFN- α , 6 Patienten wurden vorher bestrahlt und 9 Patienten erhielten vorher eine Chemotherapie. Chemotherapien und Immuntherapien mussten 4 Wochen vor Beginn der ersten Vakzine abgeschlossen worden sein. Während der Studie erhielten die Patienten keine immunsuppressiven Therapien wie z.B. Kortikosteroide. Bei 22 Patienten wurde nach dreimonatiger Therapiedauer eine Progredienz der Erkrankung festgestellt und die Therapie abgebrochen.

Bei 4 Patienten kam es zu einer Stabilisierung der Krankheit, wobei die Patienten Nr.10 und Nr.17 erst nach der zwölften bzw. der sechsten Vakzine ein Fortschreiten der Krankheit erkennen ließen. Patient Nr. 7 wurde neun Zyklen lang mit der Vakzinationstherapie behandelt und zeigte sich nach einer Operation von Filiae am Capilitium, die zur Gewinnung der Zellen für die Vakzine nötig war, tumorfrei. Dieser Zustand hielt sich bis 9 Monate nach Beendigung der Therapie, bis es zum Auftreten von Filiae in der Lunge kam. Auch beim Patienten Nr.13 stabilisierte sich die Erkrankung bis zu 4 Monaten nach Beendigung der Therapie, als eine Progredienz der Erkrankung festgestellt wurde. Beide Vakzinationstherapien wurden abgebrochen, da nicht genügend Tumormaterial für die Herstellung der Hybridzellen mehr zur Verfügung stand. Bei 2 Patienten ist die klinische Antwort nicht beschrieben worden, da sie zum

Teil im Ausland weiterbehandelt wurden und ein aktuelles Staging nicht übermittelt wurde.

Als „partial response“ wird die Entwicklung bei Patient Nr. 23 angesehen, da nach 13 Zyklen Vakzinationstherapie bei der Entnahme von Material für Hybridzellen keine Tumorzellen mehr nachgewiesen wurden.

Bei einigen Patienten zeigten sich Nebenwirkungen wie Schwellungen, Rötungen oder Schmerzen an der Injektionsstelle oder Allgemeinsymptome wie Fieber oder Übelkeit. Es traten unter der Therapie keine Autoimmunreaktionen auf.

Tabelle 4 : Vortherapien: O= Operation, I= Immunotherapie, C= Chemotherapie, R= Radiatio; Nebenwirkungen: S= Schmerzen, E= Erythem, SW= Schwellung, F= Fieber, A= Appetitlosigkeit, Ü= Übelkeit; Injektionsort: i.c.= intracutan, i.n.= intranodulär; PD= progressive disease, SD= stable disease, PR= partial response

Pat-Nr	Geschlecht	Alter	HLA Typ	Stadium	Vortherapie	Studie	Injektionsort	Anzahl der Vakzinierungen	Nebenwirkungen	Klinische Antwort
1	m	54	HLA- A1	IV	O, I	30 Mill.	i.c.	3	keine	PD
2	m	73	HLA- A1	IV	O, I	30 Mill.	i.c.	3	keine	PD
3	m	50	HLA- A1	IV	CI, I, O	30 Mill.	i.c.	3	keine	PD
4	m	63	HLA- A1	IV	I, R, C, CI	30 Mill.	i.c.	3	E, SW	PD
5	m	63	HLA- A1	IV	O, I	30 Mill.	i.c.	3	keine	PD
6	m	52	HLA- A1	IV	R, I	30 Mill.	i.c.	3	keine	PD
7	m	66	HLA- A2	IIIb	I, O	30 Mill.	i.c.	10	E	SD
8	m	68	HLA- A2	IV	R, I, O	30 Mill.	i.c.	3	keine	n.b.
9	f	55	HLA- A2	IV	O, I	30 Mill.	i.c.	3	S	PD
10	m	58	HLA- A1,2	IV	O, I, R	30 Mill.	i.c.	25	keine	SD, nach 12. Vak. PD
11	m	71	HLA- A1	IV	O, C	30 Mill.	i.n.	3	A	PD
12	f	50	HLA- A2	IV	O, I, C	30 Mill.	i.n.	3	keine	PD
13	f	58	HLA- A2	IIIa	O	30 Mill.	i.n.	6	keine	SD
14	m	52	HLA- A1	IV	I	10 Mill.	i.c.	3	keine	PD
15	m	62	HLA- A2	n.b.	O, I	10 Mill.	i.c.	3	E, F	PD
16	m	75	HLA- A2	IIIa	O	10 Mill.	i.c.	3	n.b.	n.b.
17	m	40	HLA- A2	IV	O, I, C	10 Mill.	i.c.	6	E	SD, nach 6. Vakzine PD
18	f	49	HLA- A2	IV	O	10 Mill.	i.c.	5	keine	PD
19	f	73	HLA- A2	IV	O	10 Mill.	i.c.	10	E	PD
20	f	66	HLA- A2	IV	O, I, C	10 Mill.	i.c.	3	E	PD
21	m	44	HLA- A2	IV	O, I, C	10 Mill.	i.c.	3	keine	PD
22	m	64	HLA- A1,2	IIIb	O, I, C	10 Mill.	i.c.	8	keine	PD
23	f	64	HLA- A1	IIIb	O, I	10 Mill.	i.n.	13	keine	PR
24	m	47	HLA- A1	IV	O, I	10 Mill.	i.n.	3	keine	PD
25	m	61	HLA- A1	IV	O, I, R, C	10 Mill.	i.n.	3	keine	PD
26	m	38	HLA- A2	IV	O	10 Mill.	i.n.	3	F, Ü	PD
27	m	39	HLA- A2	IV	I, R, O	10 Mill.	i.n.	3	keine	PD
28	m	40	HLA- A2	IV	I	10 Mill.	i.n.	3	S	PD
29	f	38	HLA- A1,2	IV	O	10 Mill.	i.n.	3	keine	PD

4.4 Frequenzanalyse der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unter Therapie

Ziel der Immuntherapie war die Induktion der tumorspezifischen CD8⁺ Zellen.

Um zu beurteilen, wie effektiv dieser Therapieansatz ist wurde die funktionelle Kapazität der T-Zellen gegen bekannte und häufig vorkommende Melanomantigene analysiert. Immunhistologisch wurde vorher das Vorhandensein der Antigene auf dem jeweiligen Tumor untersucht.

Bei den HLA-A*0201⁺ Patienten wurden im peripheren Blut die Frequenzen der für die neun HLA-A*0201⁺ restringierten Peptide spezifischen CD8⁺ Zellen untersucht.

Dasselbe geschah bei den HLA-A*01⁺ Patienten und deren spezifische CD8⁺ Zellen.

Mittels intrazellulärer IFN γ - Färbung wurde der Anteil der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut vor der Vakziation (0 h) sowie 24 h und 48 h nach der Vakzination im Durchflusszytometer gemessen ¹²⁵.

Zu der aktivierten T-Zellpopulation wurden die CD8⁺ T-Zellen einbezogen, die durch IFN γ - Produktion und CD69-Expression auf die Stimulation mit den Peptiden reagierten. Dabei wurden alle CD8⁺ Zellen, sowohl die intermediär als auch die hochexprimierenden Zellen, berücksichtigt.

Zur Kontrolle der unspezifischen Stimulation wurden Peptide verwendet, die entweder an keine der exprimierten MHC Moleküle binden oder, wenn die gleiche MHC-Restriktion bekannt ist, nicht Melanom-spezifisch sind.

Die Frequenzen der Peptid-spezifischen T-Zellen sind als Prozentsatz der CD69⁺/IFN γ ⁺ Zellen von der CD8⁺ Population angegeben. Die Werte wurden um den Hintergrund (unstimulierte Probe) korrigiert. Abbildung 1 zeigt eine FACS Analyse bei Patient Nr. 7. In dieser Analyse stellt sich der 2. Vakzinationszyklus, 24 h nach der Injektion dar.

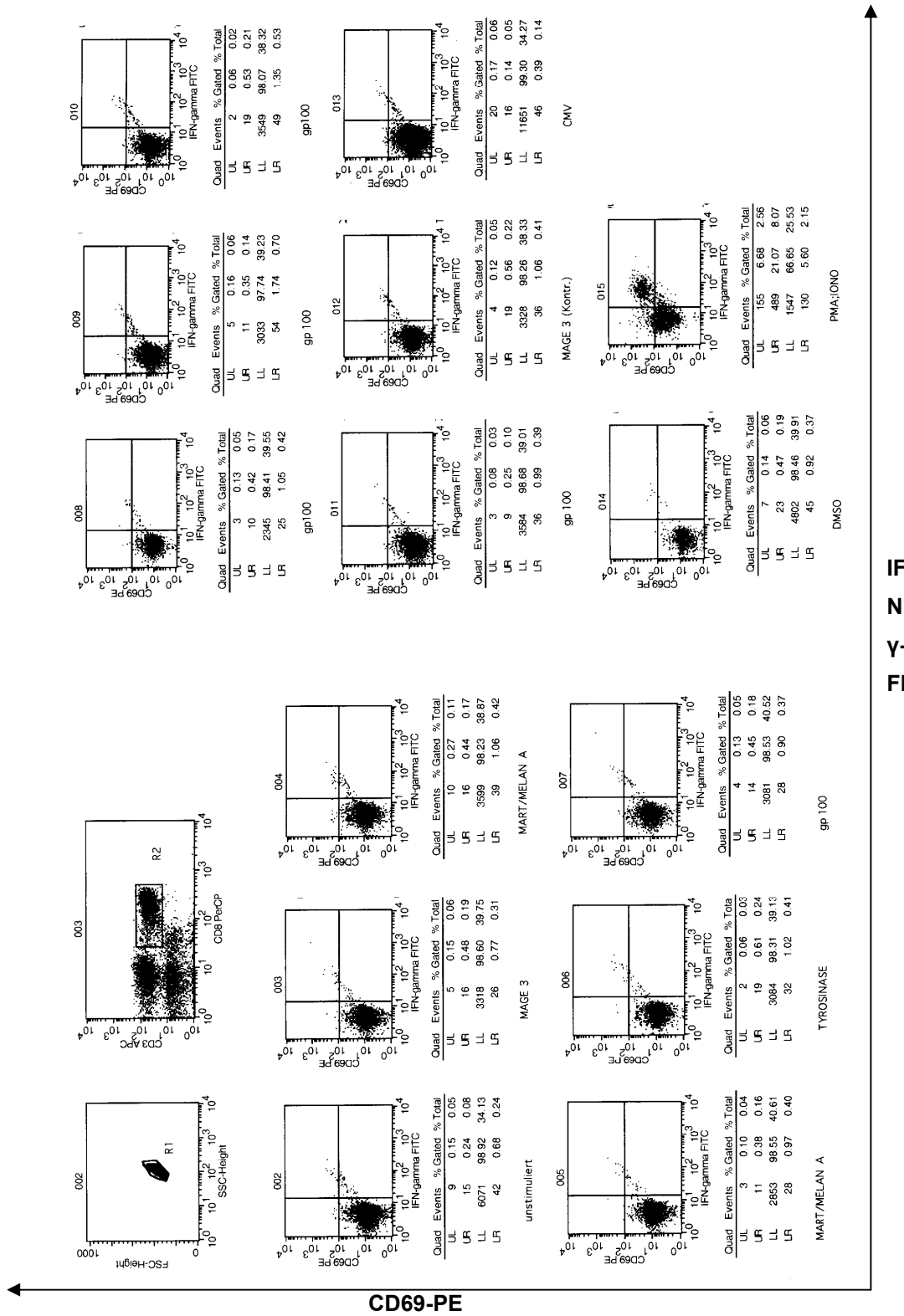


Abbildung 1: FACS Analyse bei Patient Nr. 7, 2. Vakzinationszyklus, 24h nach Injektion

Frequenzanalysen bei Patienten behandelt mit 1×10^7 Hybridzellen subcutan oder intranodal

Insgesamt wurden 16 Patienten mit 1×10^7 Hybridzellen behandelt, wobei 9 Patienten die Injektion subkutan und 7 Patienten die Injektion mit der Vakzine intranodal unter Ultraschallkontrolle erhielten. Insgesamt waren 4 Patienten HLA-A1 positiv, 10 Patienten HLA-A2 positiv und 2 Patienten HLA-A1 und - A2 positiv.

Bei der Frequenzanalyse der spezifischen CD8+ Zellen ließ sich nach statistischen Berechnungen mit der Anova-Type-Statistik kein relevanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den beiden Injektionsarten in dieser Gruppe von Patienten feststellen.

Nebenwirkungen wie Schmerzen, Übelkeit oder Erytheme traten bei der Hälfte der subcutan injizierten Patienten auf, während bei den intranodal verabreichten Vakzinen nur 2 von 5 Patienten über Nebenwirkungen berichteten. Ob Unterschiede im klinischen Ansprechen zwischen den Injektionsorten nachgewiesen wurden, wird später thematisiert.

Je nach HLA-Typ wurden bei den Patienten die spezifischen T-Zellen für die jeweils HLA-Typ restringierten Peptide gemessen. Angegeben wird der Anstieg als Prozentsatz der CD69+/IFN γ + Zellen von der gesamten CD8+ Population. Unter den Patienten, die die Vakzine subcutan erhielten, zeigte Patient Nr. 22 die geringste Reaktion. Auf die Stimulation mit MART/MELAN A₂₇₋₃₅ und mit gp100₄₇₆₋₄₈₅ wurde kein Anstieg nachgewiesen und bei den anderen spezifischen Peptiden höchstens ein Anstieg um 0,08% verzeichnet. Patient Nr. 18 hingegen zeigte die konsequent höchsten gemessenen Anstiege der spezifischen CD8+ Zellen. 48 Stunden nach der ersten Vakzinierung zeigte sich bei den MAGE 3 (271-278) spezifischen Zellen ein Anstieg um 4,45%. Bei der 2. Vakzinierung wiederholte sich ein Anstieg nach 48h, jedoch lediglich um 0,96%. Die Tyrosinase-spezifischen T-Zellen stiegen sowohl 48h nach der ersten Vakzinierung um 0,38%, als auch 48h nach der zweiten Vakzinierung um 0,52% an. Auffällig ist bei diesem Patienten ein hoher Prozentsatz an Peptid-spezifischen CD8+ Zellen zum Zeitpunkt 0h der 2. Vakzine. So wurden dort für MART/MELAN A₍₂₆₋₃₆₎ 3,27%, für gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎ 5,19%, für gp100₍₁₅₄₋₁₆₂₎ 5,74%, für gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎ 4,10% und für das Epitop gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ 2,79% spezifische T-Zellen vor Erhalt der zweiten Vakzine gemessen. Bereits 48h nach der Vakzinierung wurden deutlich geringere Prozentzahlen gemessen. Für die gp100 (280-288) stimulierten T-Zellen sank der Anteil um 4,96% auf lediglich nachweisbare 0,23% spezifische T-Zellen. Bei den anderen, auf die jeweiligen

Peptide spezifischen Zellen, ließen sich noch Werte von 0,28% bis 0,46% nachweisen. Vor der ersten Vakzinierung hatte dieser Patient auch für das Epitop gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎ bereits 6,66% spezifische Zellen, die im Verlauf nach 48h auf 6,00% sanken. Die einzelnen Werte des Pat. Nr. 18 werden in der Abbildung 2 dargestellt.

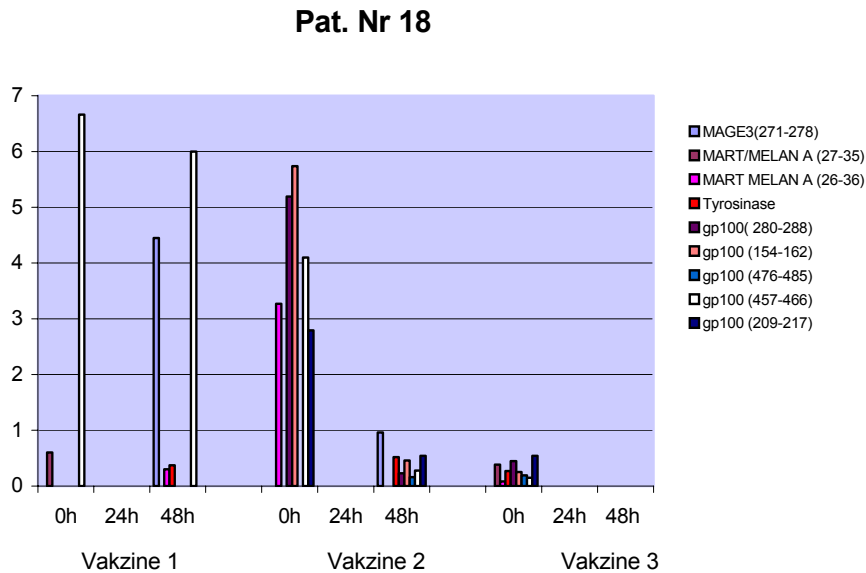


Abbildung. 2: Prozentsatz der CD69+CD69+IFN γ + Zellen im Zeitverlauf der Vakzinierung bei Pat. Nr. 18

**Pat.
Nr.18**

	1. Vakzine			2. Vakzine			3. Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)			4,45			0,96			
MART/MELAN A (27-35)	0,60						0,38		
MART MELAN A (26-36)			0,30	3,27			0,08		
Tyrosinase			0,37			0,52	0,27		
gp100(280-288)				5,19		0,23	0,45		
gp100 (154-162)				5,74		0,46	0,25		
gp100 (476-485)						0,16	0,19		
gp100 (457-466)	6,66		6,00	4,10		0,28	0,15		
gp100 (209-217)				2,79		0,54	0,54		

Tabelle 5: Frequenzen der Peptidspezifischen CD β + /CD69+, IFN γ - produzierenden Zellen im peripheren Blut bei Pat. Nr. 18 vor Vakzination (0h) und jeweils 24h und 48h nach Vakzination; in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Ein anderer Patient, der die 1×10^7 Hybridzellvakzine subcutan erhielt und im Vergleich zu den anderen Patienten einen hohen Anteil an spezifischen CD8+ Zellen aufwies, ist der Patient Nr. 19. Auf die Stimulation mit MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ zeigte sich 24h nach der ersten Vakzine ein Anstieg auf 2,65% der spezifischen T-Zellen und bei gp100₍₄₇₆₋₄₈₅₎ ein Anstieg zum gleichen Zeitpunkt auf 3,45%. Nach Stimulation mit den anderen sieben HLA-A2 spezifischen Peptiden ließen sich Prozentsätze von 1,07% bis 1,99% nachweisen. Bereits 48h nach der ersten Vakzine sanken die spezifischen T-Zellen wieder auf Werte zwischen 0,04% bis 0,16%. Bei der zweiten Vakzinierung zeigte sich 24h später nur noch auf die Stimulation mit MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ eine Reaktion mit nachweisbaren 0,53% und auf gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎ mit 0,45%.

Patient Nr. 15 und Patient Nr. 19 waren die einzigen, die in der Gruppe der HLA-A2 Patienten, die die Vakzine subcutan erhielten konsequent 24h nach der ersten Vakzine auf die Stimulation jedes Melanom-spezifischen Peptides mit einem Anstieg der spezifischen CD8+ Zellen reagierten. Die Anstiege der Population reichten von 0,01%, also gerade an der Nachweisgrenze, bis 3,45%.

Eine Übersicht der Frequenzanstiege der einzelnen HLA-A2 positiven Patienten, die mit 10^7 Hybridzellen vakziniert worden sind, zeigen die folgenden Abbildungen. 3 bis 8.

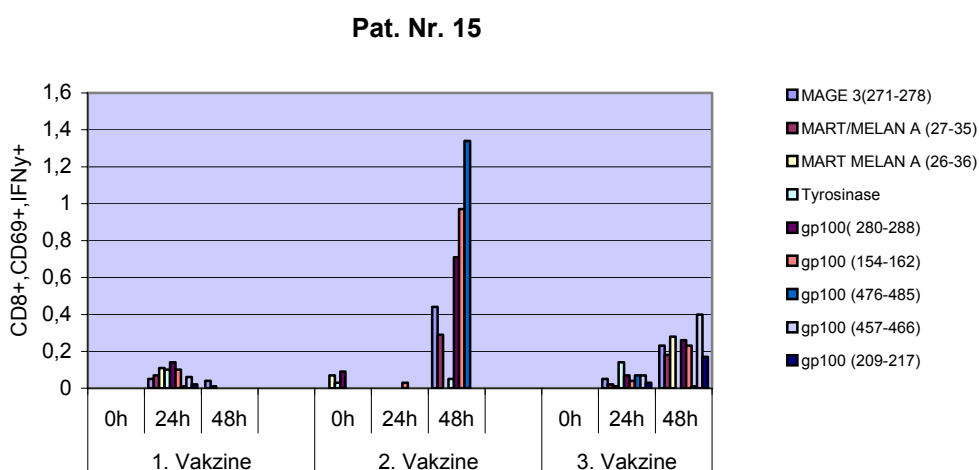


Abbildung. 3: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 15

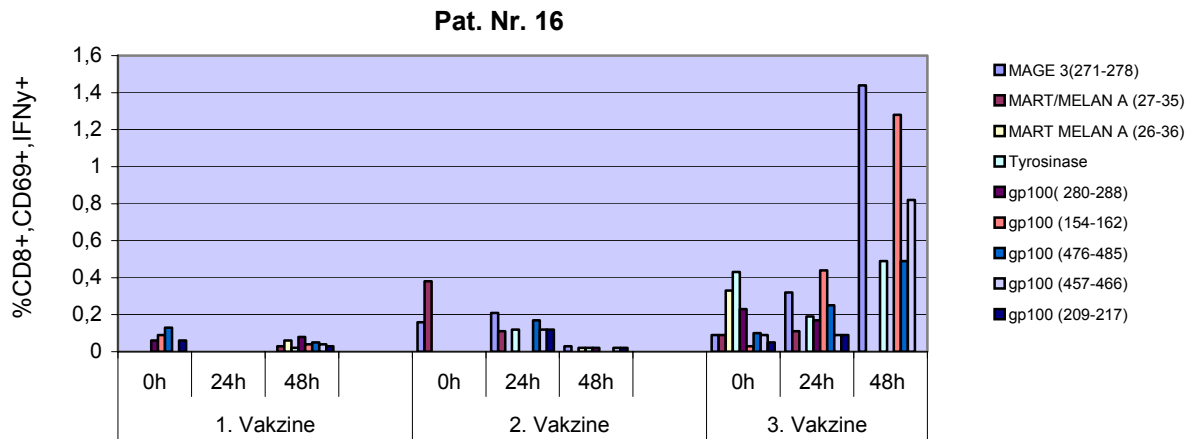


Abbildung. 4: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 16

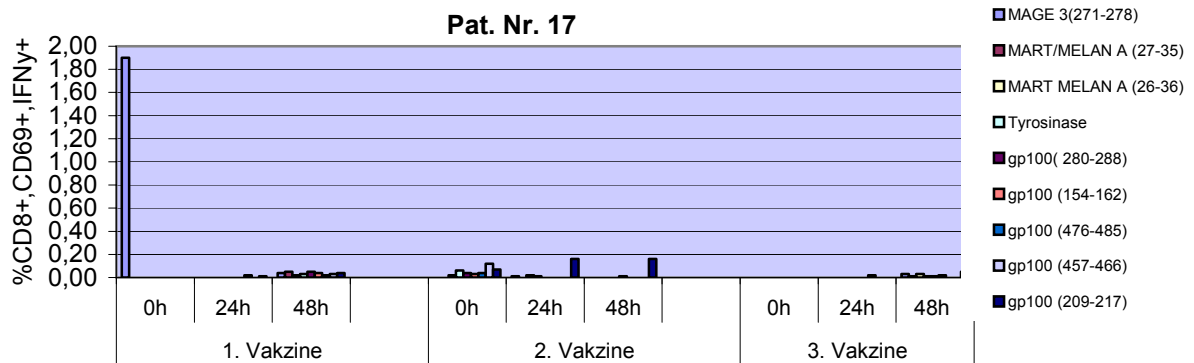


Abbildung. 5: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 17

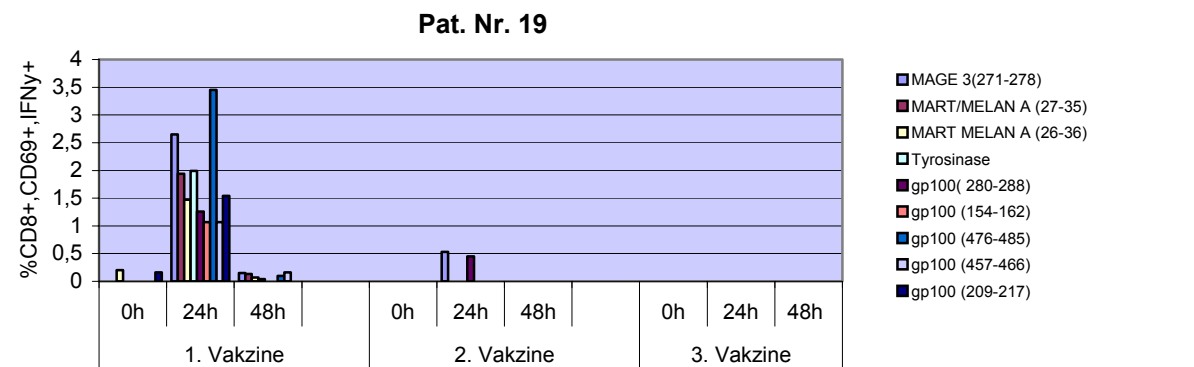
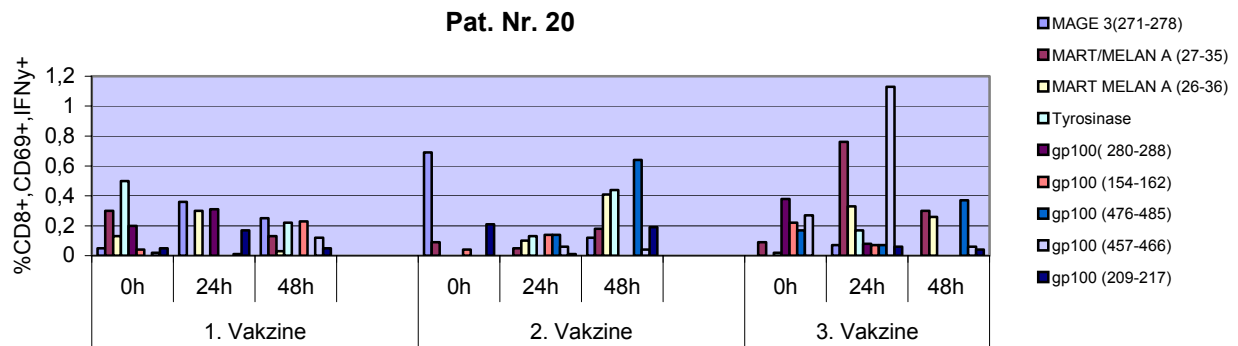
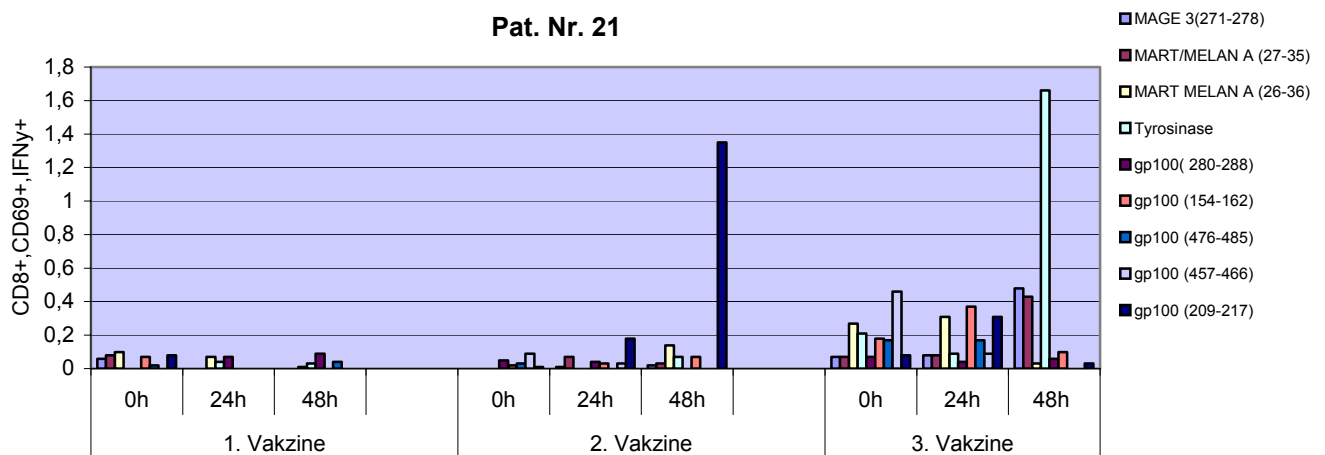
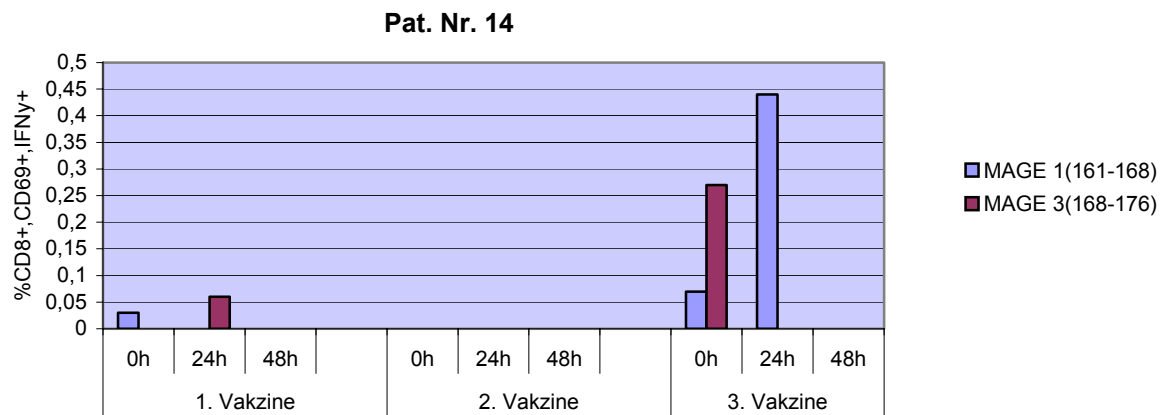


Abbildung. 6: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 19

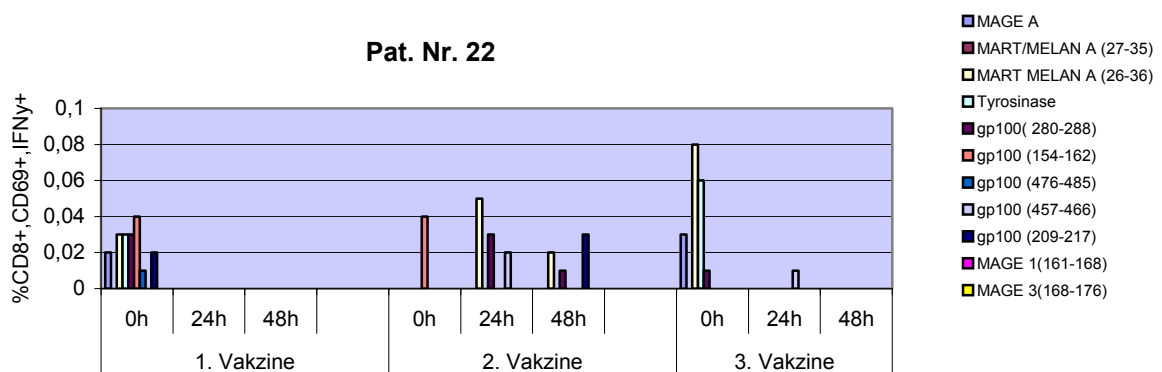
Abbildung. 7: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 20Abbildung. 8: Frequenzdarstellung der CD8/CD69+IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 21

Patient Nr. 14 wurde, da er HLA-A1 positiv ist, lediglich auf die beiden HLA-A1 restringierten Peptide MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ und MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ untersucht. Dort zeigten sich, wie in der Abbildung 9 ersichtlich, erst bei der dritten Vakzine deutliche Anstiege der spezifischen T-Zellen. So konnte bei der dritten Vakzine 24h nach der Stimulation mit MAGE1₍₁₆₁₋₁₆₈₎ ein Anstieg auf 0,44% gemessen werden. MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ zeigte wiederum bei der ersten Vakzine nach 24h einen Anstieg auf 0,06%. Für beide Peptide waren spezifische Zellen zum Zeitpunkt 0h, also vor der dritten Vakzinierung, im Bereich von 0,07% bis 0,27% nachweisbar.

Abbildung 9: Frequenzdarstellung der CD8+, CD69+, IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 14

Ein Patient der subcutanen 1×10^7 Hybridzellgruppe wies die Merkmale HLA-A1 und -A2 auf. Bei diesem Patienten mit der Nr. 22 zeigten sich spezifische CD8+ Zellen, alle HLA-A2 restringierten Antigene betreffend, bis auf MART/MELAN A₍₂₆₋₃₆₎ und gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎, bereits vor Beginn der Vakzinationszyklen. Nach 24h und 48h waren keine Zellen mehr nachweisbar.

Vor Beginn der dritten Vakzine zeigten sich ebenfalls spezifische T-Zellen mit Prozentsätzen von 0,01% bis 0,08%. Auch hier sanken die Werte im zeitlichen Verlauf unter die Nachweisgrenze. Nach der zweiten Vakzine wurden Anstiege sowohl nach 24h als auch nach 48h gemessen. Die Messwerte lagen im Bereich von 0,01% bis 0,05%. Auf die beiden HLA-A1 restringierten Antigene MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₈₎ und MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. Abbildung 10 demonstriert die Frequenzen der CD8+, CD69+ und IFN γ produzierenden Zellen dieses Patienten.

Abbildung 10: Frequenzdarstellung der CD8+, CD69+, IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 22

Von den sieben Patienten, die die 1×10^7 Hybridzell Vakzine intranodal erhielten waren 3 Patienten HLA-A1 positiv, 3 Patienten HLA-A2 positiv und ein Patient wies beide Merkmale auf.

Die Frequenzentwicklungen der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei den HLA-A1 positiven Patienten wird im Zeitverlauf der Vakzinierung in den folgenden Abbildungen 11-13 dargestellt.

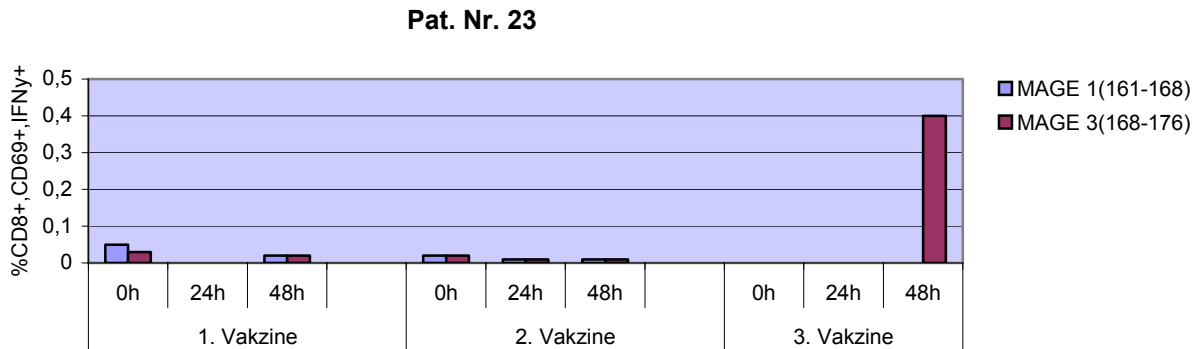


Abbildung 11: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 23

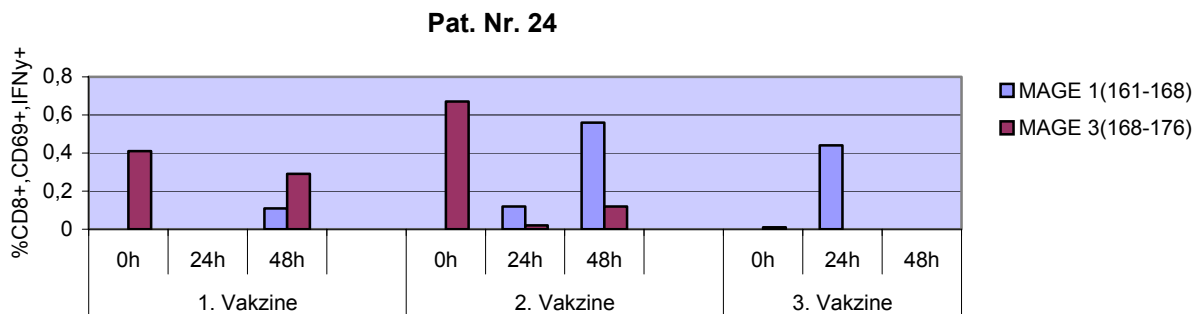
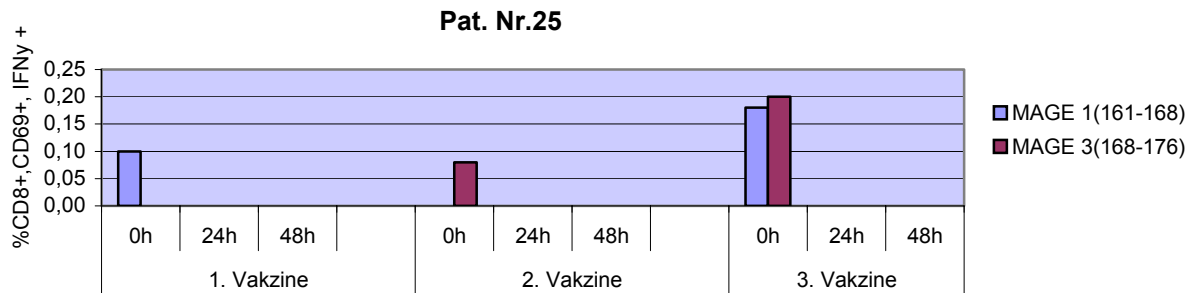


Abbildung 12: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 24

Abbildung 13: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 25

Von den HLA-A1 Patienten dieser Gruppe zeigte Pat. Nr. 24 die höchsten nachgewiesenen Messwerte. Bereits vor der ersten Vakzine ließen sich für das Antigen MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ spezifische T-Zellen von 0,41% nachweisen. Im Verlauf der Vakzinierungen sanken die Werte bis auf 0,29%, um dann wieder vor der zweiten Vakzine im Bereich von 0,67% zu liegen. Vor der dritten Vakzine lagen die Werte an der Nachweisgrenze. Bei Patient Nr. 23 lagen die Werte der CD8+/CD69+ und IFN γ produzierenden Zellen immer knapp an der Nachweisgrenze. Dieser Patient wird später noch beschrieben, da er beim klinischen Ansprechen als einziger eine „partial response“ aufwies. Die Werte, die bei Patient Nr. 25 gemessen wurden, lagen zwischen 0,08% für MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine und 0,2% für MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ zum Zeitpunkt 0h der dritten Vakzine.

Die HLA-A2 positiven Patienten, die die Injektion der Vakzine intranodulär erhielten, zeigten Frequenzanstiege bis zu 8,58%. Dieser Wert wurde 48h nach der dritten Vakzinierung bei Patient Nr. 28 nach Stimulation mit gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎ gemessen. Generell zeigte dieser Patient bereits vor der ersten Vakzine spezifische T-Zellen im Bereich von 0,03% bis 0,12%. Nach der Stimulation mit MART/MELAN A₍₂₅₋₃₇₎ stiegen die T-Zellen von 0,03% auf 1,83% nach 48h an. Auf das Antigen Tyrosinase ließ sich ein Anstieg von 0,12% zum Zeitpunkt 0h, also vor der ersten Vakzine, auf 1,22% zum Zeitpunkt 48h nach der ersten Vakzine verzeichnen. Bei der zweiten Injektion zeigte der Patient eher rückläufige Werte im Zeitverlauf. So konnte man zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine Werte von 0,11% bis 0,25% verzeichnen und 48h danach waren die T-Zellen auf 0,01% bis 0,12% gesunken. Dem Patienten Nr. 27 konnte man zu Beginn der Therapie keine spezifischen Zellen nachweisen. 48h nach der ersten Vakzinierung zeigten sich Immunantworten auf alle gemessenen Antigene mit Prozentsätzen von 0,02% bis 0,36%. Auch 48h nach der zweiten Vakzine stieg die Menge der

CD8+/CD69+IFN γ produzierenden Zellen auf Werte von 0,04% bis 0,38%. Zum Zeitpunkt 0h der dritten Vakzine konnte man Werte von 0,02% bis 0,37% messen, die alle nach 48h gesunken oder nicht mehr nachweisbar waren.

Patient Nr. 26 zeigte einen konstanten Anstieg der CD8+/CD69+IFN γ produzierenden Zellen nach Stimulation mit MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₆₎ von 0,23% zum Zeitpunkt 0h auf 2,38% zum Zeitpunkt 24h bis auf 4,44% zum Zeitpunkt 48h der ersten Vakzine. Bei diesem Patienten ließen sich 24h nach der ersten Vakzine auf alle Antigene spezifische T-Zellen nachweisen mit Anstiegen von 0,07% bis auf 2,38%. Auch bei der dritten Vakzinierung ließen sich 24h nach der Injektion Werte von 0,1% bis 0,54% feststellen. In den folgenden Abbildungen werden die Immunantworten der Patienten Nr.26, Nr.27 und Nr.28 dargestellt.

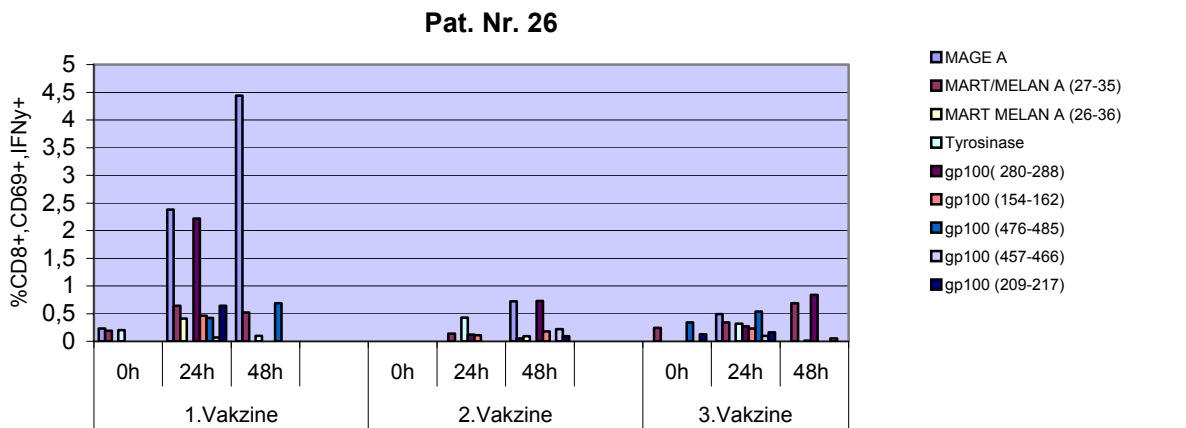


Abbildung 14: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ Zellen bei Pat. Nr. 26

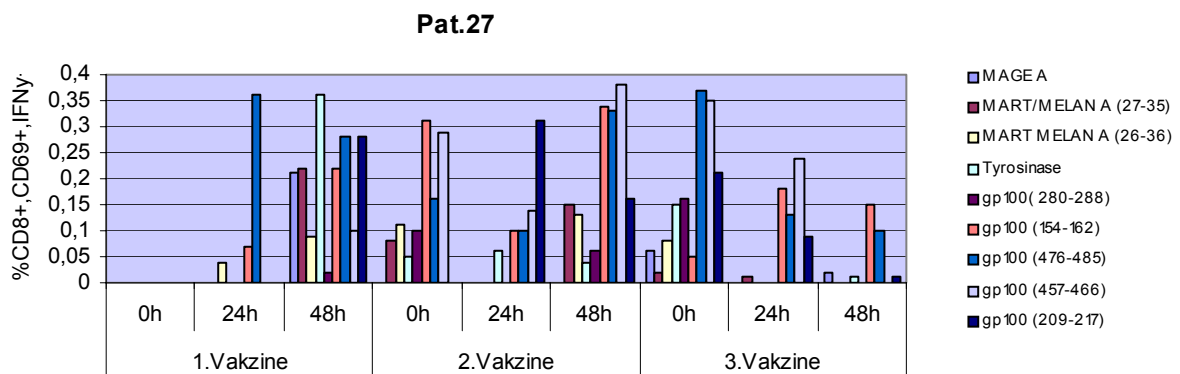


Abbildung 15: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ Zellen bei Pat. Nr. 27

Pat. 28

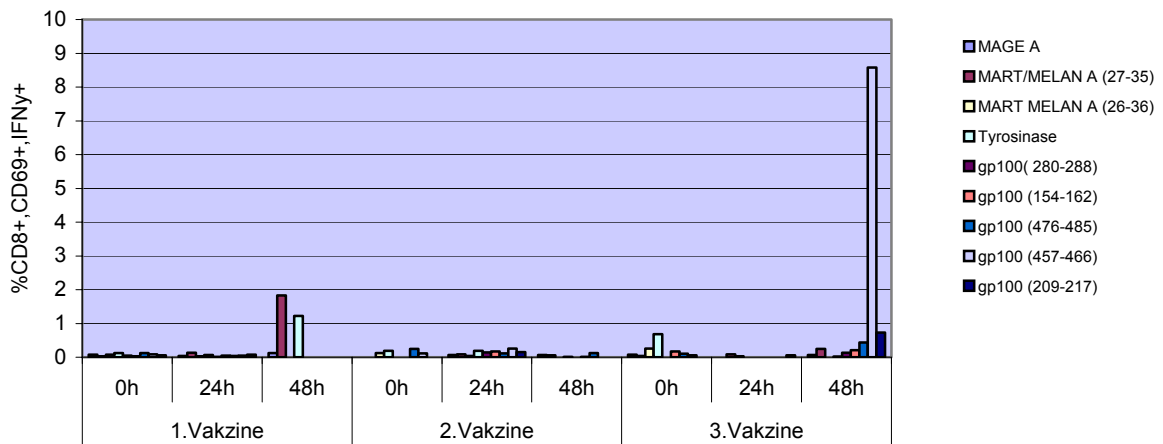


Abbildung 16: Frequenzdarstellung der CD8+, CD69+, IFNγ+ Zellen bei Pat. Nr. 28

Ein Patient wurde auf HLA-A1 restringierte und HLA-A2 restringierte Antigene untersucht, da er beide Merkmale aufwies. Patient Nr. 29 zeigte auf die Stimulation mit den beiden HLA-A1 restringierten Peptiden keine Reaktion und auch keine bereits vorhandenen spezifischen T-Zellen. Dies war auch schon bei Patient Nr. 22, der HLA-A1 und -A2 positiv ist und die Injektion subcutan erhalten hatte, so beschrieben worden.

Pat. Nr. 29

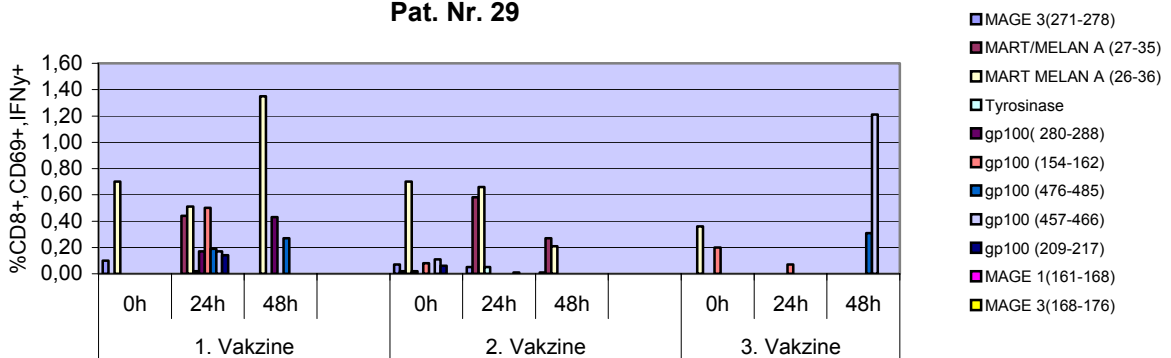


Abbildung 17: Frequenzdarstellung der CD8+, CD69+, IFNγ+ Zellen bei Pat. Nr. 29

Frequenzanalyse bei Patienten behandelt mit 3×10^7 Hybridzellen intranodal oder subcutan

13 Patienten wurden mit 3×10^7 Hybridzellen therapiert, davon wurde 10 Patienten die Vakzine subcutan und 3 Patienten die Vakzine intranodal verabreicht. Eine statistische Analyse, um diese beiden Untergruppen miteinander zu vergleichen, war aufgrund der geringen Zahl der Patienten, die intranodal therapiert wurden, nicht möglich.

In der Gruppe der Patienten, die ihre Injektion subcutan erhielten trugen 6 Patienten das Merkmal HLA-A1. Die höchste Anzahl an CD8+/CD69+ IFN γ produzierenden Zellen zeigte Patient Nr. 1 bei der dritten Vakzinierung nach 24h. Dort wurde für das Antigen MAGE3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ ein Prozentsatz von 2,11% gemessen. Nach Stimulation mit MAGE1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ 48h nach der dritten Vakzine zeigte sich ein Anstieg auf 0,97% der spezifischen T-Zellen. Während des ersten Vakzinationszykluses waren bei Patient Nr. 1 keine Zellen im meßbaren Bereich gefunden worden. Zum Zeitpunkt 0h, also vor der zweiten Vakzine lagen die Werte leicht über der Nachweisgrenze mit 0,02% bis 0,03%. Patient Nr. 2 wies die höchsten Werte 48h nach der zweiten Vakzine bei MAGE3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ mit 0,14% auf. Die Patienten Nr. 1, Nr. 3 und Nr. 4 hatten zu Beginn der Therapie keine nachweisbaren spezifischen T-Zellen, entwickelten im Verlauf als Immunantwort Prozentsätze von bis zu 1,27% bei Patient Nr. 4 und bei Patient Nr. 3 als höchsten ermittelten Wert 0,17%. Patient Nr. 5 und Nr. 6 hatten bereits zum Zeitpunkt 0h der ersten Vakzine nachweisbare spezifische T-Zellen sowohl nach Stimulation mit MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ als auch nach Stimulation mit MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎. Bei Patient Nr. 5 lag der höchste Wert bei 0,03% für MAGE1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ und bei Patient Nr. 6 lag der Prozentsatz für MAGE1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ spezifische T-Zellen bei 0,64%. Im Verlauf der Therapie blieben die Werte von Patient Nr. 5 konstant niedrig an der Nachweisgrenze mit einem Maximum von 0,07% zum Zeitpunkt 0h der dritten Vakzine. Bei Patient Nr. 6 sanken die Werte im Verlauf bis auf 0,01%. Die Darstellung der Frequenzen der CD8/CD69+ IFN γ produzierenden Zellen im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung ist in den Abbildungen 18 - 23 zu sehen.

Pat. Nr. 1

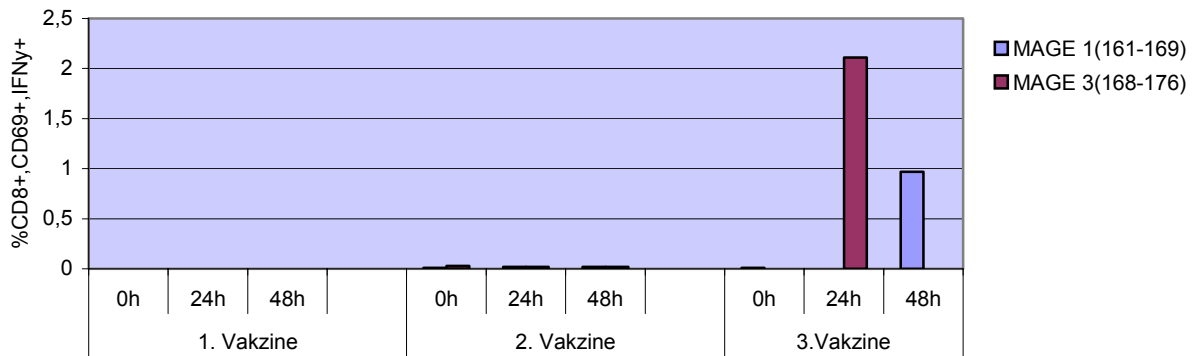


Abbildung 18: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 1

Pat. Nr. 2

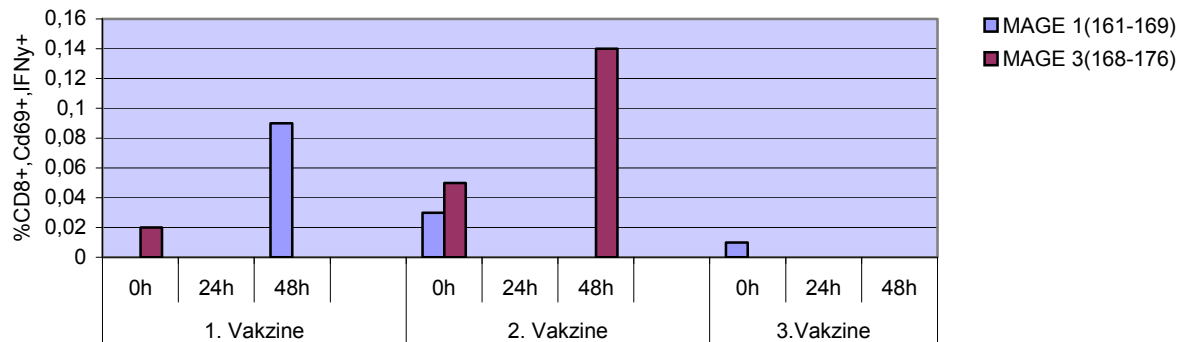


Abbildung 19: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 2

Pat. Nr.3

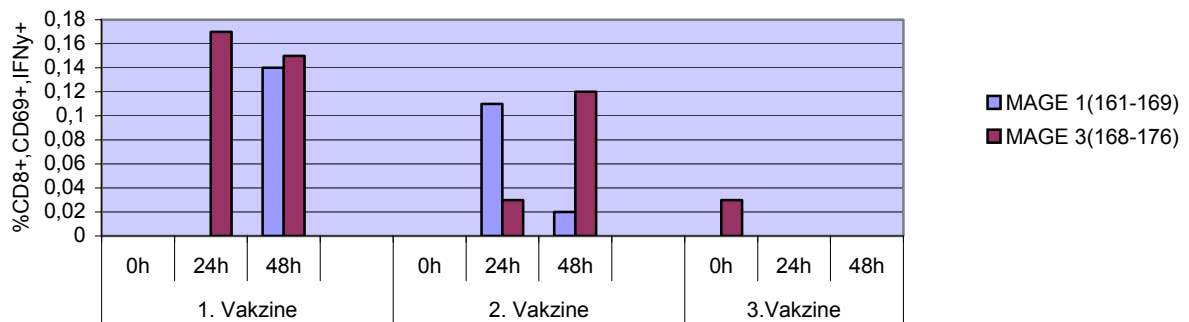
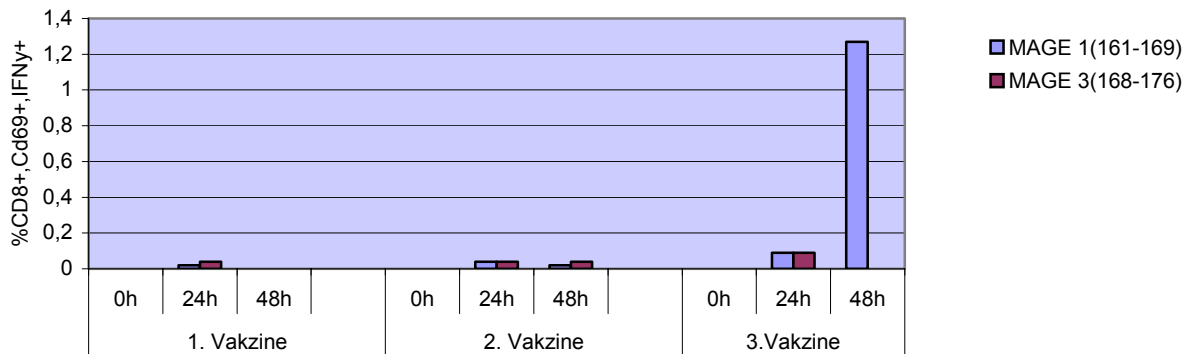
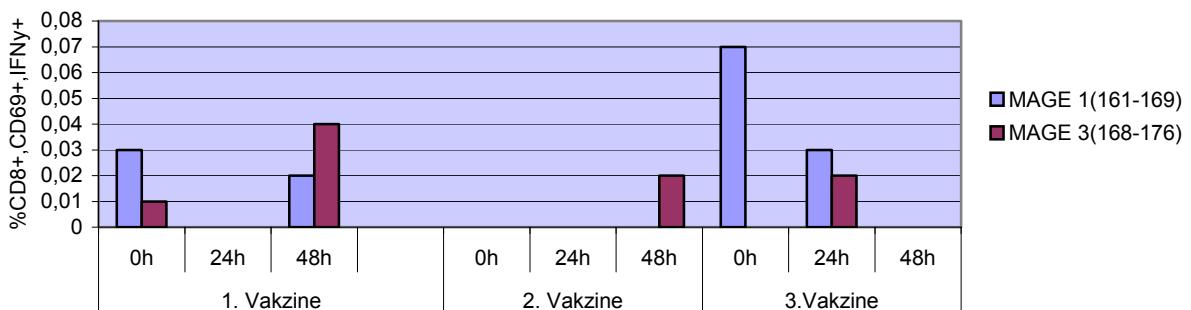


Abbildung 20: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 3

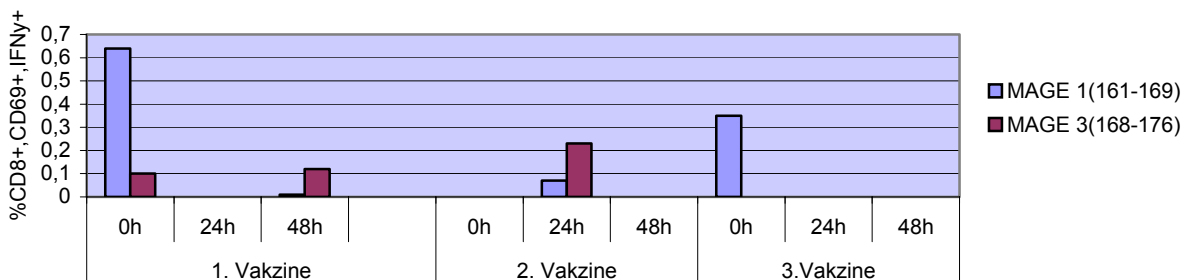
Pat. Nr.4

Abbildung 21: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 4

Pat. Nr. 5

Abbildung 22: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 5

Pat. Nr. 6

Abbildung 23: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ + Zellen bei Pat. Nr. 6

Patient Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9 waren HLA-A2 positiv und bekamen die 3×10^7 Hybridzellvazine subcutan injiziert. Patient Nr. 7 zeigte von diesen 3 genannten Patienten den höchsten gemessenen Wert von CD8/CD69+ und IFN γ produzierenden Zellen. Auf die Stimulation mit MART/MELAN A₍₂₇₋₃₅₎ zeigte sich ein Anstieg der Immunantwort von 0,23% zum Zeitpunkt 0h der ersten Vakzine auf 4,03% nach 24h. Danach sank die Anzahl der Zellen wieder auf einen Prozentsatz von 0,57%. Auch für

gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎ stiegen die Werte von 0,83% auf 3,84%, für gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎ von 0,05% auf 3,39% und für gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ von keinen nachweisbaren Zellen auf 3,16% innerhalb von 24 Stunden. Für die anderen Antigene stiegen die spezifischen T-Zellen nach 48h merklich an. So zeigte sich für das Antigen gp100₍₄₇₆₋₄₈₅₎ ein Anstieg von keinen nachweisbaren Zellen auf 1,98% nach 48h. Für MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ zeigte sich ein Anstieg nach 48h auf 0,55%, für MART/MELAN A₍₂₆₋₃₆₎ ebenfalls ein Anstieg nach 48h auf 1,25% und die für Tyrosinase spezifischen T-Zellen stiegen auf 1,34% an. Zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine konnten für die jeweiligen Antigene keine Zellen nachgewiesen werden. Nach 24h zeigten sich jedoch bei allen neun Antigenen positive Werte von 0,01%, also gerade an der Nachweisgrenze, bis 0,37%. Nur für gp100₍₄₇₆₋₄₈₅₎ stiegen die T-Zellen weiter an, die restlichen Werte fielen unter die Nachweisgrenze oder bis auf 0,01%. Bereits zur dritten Vakzinierung ließen sich zu keinem der festgelegten Zeitpunkte mehr spezifische Zellen nachweisen.

Bei Patient Nr. 8 war auffällig, dass sich zum Zeitpunkt 0h der ersten Vakzine für alle neun Antigene nach Stimulation spezifische T-Zellen nachweisen ließen. Die Werte rangierten von 0,03% bei MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ bis zu 0,26% bei gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎. Alle Werte, bis auf gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎, sanken nach 24h auf Prozentsätze von 0,02% bis 0,07% oder waren nicht mehr nachweisbar. Auch bei der zweiten Vakzine zeigten sich zum Zeitpunkt 0h bei allen Antigenen nach Stimulation positive Nachweise von CD8/CD69+ und IFN γ produzierenden Zellen mit Werten von 0,01% bis 0,37%. Für gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎ stieg der Wert nach 24h weiter auf 0,44%, ebenso stieg der Wert nach Stimulation mit gp100₍₄₇₆₋₄₈₅₎ von 0,01% auf 0,12%. Alle anderen Prozentsätze sanken auf Werte von 0,07% bis 0,11%. Bei der dritten Vakzine lagen die höchsten Frequenzen der CD8/CD69 positiven und IFN γ produzierenden Zellen 24h nach der Injektion bei 0,14% für das Antigen MART/MELAN A₍₂₆₋₃₆₎. Patient Nr. 9 zeigte die höchste Immunantwort 48h nach der Injektion der zweiten Vakzine mit 1,98% für das Antigen MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎. Sowohl vor der ersten als auch vor der zweiten und der dritten Vakzine zu den Zeitpunkten 0h waren bereits spezifische Zellen nachweisbar. Vor der ersten Vakzine lagen die Prozentsätze zwischen 0,04% und 0,31%. Bereits 48h nach der Injektion waren keine Zellen mehr nachweisbar. Auch zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine konnten T-Zellen im Bereich von 0,14% bis 1,94% nachgewiesen werden. Die folgenden Abbildungen 24 bis 26 zeigen die einzelnen Frequenzen im Zeitverlauf der Vakzinierungen für die Patienten Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9.

Pat. Nr. 7

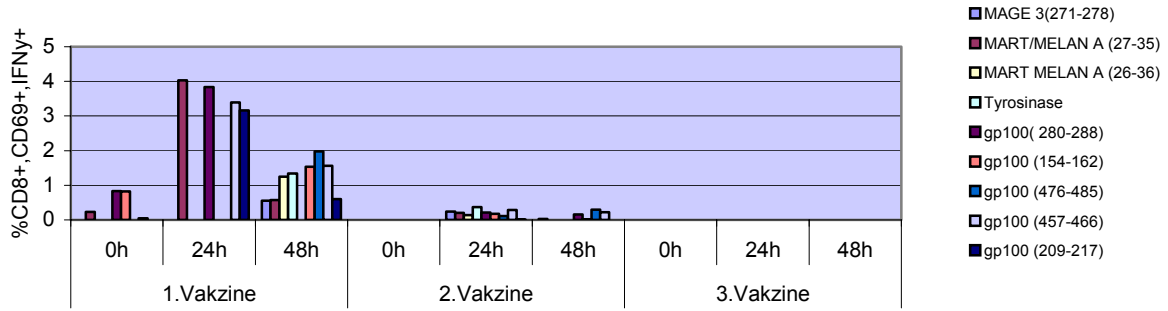


Abbildung 24: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFNγ+ Zellen bei Pat. Nr. 7

Pat. Nr. 8

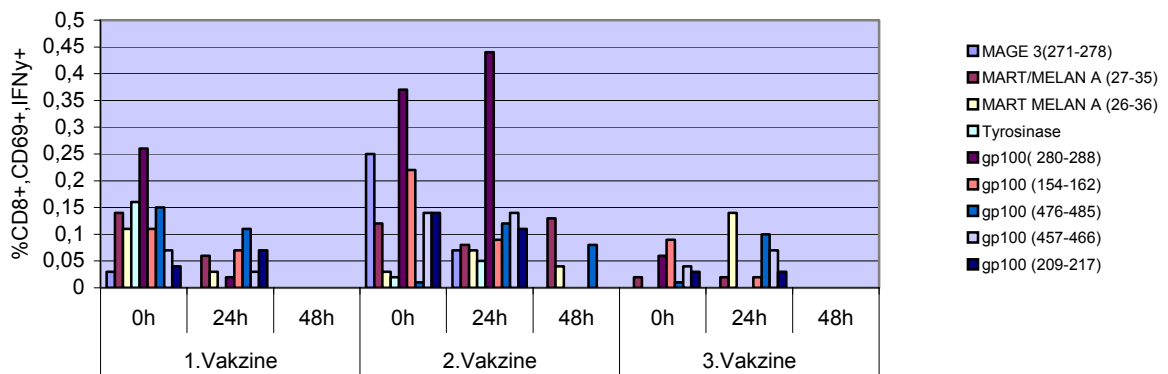


Abbildung 25: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFNγ+ Zellen bei Pat. Nr. 8

Pat. Nr. 9

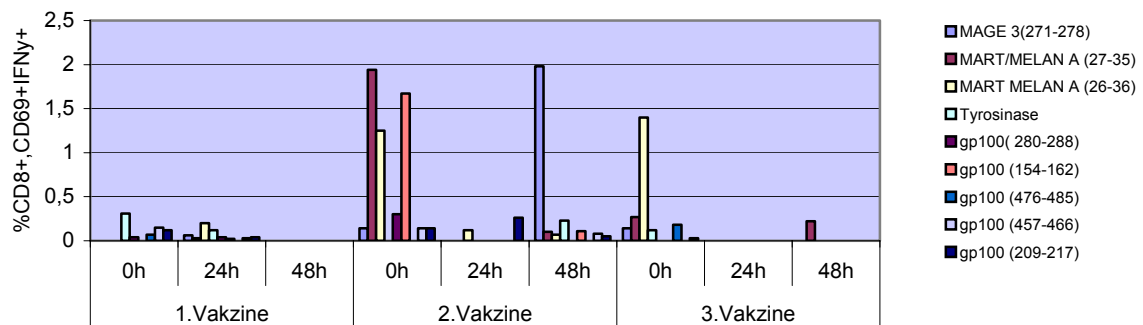


Abbildung 26: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFNγ+ Zellen bei Pat. Nr. 9

Patient Nr. 10 trägt sowohl die Merkmale HLA-A2 als auch HLA-A1 und wurde somit auf 11 restringierte Antigene untersucht. Im Vergleich zu den beiden anderen Patienten, die HLA-A2 und HLA-A1 positiv waren, zeigt Patient Nr. 10 auch positive Immunantworten auf die Stimulation mit den HLA-A1 restringierten Antigenen MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₈₎ und MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎. So zeigten sich positive Werte im Bereich von 0,3% für MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ 48h nach Erhalt der zweiten Vakzine und für das Antigen MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₈₎ ließ sich der höchste Wert 48h nach der ersten Vakzine mit 0,31% nachweisen. Die anderen Antigene betreffend zeigte sich eine positive Reaktion nach Stimulation mit Tyrosinase und einem Anstieg 48h nach der ersten Vakzine auf 1,11%. Nach der zweiten Vakzine rangierten die gemessenen Werte zwischen 0,01% für Tyrosinase 48h nach der Injektion und 0,27% für gp100(209-217) 48h nach der Injektion. Bei der dritten Vakzine zeigten sich noch Werte zum Zeitpunkt 0h und danach waren keine spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar. Abbildung 27 zeigt die einzelnen Frequenzen im Zeitverlauf der Vakzinierungen für den Patienten Nr. 10.

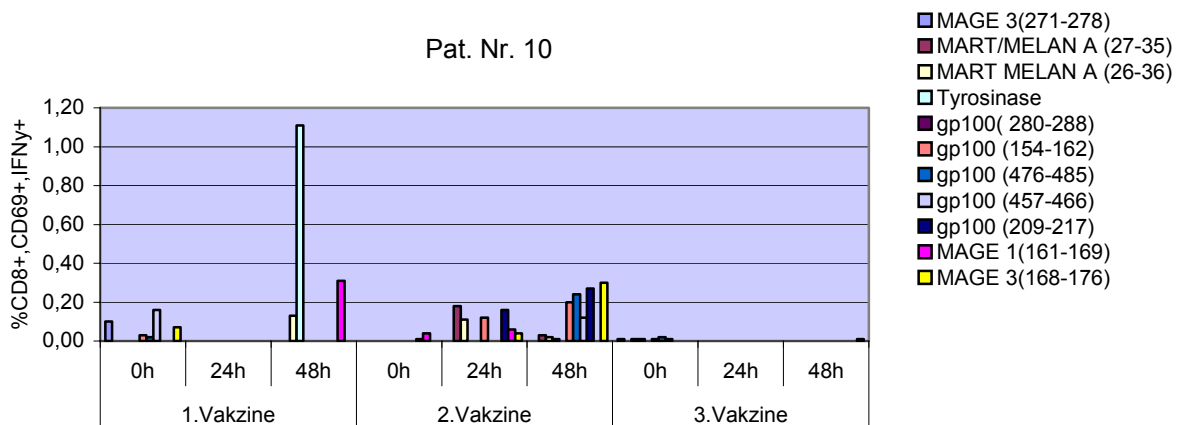
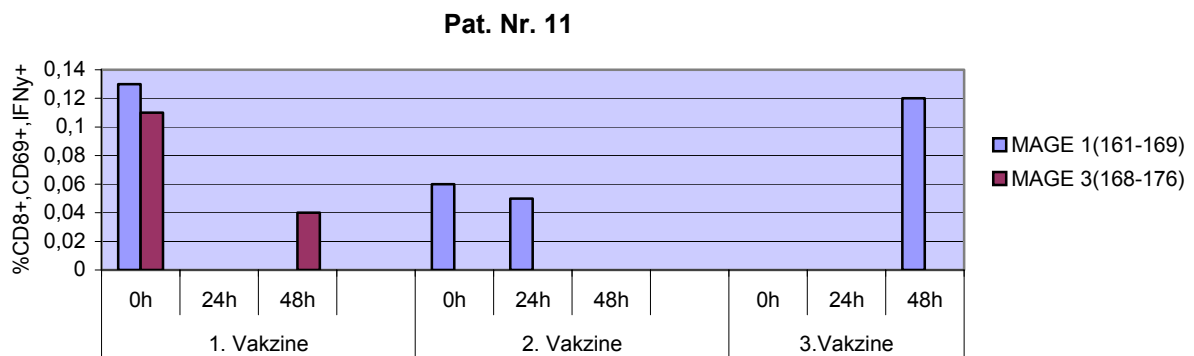


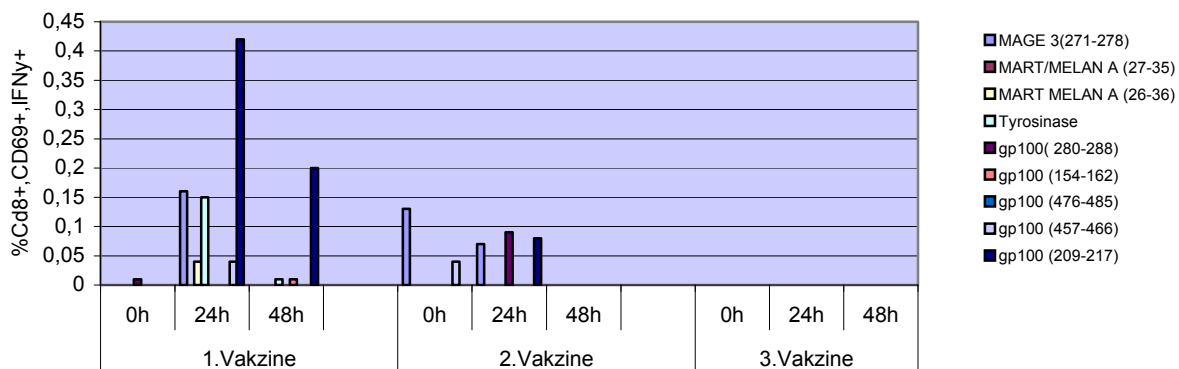
Abbildung 27: Frequenzdarstellung der CD8+, CD69+, IFN γ Zellen bei Pat. Nr. 10

Drei Patienten erhielten die 3×10^7 Hybridzellvakzinierung intranodal. Davon war Patient Nr. 11 HLA-A1 positiv. Bevor die erste Vakzine injiziert wurde, konnten spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, für das Antigen MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₉₎ in der Höhe von 0,13% und für MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ in der Höhe von 0,11%. Im Verlauf der Vakzinierungen sanken die Werte der CD8+/CD69+IFN γ produzierenden Zellen auf Werte von 0,04% bis nicht nachweisbar. Dies wird in der folgenden Abbildung 28 dargestellt.

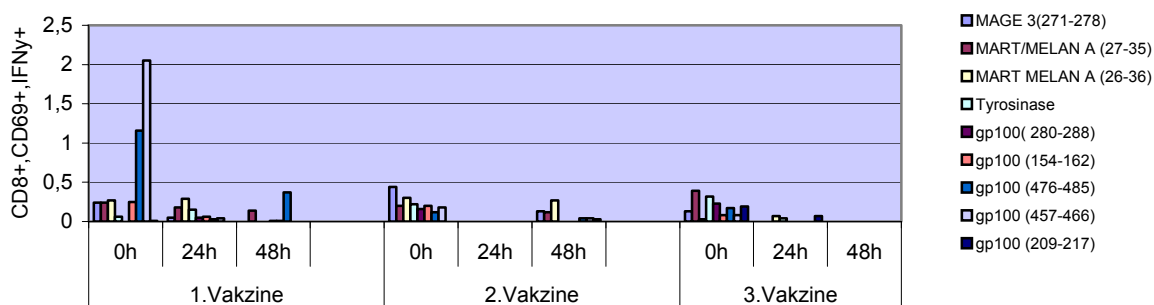
Abbildung Nr.28: Frequenzdarstellung der CD8+,CD69+,IFN γ Zellen bei Pat. Nr. 11

Die beiden anderen Patienten Nr. 12 und Nr. 13 waren HLA-A2 positiv. Patient Nr. 12 zeigte den höchsten Wert 24h nach der ersten Vakzine mit einem Anstieg der spezifischen T-Zellen für gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ mit 0,42%. Nach Stimulation mit MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ zeigte sich 24h nach der ersten Vakzine ein Anstieg auf 0,16% und bei Tyrosinase auf 0,15%. Ein ähnlich hoher Wert wurde noch zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine für MAGE 3₍₂₇₁₋₂₇₈₎ mit 0,13% gemessen. Vor und nach der dritten Vakzinierung konnten bei diesem Patienten keine spezifischen T-Zellen mehr nachgewiesen werden. Patient Nr. 13 hingegen wies bereits vor der ersten Vakzinierung spezifische T-Zellen im Bereich von 0,01% für das Antigen gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ bis 2,05% für das Antigen gp100₍₄₅₇₋₄₆₆₎ auf. Lediglich für gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎ konnten zum Zeitpunkt 0h der ersten Vakzine keine Zellen nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich nach 24h ein Anstieg auf 0,05%. Die Anzahl der restlichen spezifischen T-Zellen sank im zeitlichen Verlauf der ersten Vakzinierung. Auch zum Zeitpunkt 0h der zweiten Vakzine ließen sich positive Werte im Bereich von 0,12% bis 0,44% nachweisen. Auch hier erfolgte ein Rückgang 48h nach der Vakzinierung. Das gleiche gilt für die dritte Vakzine, wobei dort nach 48h keine spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar waren. Zum Zeitpunkt 0h der dritten Vakzine zeigten alle Antigene Prozentsätze von CD8+/CD69+IFN γ produzierenden Zellen im Bereich von 0,03% bis 0,39%. Die Frequenzdarstellung der Patienten Nr. 12 und Nr. 13 wird in den folgenden Abbildungen 29 und 30 gezeigt.

Pat. Nr.12



Pat. Nr. 13



4.5 Vergleich der 1×10^7 Hybridzellvakzine und der 3×10^7 Hybridzellvakzine

Einen statistisch relevanten Vergleich der beiden Studiengruppen 1×10^7 und 3×10^7 Hybridzellen konnte man nur zwischen den beiden Untergruppen berechnen, die ihre Injektionen subcutan erhielten, da nur dort vergleichsweise große Gruppen bewertet werden konnten. Dort wurden mit der Anova Statistik für kleine Fallgruppen die einzelnen Immunantworten auf die Stimulation mit den jeweiligen Peptiden miteinander verglichen. Es ließ sich kein relevanter Unterschied nachweisen. Für diese untersuchten Patienten war also die Menge der injizierten Zellen für die entstehende Immunantwort unerheblich.

4.6 Der Krankheitsverlauf der Patienten in Zusammenhang mit den gemessenen Frequenzen der tumorspezifischen T-Zellen

Insgesamt wurde für diese Arbeit von 29 Patienten die Immunantwort nach Hybridzellvakzinierung untersucht. Parallel wurde der klinische Verlauf dokumentiert. In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 wurden die Frequenzen der einzelnen CD8+/CD69+IFN γ produzierenden Zellen nach Erhalt der jeweiligen Injektionen dargestellt. Im Folgenden soll nun beschrieben werden, ob es eine Korrelation zwischen Immunantwort und klinischem Verlauf der Erkrankung gibt.

Zunächst werden die Patienten beschrieben, die auf ihre Hybridvakzinetherapie mit einem Einhalt der Erkrankung oder sogar einer Regression reagierten.

Patient Nr. 7 zeigte nach 9 Vakzineinjektionen ein „stable disease“. Bei Therapiebeginn hatte der Patient gesicherte Intransit-Metastasen sowie suspekta Lymphknoten supraclaviculär, submandibulär und einen Verdacht auf eine 4cm große Lymphknotenmetastase am Truncus coeliacus. Nach Erstdiagnose und operativer Entfernung des Primärtumors wurde eine Interferon- α Therapie durchgeführt bis zum Auftreten der oben beschriebenen Lymphknotenmetastasen. Vor der Vakzinetherapie wurde die allgemeine Immunkompetenz durch einen Multitest mit sieben Recall-Antigenen bestimmt. Patient Nr. 7 zeigte auf 6 Antigene positive Reaktionen.

Insgesamt wurden 9 Vakzinen gegeben und im Staging nach den Vakzinierungen zeigte sich kein Fortschreiten der Erkrankung. Für weitere Hybridzellvakzinierungen fehlte Tumormaterial, so dass die Therapie eingestellt wurde. Neun Monate nach der letzten Vakzine kam es zum Auftreten von Lungenfilae. Für diese Arbeit wurde die Immunantwort auf die ersten drei Vakzinen untersucht. Dort zeigte sich bei der ersten Vakzine für jedes Antigen nach Stimulation eine positive Antwort mit ansteigenden CD8/CD69 positiven und IFN γ produzierenden Zellen. Die höchste Antwort fand sich bei dem Antigen MART/MELAN A₍₂₇₋₃₅₎ 24h nach der ersten Vakzine mit 4,03%. Auch die Immunantworten für die anderen Antigene fielen deutlich positiv aus. Allerdings waren bei der dritten Vakzinierung keine spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar. In Tabelle 6 sind die einzelnen gemessenen Werte in Prozentzahlen angegeben.

Pat. Nr. 7

	1.Vakzine			2.Vakzine			3.Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)			0,55		0,24	0,03			
MART/MELAN A (27-35)	0,23	4,03	0,57		0,20				
MART MELAN A (26-36)			1,25		0,14				
Tyrosinase			1,34		0,37				
gp100(280-288)	0,83	3,84			0,21	0,16			
gp100 (154-162)	0,82		1,53		0,18	0,01			
gp100 (476-485)			1,98		0,11	0,30			
gp100 (457-466)	0,05	3,39	1,56		0,29	0,22			
gp100 (209-217)		3,16	0,60		0,01				

Tabelle 6: %CD8/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 7 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Patient Nr. 10 hatte ein malignes Melanom Stadium IV, als mit der Vakzinetherapie begonnen wurde. Zuvor war eine Bestrahlung und eine Immuntherapie mit Interleukin 2 und mit Interferon- α durchgeführt worden. Insgesamt zeigte der Patient während der ersten 12 Vakzinen einen Stillstand seiner Erkrankung. Auf den vor der Therapie durchgeführten Immuntest hatte der Patient nicht reagiert. Für diese Arbeit wurden die ersten drei Vakzinierungen und die dazugehörigen Immunantworten dokumentiert. Dort zeigte sich für jedes der untersuchten Antigene, bis auf gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎, im Verlauf der Vakzinierungen eine positive Reaktion. Die höchste Immunantwort zeigte sich bei dem HLA-A2 restringierten Peptid Tyrosinase mit einem Anstieg auf 1,11% 48h nach der ersten Vakzine. Auch 48h nach der Gabe der zweiten Vakzine stiegen die CD8+/CD69+ Zellen auf Werte bis 0,3% an, ansonsten lagen die Reaktionen eher an der Nachweisgrenze mit Werten um die 0,01%. Der Patient zeigte auch vor Therapiebeginn keine bemerkenswert hohen Prozentsätze an bereits vorhandenen spezifischen T-Zellen. In der Tabelle 7 werden die einzelnen Werte der Immunantworten dargelegt.

Pat. Nr. 10

	1.Vakzine			2.Vakzine			3.Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)	0,10						0,01		
MART/MELAN A (27-35)					0,18	0,03			
MART MELAN A (26-36)			0,13		0,11	0,02	0,01		
Tyrosinase			1,11			0,01	0,01		
gp100(280-288)									
gp100 (154-162)	0,03				0,12	0,20	0,01		
gp100 (476-485)	0,02					0,24	0,02		
gp100 (457-466)	0,16					0,12	0,01		
gp100 (209-217)				0,01	0,16	0,27			
MAGE 1(161-169)			0,31	0,04	0,06				
MAGE 3(168-176)	0,07				0,04	0,30			0,01

Tabelle 7: %CD8+/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 10 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Patient Nr. 13 zeigte auf den Immuntest vor Therapiebeginn für ein Recall-Antigen eine positive Reaktion. Bei Therapiebeginn wurde ein Tumorstadium IV mit Lungenmetastasen und Lymphknotenmetastasen beschrieben. Zuvor hatte die Patientin keinerlei Therapie außer der operativen Entfernung von Tumormaterial wahrgenommen. Nach 6 Vakzinen zeigte sich keine Progredienz der Erkrankung. Auffällig bei der Frequenzauswertung waren vergleichsweise hohe Werte zu Beginn der Therapie. So ließen sich für alle Antigene, bis auf gp100₍₂₈₀₋₂₈₈₎, bereits vor der ersten Vakzine spezifische T-Zellen im Bereich von 0,01% bis 2,05% nachweisen. Im Verlauf sanken die Werte auf zum Teil nicht mehr nachweisbare Bereiche, jedoch konnten immer wieder vor der jeweiligen erneuten Vakzine hohe Werte gemessen werden. Dies wird in der nächsten Tabelle verdeutlicht.

Pat.Nr. 13

	1.Vakzine			2.Vakzine			3.Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)	0,24	0,05		0,44		0,13	0,13		
MART/MELAN A (27-35)	0,24	0,18	0,14	0,20		0,12	0,39		
MART MELAN A (26-36)	0,27	0,29		0,30		0,27	0,03	0,07	
Tyrosinase	0,06	0,15		0,22	0,00		0,32	0,04	
gp100(280-288)		0,05	0,01	0,16			0,23		
gp100 (154-162)	0,25	0,06	0,01	0,20			0,08		
gp100 (476-485)	1,16	0,03	0,37	0,12		0,04	0,17		
gp100 (457-466)	2,05	0,04		0,18		0,04	0,08		
gp100 (209-217)	0,01					0,03	0,19	0,07	

Tabelle Nr.8 : %CD8+/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 13 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Patient Nr. 17 bekam eine 1×10^7 Hybridzellvakzine subcutan injiziert. Zunächst hielt er sich während der ersten sechs Vakzinegaben mit seiner Erkrankung stabil. Bei Therapiebeginn wurde er mit Stadium IIIa eingestuft und hatte bereits Immuntherapie und Chemotherapie erhalten. Beim Immuntest zeigten sich auf 3 Recall-Antigene positive Antworten. Das Staging nach der sechsten Injektion wies neu aufgetretene Lymphknotenmetastasen auf und somit einen Progress der Erkrankung. Während der ersten drei Vakzinen fielen erhöhte spezifische T-Zellen erst 24h-48h nach Erhalt der ersten Injektion auf. Insgesamt zeigten sich keine hohen Werte, so wie bei den Patienten Nr. 13 und Nr. 7, sondern der Nachweis lag immer an der Nachweisgrenze oder marginal darüber. Dies wird in der folgenden Tabelle verdeutlicht.

Pat. 17

	1. Vakzine			2. Vakzine			3. Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)	1,90		0,04		0,01				0,03
MART/MELAN A (27-35)			0,05						0,01
MART MELAN A (26-36)			0,02	0,02	0,02				0,03
Tyrosinase			0,03	0,06	0,01				0,01
gp100(280-288)			0,05	0,04		0,01			0,01
gp100 (154-162)			0,04	0,03					0,02
gp100 (476-485)		0,02	0,02	0,04				0,02	
gp100 (457-466)			0,03	0,12					
gp100 (209-217)		0,01	0,04	0,07	0,16	0,16			0,05

Tabelle 9 : %CD8+/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 17 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Als einziger Patient von den 29 untersuchten Patienten hatte Patient Nr. 23 mit einer „partial response“ reagiert. Bei Therapiebeginn wurden vor allem Intransit-Metastasen und Lymphknotenmetastasen beschrieben. Nach der dritten Vakzine, die intranodal verabreicht wurde, zeigte sich eine Regression einiger Hautmetastasen. Ebenso wurde dies beim Staging nach der sechsten Vakzine dokumentiert. Der Immuntest vor Therapiebeginn zeigte lediglich eine positive Reaktion und zuvor wurde als Therapie eine Peptidvakzinierung durchgeführt. Da der Patient Nr. 23 das Merkmal HLA-A1 trägt wurden nur die beiden HLA-A1 restringierten Antigene und ihre Immunantworten untersucht. Beide Antigene zeigen vor Therapiebeginn leicht erhöhte spezifische CD8+/CD69+ Zellen. Für MAGE 1₍₁₆₁₋₁₆₈₎ lagen diese im Bereich von 0,05% und für MAGE 3₍₁₆₈₋₁₇₆₎ im Bereich von 0,03%. Im Verlauf sanken die Werte bis an die Nachweisgrenze. Die Immunantworten an den Frequenzen der tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen gemessen werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Pat. Nr. 23

	1. Vakzine			2. Vakzine			3. Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 1(161-168)	0,05		0,02	0,02	0,01	0,01			
MAGE 3(168-176)	0,03		0,02	0,02	0,01	0,01			0,40

Tabelle 10 : %CD8+/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 23 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Bei 22 Patienten wurde nach der dritten Vakzine durch das durchgeführte Staging eine Progredienz der Erkrankung festgestellt. Betrachtet man die Immunantworten dieser Patienten, so zeigen sich hier, wie in den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 verdeutlicht wurde, die unterschiedlichsten Immunantworten. So konnten bei Patient Nr. 28 kontinuierlich während der Meßzeitpunkte positive Immunantworten gemessen werden, die zum Teil Werte bis 1,83% erreichten. Das Gleiche gilt z.B. für Patient Nr.18, Patient Nr.19 oder Patient Nr.16. Letzterer hatte z.B. die Therapie ebenfalls im Stadium IV begonnen. Der vorher durchgeführte Immuntest war auf 2 Recall Antigene positiv und der Patient zeigte bei der Frequenzbestimmung steigende Werte der CD8+/CD69+IFN γ produzierenden T-Zellen. Trotzdem wurde ein Fortschreiten der kutanen Metastasen

nach der dritten Vakzine festgestellt. In der Tabelle 11 wird als Beispiel die Immunantwort des Patienten Nr.16 dargestellt.

Pat. Nr. 16

	1. Vakzine			2. Vakzine			3. Vakzine		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
MAGE 3(271-278)				0,16	0,21	0,03	0,09	0,32	1,44
MART/MELAN A (27-35)			0,03	0,38	0,11		0,09	0,11	
MART MELAN A (26-36)			0,06			0,02	0,33		
Tyrosinase			0,02		0,12	0,02	0,43	0,19	0,49
gp100(280-288)	0,06		0,08			0,02	0,23	0,17	
gp100 (154-162)	0,09		0,04				0,03	0,44	1,28
gp100 (476-485)	0,13		0,05		0,17		0,10	0,25	0,49
gp100 (457-466)			0,04		0,12	0,02	0,09	0,09	0,82
gp100 (209-217)	0,06		0,03		0,12	0,02	0,05	0,09	

Tabelle 11: %CD8/CD69+ und IFN γ produzierenden T-Zellen von Pat. Nr. 16 im zeitlichen Verlauf der Vakzinierung, in den leerstehenden Feldern wurden Frequenzen <0,01 gemessen und waren somit nicht relevant

Es lässt sich demnach für die in dieser Arbeit betrachteten Patienten und ihre Reaktionen auf die Hybridzellvakzinierung keine Korrelation zwischen Immunantwort und klinischem Verlauf der Erkrankung feststellen.

5. Diskussion

5.1 Immuntherapien beim Malignen Melanom

Weltweit wird für das Maligne Melanom an immuntherapeutischen Therapieansätzen geforscht, da zahlreiche Immunreaktionen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gegen diesen Tumor beschrieben worden sind. Diese Ansätze reichen von aktiven Immuntherapien wie z.B. der Peptidvakzinierung oder der Hybridzell-Vakzinierung bis zu unterstützenden Therapien durch immunstimulierende Ansätze oder Kombinationen der beiden erwähnten Ansätze. Es wurden auch Antikörper gegen CTL assoziierte Antigene eingesetzt, die eine Downregulation der zytotoxischen T-Zellen verhindern sollen¹⁴⁵. Es wurde sowohl die Induktion von Tumor-spezifischen Immunantworten beschrieben als auch z.T. eine Regression der Krankheit bei einzelnen Patienten beobachtet. Generell konnten bisher aber keine signifikanten Erfolge bei der Behandlung von Melanompatienten mit disseminierter Erkrankung erzielt werden^{126-128,146}. Die Fähigkeit des Immunsystems auf entstehende Tumoren einzuwirken, ist noch nicht genau erforscht. Da Tumore aus körpereigenen Zellen entstehen, könnten sie eventuell vom Immunsystem ignoriert werden. Jedoch konnte man Tumor-infiltrierende Lymphozyten aus Tumoren isolieren, die expandiert wurden und *in vitro* eine zytotoxische Aktivität gegen frisch isolierte Tumorzellen aufwiesen¹²⁹. Man kann nach diesen Untersuchungen davon ausgehen, dass eine Tumor-spezifische lokale Immunreaktion stattfinden kann. Weiterhin fand man heraus, dass manche Tumor-infiltrierenden T-Zellen spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene sind¹³⁰. Über die Bedeutung dieser Immunreaktionen ist man sich noch nicht im Klaren, vor allem, da man Tumor-spezifische T-Zellen auch bei Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf findet. So konnte in mehreren Fällen nachgewiesen werden, dass die Anzahl der spezifischen T-Zellen je nach Krankheitsstadium differiert und durch Therapien ebenfalls beeinflusst wird. So wurde in einem Fall festgestellt, dass nach Chemotherapie keine spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar waren¹⁴⁴. Der Ansatz die tumorspezifischen T-Zellen zu induzieren ist ein wesentliches Ziel der Immuntherapie, da man die T-Zellen unter anderem als treibende Kraft bei der Immunantwort gegen bestehende Tumore sieht. Die aktivierten spezifischen T-Zellen sollten idealerweise auf mehrere Tumor spezifische Antigen ansprechen und wenn

möglich sollten die entwickelten Vakzinen so individuell wie möglich auf den einzelnen Patienten zugeschnitten sein

In den für diese Arbeit ausgewerteten Fällen konnten häufig bereits vor der ersten Vakzine spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, was per se schon einmal an der Aktivität dieser Zellen hinsichtlich einer Tumoreradikation zweifeln lässt, da diese ja bei wachsenden Tumoren nachgewiesen wurden. Während der Vakzinierungen sah man meistens einen Anstieg der Frequenzen der spezifischen T-Zellen nach 24 oder 48 Stunden. Man kann in diesen Fällen davon ausgehen, dass bereits eine Immunreaktion auf den Tumor bestanden hat und diese durch die Therapie nochmals angestoßen wurde.

Bei den Patienten, die vor der ersten Vakzine keine spezifischen T-Zellen zeigten, wurden Anstiege erst nach der zweiten oder dritten Vakzine gesehen. Dort kann man noch eher von einer Immunantwort ausgehen, die durch die Therapie entstanden ist und eine bestehende kleine antigen-spezifische T-Zellpopulation durch die Vakzine expandiert wurde.

Die Frequenzen der spezifischen T-Zellen korrelierten in der Regel nicht mit der klinischen Entwicklung der Erkrankung oder einem Regress des Tumors.

Dafür könnten verschiedene Gründe verantwortlich sein, wie z.B. eine vom Tumor produzierte immunsupprimierende Substanz. Es könnten auch Anzahl und der funktionelle Status der spezifischen T-Zellen unzureichend für die Bekämpfung des Tumors sein. Eine zur Therapie erzeugte Vakzine sollte demnach versuchen, tumor-spezifische T-Zellen optimal zu aktivieren und *in vivo* zu expandieren.

Verschiedene Ansätze für solche Vakzine-Therapien werden weiterhin untersucht.

Generell werden dabei zwei Konzepte verfolgt, entweder die Verwendung von definierten Antigenen oder der Einsatz von ganzen Tumorzellen oder deren RNA. Der Vorteil von Immuntherapien mit definierten Antigenen liegt in der systematischen Kontrolle, die es möglich macht, die Immunantwort in Verbindung mit den klinischen Resultaten zu bringen¹³¹. Allerdings benötigen diese Ansätze immer die Unterstützung von stimulatorischen Adjuvantien, ohne die eine ausreichende Aktivierung der T-Zellen nicht zustande käme.

Werden autologe Tumorzellen benutzt, so sind alle relevanten Tumorantigene in der Vakzine enthalten. Es gestaltet sich jedoch schwierig die Ansprechrate der Therapie mit der Immunantwort zu korrelieren, da mehrere Variablen berücksichtigt werden müssen.

In einigen Fällen wurde der Zusammenhang zwischen einer Immunantwort gegen Tumor-spezifische Antigene und einer klinischen Antwort gezeigt¹³².

Für die Evaluation aller dieser Ansätze ist es wichtig, die spezifisch induzierte T-Zellantwort genau zu untersuchen.

5.2. Hybridzell Vakzination

Die aus allogenen Dendritischen Zellen (DC) und autologen Tumorzellen generierten Hybridzellen exprimieren sowohl MHC Klasse I, MHC Klasse II und kostimulatorische Moleküle der DCs als auch bekannte und unbekannte Antigene des Tumors. Somit können polyklonale zytotoxische T-Zell Antworten gegen multiple Antigene induziert oder verstärkt werden. Sowohl im Tierversuch als auch in klinischen Studien sind positive Effekte der Hybridzelltherapie mit DCs beschrieben worden^{120,133,134}. Zu den Vorteilen der allogenen Dendritischen Zellen gehören, dass hohe Frequenzen von T-Zellen auf fremde MHC-Moleküle reagieren und dass die von einem gesunden Spender stammenden Zellen in ihrer antigenpräsentierenden Funktion wahrscheinlich intakter sind als die DCs des Patienten. Die allo-fusionierten Hybridzellen aktivieren durch ihre immunpräsentierenden Eigenschaften sowohl CD4+ T-Zellen als auch CD8+ T-Zellen¹²¹. Somit werden Bedingungen, die Tumor Vakzine-Therapien beinhalten sollten, erfüllt. Es werden zytotoxische T-Zellen induziert, die auf ein breites Spektrum von tumorspezifischen Antigenen des Patienten reagieren. Im Tierversuch wurde nachgewiesen, dass die Fusion allogener DCs mit Tumorzellen im Vergleich zu autologen DCs vorteilhafter ist, was die Induktion der Immunantwort betrifft. Für die hier untersuchte Studie wurden allogene Dendritische Zellen und autologe Tumorzellen fusioniert und für die Vakzination von Melanompatienten eingesetzt. Mit der Hybridzell-Vakzine wurden 29 Melanompatienten im Krankheitsstadium III oder IV behandelt. Bei 22 Patienten wurde eine Progredienz der Erkrankung festgestellt. Ein Stillstand der Erkrankung zeigte sich bei 4 Patienten, wobei 2 nach einer längeren Pause der Vakzinierungen ebenfalls eine Progredienz der Metastasen aufwiesen. Bei einem Patienten, Nr. 23, zeigte sich ein partieller Rückgang der Erkrankung. Viele der Patienten, die nachweislich mit einer Induktion der IFN γ produzierenden CD8⁺/CD69⁺ T-Zellen auf die Vakzine reagierten, zeigten klinisch ein Fortschreiten der Erkrankung. So z.B. Patient Nr. 20, der auf die Stimulation durch gp100₄₅₇₋₄₆₆ mit

einer Frequenzerhöhung von 1,13% reagierte und dessen Therapie nach 3 Vakzinationszyklen abgebrochen werden musste, da die Erkrankung sich als progredient erwies. Generell fiel bei diesem Patienten eine leichte Erhöhung der spezifischen T Zellen auf.

Dieses Paradoxon ist öfters in der Literatur bei verschiedenen Vakzinetherapien beschrieben worden¹³⁵. So fiel bei einer auf dem gp100₂₀₉₋₂₁₇ Peptid basierten Vakzine ein Anstieg der spezifischen T-Zellen auf, jedoch blieb auch hier eine positive klinische Antwort aus⁵⁴. Es ist noch nicht ganz klar, ob die ausgelösten Immunantworten nicht ausreichen, um den Tumor anzugreifen, oder ob den induzierten CTLs bestimmte Qualitäten fehlen, um eine positive Reaktion auszulösen.

Als eine Erklärung für dieses Phänomen könnten diverse Fähigkeiten des Tumors, sich dem Immunsystem zu entziehen, dienen. Während des Fortschreitens einer Melanomerkkrankung entzieht sich der Tumor durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. durch den Tumor selbst induzierte Immunsuppression, MHC-Herunterregulation, entstehende Anergie oder andere noch unbekanntes Abläufe, dem Immunsystem und kann somit nicht effizient angegriffen werden¹³⁶. Für diese Tatsache spricht auch, dass bei unbehandelten Melanompatienten ebenfalls melanomspezifische T-Zellen gefunden worden sind, der Tumor jedoch nicht am Wachstum und an der Metastasierung gehindert wurde. Wenn diese Antigen-spezifischen T-Zellen zu Beginn der Erkrankung vorhanden und potentiell aktivierbar sind, wäre es sinnvoll, eine Immuntherapie zu einem Zeitpunkt zu beginnen, bevor Anergie und Tumor-escape Mechanismen des Tumors die T-Zellen beeinflussen können. Ist ein Eingreifen zu einem so frühen Stadium nicht möglich, sollte man, um eine erfolgreiche Immuntherapie zu entwickeln, versuchen, durch stimulierende Signale den Tumor für das Immunsystem wieder „erkennbar“ zu machen. So probiert man, die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor zu durchbrechen. Vielversprechender für die Zukunft der Immuntherapien wären möglicherweise Kombinationen aus mehreren Ansätzen so dass man sowohl aktive als auch passive Immuntherapien kombiniert und versucht die humoralen und die T-Zell vermittelten Immunmechanismen zu aktivieren¹³⁷.

Bei Patient Nr. 7 fällt auf, dass, solange die monatliche Vakzine stattgefunden hat, ein Stillstand der Erkrankung erzielt wurde. Als dann aufgrund der fehlenden Tumorzellen, die man zur Herstellung der Vakzine braucht, die Therapie eingestellt werden musste, reagierte er mit einem Fortschreiten der Erkrankung. Hier zeigt sich ein wesentlicher Nachteil der Hybridzell-Therapie. Für die Herstellung der Vakzine braucht man relativ

viel Tumormaterial. Das bedeutet, der Patient ist bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Melanomerkrankung, was die Prognose der Heilung, bzw. der Überlebenszeit, deutlich reduziert. Um dieses Phänomen zu umgehen, müsste man Tumorzelllinien der einzelnen Patienten generieren und aus diesen reproduzierbaren Zellen dann die Vakzine herstellen.

Eine weitere erfolgsversprechende Strategie beim Melanom, die dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen beinhaltet, benutzt die autologe RNA der Tumorzellen und baut diese in dendritische Zellen ein ¹³⁸. Diese Methode würde keine große Tumormasse benötigen, dennoch stellt sich die Generierung der RNA und die Herstellung der Vakzine als noch nicht optimal ausgereift dar.

Bei beiden Therapien, der Hybridzell-Therapie und der die RNA einbauenden Therapie, ist der Vorteil, dass spezifische Antigene des einzelnen Tumors repräsentiert sind und somit ein breites Spektrum bieten, welches vom Immunsystem erkannt wird und dann möglicherweise in der Induktion von CTLs resultiert ¹³⁹.

5.3 Bedeutung der Frequenzanalyse Antigen-spezifischer T-Zellen

Um Immuntherapien gegen Tumoren so effizient wie möglich entwickeln zu können muss man das Immungeschehen bei den Patienten auf zellulärer und molekularer Ebene genau untersuchen. Dabei sollte man vor allem versuchen Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen zu identifizieren und hinsichtlich ihrer Frequenz, ihres Phänotyps, ihres physiologischen Zustandes und ihres Reaktionsvermögens zu untersuchen. Diese Analysen würden helfen, das Verhältnis zwischen Tumor und Immunsystem besser zu verstehen und die Effekte einer Immuntherapie zu evaluieren zu können.

Mit der FACS Methode können die Frequenz und Aktivität der CTL Antwort gemessen werden. Nicht zu beurteilen sind die Kinetik der Immunreaktion und die langwierigen Auswirkungen der Therapie.

Mittels Frequenzanalyse wurden zudem die unterschiedlichen Injektionsorte verglichen und versucht einen Rückschluß auf die Höhe des Frequenzanstieges zu schließen. In der kleinen Gruppe, die für diese Arbeit betrachtet wurde ließ sich statistisch kein relevanter Unterschied zwischen der subcutanen Gabe oder der intranodalen Gabe der Vakzine feststellen. Auch die Zahl der verabreichten Hybridzellen spielte für das Verhalten der spezifischen T-Zellen keine Rolle.

In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass die gemessenen Frequenzen der spezifischen

T-Zellen nicht mit der klinischen Entwicklung der einzelnen Patienten korrelieren. So wurden bei den Patienten, die mit „stable disease“ eingestuft wurden, weder sehr hohe Werte an CD8+/CD69+ Zellen vor Beginn der Therapie noch im zeitlichen Verlauf nachgewiesen. Ebenso hatten die Patienten, die ein Fortschreiten der Erkrankung aufwiesen, zum Teil sehr hohe Immunantworten auf die Hybridzellvakzinierung. Diese Phänomene können sich durch die bereits beschriebenen Tumor „escape“ Mechanismen oder inaktivierte spezifische T-Zellen erklären lassen. Wichtig für das Verstehen solcher Mechanismen, für das weitere Entwickeln von Immuntherapien und für die Kontrolle der Therapie bei Melanompatienten sind unter anderem die Frequenzanalysen der spezifischen T-Zellen¹⁴⁰ .

6. Zusammenfassung

Für diese Arbeit wurden bei 29 Patienten mit malignem Melanom Stadium III oder IV die Frequenzen von spezifischen T-Zellen nach Hybridzellvakzination gemessen.

Für das maligne Melanom wird an vielen Immuntherapien geforscht. Unter anderem werden Studien mit autologen, allogenen oder Peptidvakzinen durchgeführt. Hier wurde den Patienten Tumormaterial zur Herstellung einer autologen Vakzine entnommen und mit Dendritischen Zellen von Spendern fusioniert. Ziel einer solchen Vakzine ist es, das Immunsystem des Patienten erneut mit den Antigenen des Tumors in Kontakt zu bringen und dadurch eine Immunantwort zu bewirken. Fokus dieser Immunantwort sind tumorspezifische zytotoxische T-Zellen, die man als Haupteffektorzellen der Anti-Tumor Immunantwort betrachtet.

Es wurden die Frequenzen dieser Tumor spezifischen T-Zellen mittels FACS Analyse vor der Vakzinierung und jeweils 24 Stunden und 48 Stunden danach gemessen. Ausgewertet wurden die ersten drei Vakzinationszyklen. Zudem wurden unterschiedliche Injektionssorte und eine unterschiedliche Anzahl der injizierten Hybridzellen miteinander verglichen. Es stellte sich außerdem die Frage, ob es eine Korrelation mit der klinischen Entwicklung der Erkrankung der einzelnen Patienten gibt.

Zum Teil wurden für die einzelnen Tumorantigene nach Stimulation Frequenzen der spezifischen T-Zellen im Bereich von 0,01%-8% gemessen, zum Teil ließen sich jedoch keine spezifischen T-Zellen nachweisen. Es wurden, je nach Patient HLA-A2 oder HLA –A1 restringierte Tumorantigene untersucht.

Eine Korrelation mit den klinischen Krankheitsverläufen ließ sich nicht erkennen. Ebenso wenig wurde ein relevanter Unterschied weder den Injektionsort noch die Anzahl der injizierten Zellen betreffend festgestellt.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass man noch dabei ist die jeweiligen Immuntherapien beim malignem Melanom zu verstehen und zu verbessern. Ein Schritt dabei ist die Analyse der durch die Therapie induzierten Immunantwort durch z.B. die Bestimmung der Frequenzen der induzierten T-Zellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Balch,C.M., Buzaid,A.C., Soong,S.J., Atkins,M.B., Cascinelli,N., Coit,D.G., Fleming,I.D., Gershenwald,J.E., Houghton,A., Kirkwood,J.M., McMasters,K.M., Mihm,M.F., Morton,D.L., Reintgen,D.S., Ross,M.I., Sober,A., Thompson,J.A., & Thompson,J.F. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. *Semin Surg Oncol* **21**, 43-52 (2003).
2. Schuchter,L., Schultz,D.J., Synnestvedt,M., Trock,B.J., Guerry,D., Elder,D.E., Elenitsas,R., Clark,W.H., & Halpern,A.C. A Prognostic Model for Predicting 10-Year Survival in Patients with Primary Melanoma. *Ann Intern Med* **125**, 369-375 (1996).
3. Günther Sebastian and Annette Stein. Das maligne Melanom der Haut. UNI-MED Verlag AG. 1, 24-28. 1-9-2000. Bremen, International Medical Publishers .
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
Ref ID: 19
4. Katalinic,A., Kunze,U., & Schafer,T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol* **149**, 1200-1206 (2003).
5. Garbe,C. & Blum,A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**, 280-290 (2001).
6. Diepgen,T.L. & Mahler,V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* **146 Suppl 61**, 1-6 (2002).
7. Fritsch, P. Dermatologie, Venerologie. 2, 630-647. 1-7-2003. Heidelberg, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
Ref ID: 20
8. Garbe,C. [Risk factors for the development of malignant melanoma and identification of risk groups in German-speaking regions]. *Hautarzt* **46**, 309-314 (1995).
9. Bouwes Bavinck,J.N., Hardie,D.R., Green,A., Cutmore,S., MacNaught,A., O'Sullivan,B., Siskind,V., Van Der Woude,F.J., & Hardie,I.R. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* **61**, 715-721 (1996).
10. Rosenberg,S.A., Yannelli,J.R., Yang,J.C., Topalian,S.L., Schwartzentruber,D.J., Weber,J.S., Parkinson,D.R., Seipp,C.A., Einhorn,J.H., & White,D.E. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor- infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1159-1166 (1994)

11. Salgaller, M.L., Marincola, F.M., Cormier, J.N., & Rosenberg, S.A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* **56**, 4749-4757 (1996).
12. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J Med* **313**, 1485-1492 (1985).
13. Ridgway, D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* **21**, 873-886 (2003).
14. Nestle, F.O., Burg, G., & Dummer, R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* **20**, 5-7 (1999).
15. Carreno, B.M. & Collins, M. THE B7 FAMILY OF LIGANDS AND ITS RECEPTORS: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* **20**, 29-53 (2002).
16. Waldrop, S.L., Davis, K.A., Maino, V.C., & Picker, L.J. Normal Human CD4+ Memory T Cells Display Broad Heterogeneity in Their Activation Threshold for Cytokine Synthesis. *J Immunol* **161**, 5284-5295 (1998).
17. Chtanova, T. & Mackay, C.R. T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* **78**, 233-266 (2001).
18. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **85**, 9-18 (2000).
19. Ridge, J.P., Di Rosa, F., & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478 (1998).
20. Walunas, T.L. & Bluestone, J.A. CTLA-4 Regulates Tolerance Induction and T Cell Differentiation In Vivo. *J Immunol* **160**, 3855-3860 (1998).
21. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* **3**, 361-370 (2003).
22. Russell, J.H. & Ley, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370 (2002).
23. Trambas, C.M. & Griffiths, G.M. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* **4**, 399-403 (2003).

24. Balaji,K.N., Schaschke,N., Machleidt,W., Catalfamo,M., & Henkart,P.A. Surface Cathepsin B Protects Cytotoxic Lymphocytes from Self-destruction after Degranulation. *J. Exp. Med.* **196**, 493-503 (2002)
25. Opferman,J.T., Ober,B.T., Narayanan,R., & Ashton-Rickardt,P.G. Suicide induced by cytolytic activity controls the differentiation of memory CD8+ T lymphocytes. *Int. Immunol.* **13**, 411-419 (2001).
26. Boon,T., Cerottini,J.C., Van den Eynde,B., van der Bruggen,P., & Van Pel,A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **12**, 337-365 (1994).
27. Coulie,P.G., Weynants,P., Lehmann,F., Herman,J., Brichard,V., Wolfel,T., Van Pel,A., De Plaen,E., Brasseur,F., & Boon,T. Genes coding for tumor antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes. *J Immunother* **14**, 104-109 (1993).
28. Kirkin,A.F., Dzhandzhugazyan,K., & Zeuthen,J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS* **106**, 665-679 (1998).
29. van der Bruggen,P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den Eynde,B., Knuth,A., & Boon,T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, Vol **254**, Issue 5038, 1643-1647 (1991).
30. Zendman,A.J., Ruiter,D.J., & Van Muijen,G.N. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* **194**, 272-288 (2003).
31. Lucas,S., De Smet,C., Arden,K.C., Viars,C.S., Lethe,B., Lurquin,C., & Boon,T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* **58**, 743-752 (1998).
32. Chen,Y.T., Scanlan,M.J., Sahin,U., Tureci,O., Gure,A.O., Tsang,S., Williamson,B., Stockert,E., Pfreundschuh,M., & Old,L.J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *PNAS* **94**, 1914-1918 (1997).
33. Tureci,O., Chen,Y.T., Sahin,U., Gure,A.O., Zwick,C., Villena,C., Tsang,S., Seitz,G., Old,L.J., & Pfreundschuh,M. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* **77**, 19-23 (1998).
34. Scanlan,M.J., Simpson,A.J., & Old,L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* **4**, 1 (2004).
35. Van den Eynde,B.J. & van der Bruggen,P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 684-693 (1997).

36. De Plaen,E., Arden,K., Traversari,C., Gaforio,J.J., Szikora,J.P., De Smet,C., Brasseur,F., van der Bruggen,P., Lethe,B., & Lurquin,C. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-369 (1994).
37. Yamashita,N., Ishibashi,H., Hayashida,K., Kudo,J., Takenaka,K., Itoh,K., & Niho,Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **24**, 1437-1440 (1996).
38. Kocher,T., Schultz-Thater,E., Gudat,F., Schaefer,C., Casorati,G., Juretic,A., Willmann,T., Harder,F., Heberer,M., & Spagnoli,G.C. Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res* **55**, 2236-2239 (1995).
39. Walker,C., Robertson,L., Myskow,M., & Dixon,G. Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* **72**, 164-169 (1995).
40. Pfreundschuh,M., Shiku,H., Takahashi,T., Ueda,R., Ransohoff,J., Oettgen,H.F., & Old,L.J. Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *PNAS Vol* **75**, 5122-5126 (1978).
41. Jager,E., Jager,D., & Knuth,A. Peptide Vaccination in Clinical Oncology. *Onkologie* **23**, 410-415 (2000).
42. Ohman,F. & Nordqvist,K. The melanoma antigen genes--any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res* **265**, 185-194 (2001).
43. Weber,J., Salgaller,M., Samid,D., Johnson,B., Herlyn,M., Lassam,N., Treisman,J., & Rosenberg,S.A. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **54**, 1766-1771 (1994).
44. De Smet,C., De Backer,O., Faraoni,I., Lurquin,C., Brasseur,F., & Boon,T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *PNAS* **93**, 7149-7153 (1996).
45. Esteller,M. & Herman,J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* **196**, 1-7 (2002).
46. Jassim,A., Ollier,W., Payne,A., Biro,A., Oliver,R.T., & Festenstein,H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol* **19**, 1215-1220 (1989).
47. Stevanovic,S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer* **2**, 514-520 (2002).
48. Anichini,A., Maccalli,C., Mortarini,R., Salvi,S., Mazzocchi,A., Squarcina,P., Herlyn,M., & Parmiani,G. Melanoma cells and normal melanocytes share

antigens recognized by HLA- A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J. Exp. Med.* **177**, 989-998 (1993).

49. Juretic,A., Spagnoli,G.C., Schultz-Thater,E., & Sarcevic,B. Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies. *Lancet Oncol* **4**, 104-109 (2003).
50. Brichard,V., Van Pel,A., Wolfel,T., Wolfel,C., De Plaen,E., Lethe,B., Coulie,P., & Boon,T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**, 489-495 (1993).
51. Wolfel,T., Schneider,J., Meyer,Z.B., Rammensee,H.G., Rotzschke,O., & Falk,K. Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes (CTL) on human melanoma cells in association with HLA-A2.1. *Int J Cancer* **57**, 413-418 (1994).
52. Bouchard,B., Fuller,B.B., Vijayasradhi,S., & Houghton,A.N. Induction of pigmentation in mouse fibroblasts by expression of human tyrosinase cDNA. *J. Exp. Med.* **169**, 2029-2042 (1989).
53. Topalian,S.L., Rivoltini,L., Mancini,M., Markus,N.R., Robbins,P.F., Kawakami,Y., & Rosenberg,S.A. Human CD4+ T Cells Specifically Recognize a Shared Melanoma-Associated Antigen Encoded by the Tyrosinase Gene. *PNAS* **91**, 9461-9465 (1994).
54. Lee,K.H., Wang,E., Nielsen,M.B., Wunderlich,J., Migueles,S., Connors,M., Steinberg,S.M., Rosenberg,S.A., & Marincola,F.M. Increased Vaccine-Specific T Cell Frequency After Peptide-Based Vaccination Correlates with Increased Susceptibility to In Vitro Stimulation But Does Not Lead to Tumor Regression. *J Immunol* **163**, 6292-6300 (1999).
55. Lotz,C., Ferreira,E.A., Drexler,I., Mutallib,S.A., Huber,C., Sutter,G., & Theobald,M. Partial tyrosinase-specific self tolerance by HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice and man. *Int J Cancer* **108**, 571-579 (2004).
56. Kawakami,Y., Eliyahu,S., Delgado,C.H., Robbins,P.F., Sakaguchi,K., Appell,E., Yannelli,J.R., Adema,G.J., Miki,T., & Rosenberg,S.A. Identification of a Human Melanoma Antigen Recognized by Tumor-Infiltrating Lymphocytes Associated with in vivo Tumor Rejection. *PNAS* **91**, 6458-6462 (1994).
57. Coulie,P.G., Brichard,V., Van Pel,A., Wolfel,T., Schneider,J., Traversari,C., Mattei,S., De Plaen,E., Lurquin,C., & Szikora,J.P. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**, 35-42 (1994).
58. Kawakami,Y., Eliyahu,S., Delgado,C.H., Robbins,P.F., Rivoltini,L., Topalian,S.L., Miki,T., & Rosenberg,S.A. Cloning of the gene coding for a shared human

melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* **91**, 3515-3519 (1994).

59. Rivoltini,L., Squarcina,P., Loftus,D.J., Castelli,C., Tarsini,P., Mazzocchi,A., Rini,F., Viggiano,V., Belli,F., & Parmiani,G. A Superagonist Variant of Peptide MART1/Melan A27-35 Elicits Anti-Melanoma CD8+ T Cells with Enhanced Functional Characteristics: Implication for More Effective Immunotherapy. *Cancer Res* **59**, 301-306 (1999).
60. Wang,F., Bade,E., Kuniyoshi,C., Spears,L., Jeffery,G., Marty,V., Groshen,S., & Weber,J. Phase I Trial of a MART-1 Peptide Vaccine with Incomplete Freund's Adjuvant for Resected High-Risk Melanoma. *Clin Cancer Res* **5**, 2756-2765 (1999).
61. Kawakami,Y., Eliyahu,S., Sakaguchi,K., Robbins,P.F., Rivoltini,L., Yannelli,J.R., Appella,E., & Rosenberg,S.A. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* **180**, 347-352 (1994).
62. Cox,A.L., Skipper,J., Chen,Y., Henderson,R.A., Darrow,T.L., Shabanowitz,J., Engelhard,V.H., Hunt,D.F., & Slingluff,C.L. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, Vol **264**, 716-719 (1994).
63. Kawakami,Y., Eliyahu,S., Jennings,C., Sakaguchi,K., Kang,X., Southwood,S., Robbins,P.F., Sette,A., Appella,E., & Rosenberg,S.A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* **154**, 3961-3968 (1995).
64. Kawakami,Y., Robbins,P.F., Wang,X., Tupesis,J.P., Parkhurst,M.R., Kang,X., Sakaguchi,K., Appella,E., & Rosenberg,S.A. Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J Immunol* **161**, 6985-6992 (1998).
65. Engelhard,V.H., Bullock,T.N., Colella,T.A., Sheasley,S.L., & Mullins,D.W. Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* **188**, 136-146 (2002).
66. Mandelcorn-Monson,R.L., Shear,N.H., Yau,E., Sambhara,S., Barber,B.H., Spaner,D., & DeBenedette,M.A. Cytotoxic T Lymphocyte Reactivity to gp100, MelanA/MART-1, and Tyrosinase, in HLA-A2-Positive Vitiligo Patients. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 550-556 (2003).
67. Yee,C., Thompson,J.A., Roche,P., Byrd,D.R., Lee,P.P., Piepkorn,M., Kenyon,K., Davis,M.M., Riddell,S.R., & Greenberg,P.D. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med* **192**, 1637-1644 (2000).

68. Anichini,A., Mortarini,R., Maccalli,C., Squarcina,P., Fleischhauer,K., Mascheroni,L., & Parmiani,G. Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma. *J Immunol* **156**, 208-217 (1996).
69. Hunter,T. Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**, 249-270 (1991).
70. Bishop,J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248 (1991).
71. Mayrand,S.M., Schwarz,D.A., & Green,W.R. An Alternative Translational Reading Frame Encodes an Immunodominant Retroviral CTL Determinant Expressed by an Immunodeficiency-Causing Retrovirus. *J Immunol* **160**, 39-50 (1998).
72. Guilloux,Y., Lucas,S., Brichard,V.G., Van Pel,A., Viret,C., De Plaen,E., Brasseur,F., Lethé,B., Jotereau,F., & Boon,T. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N- acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* **183**, 1173-1183 (1996).
73. Malarkannan,S., Afkarian,M., & Shastri,N. A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells. *J. Exp. Med.* **182**, 1739-1750 (1995).
74. Kageshita,T., Hirai,S., Ono,T., Hicklin,D.J., & Ferrone,S. Down-Regulation of HLA Class I Antigen-Processing Molecules in Malignant Melanoma : Association with Disease Progression. *Am J Pathol* **154**, 745-754 (1999).
75. Marin,R., Ruiz-Cabello,F., Pedrinaci,S., Mendez,R., Jimenez,P., Geraghty,D.E., & Garrido,F. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* **54**, 767-775 (2003).
76. Bai,X.F., Liu,J., Li,O., Zheng,P., & Liu,Y. Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **111**, 1487-1496 (2003).
77. Wang,Z., Margulies,L., Hicklin,D.J., & Ferrone,S. Molecular and functional phenotypes of melanoma cells with abnormalities in HLA class I antigen expression. *Tissue Antigens* **47**, 382-390 (1996).
78. Lee,K.H., Panelli,M.C., Kim,C.J., Riker,A.I., Bettinotti,M.P., Roden,M.M., Fetsch,P., Abati,A., Rosenberg,S.A., & Marincola,F.M. Functional Dissociation Between Local and Systemic Immune Response During Anti-Melanoma Peptide Vaccination. *J Immunol* **161**, 4183-4194 (1998).
79. Kono,K., Takahashi,A., Amemiya,H., Ichihara,F., Sugai,H., Iizuka,H., Fujii,H., & Matsumoto,Y. Frequencies of HER-2/neu overexpression relating to HLA haplotype in patients with gastric cancer. *Int J Cancer* **98**, 216-220 (2002).

80. Taylor,D.D., Bender,D.P., Gercel-Taylor,C., Stanson,J., & Whiteside,T.L. Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* **84**, 1624-1629 (2001).
81. Zhang,X.M. & Xu,Q. Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes. *Melanoma Res* **11**, 559-567 (2001).
82. Liotta,L.A. & Kohn,E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**, 375-379 (2001).
83. Itoh,N., Yonehara,S., Ishii,A., Yonehara,M., Mizushima,S., Sameshima,M., Hase,A., Seto,Y., & Nagata,S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243 (1991).
84. Soubrane,C., Mouawad,R., Antoine,E.C., Verola,O., Gil-Delgado,M., & Khayat,D. A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br J Dermatol* **143**, 307-312 (2000).
85. Hahne,M., Rimoldi,D., Schroter,M., Romero,P., Schreier,M., French,L.E., Schneider,P., Bornand,T., Fontana,A., Lienard,D., Cerottini,J.C., & Tschopp,J. Melanoma Cell Expression of Fas(Apo-1/CD95) Ligand: Implications for Tumor Immune Escape. *Science* **274**, 1363-1366 (1996).
86. Chen,Y.L., Chen,S.H., Wang,J.Y., & Yang,B.C. Fas Ligand on Tumor Cells Mediates Inactivation of Neutrophils. *J Immunol* **171**, 1183-1191 (2003).
87. Rivoltini,L., Radrizzani,M., Accornero,P., Squarcina,P., Chiodoni,C., Mazzocchi,A., Castelli,C., Tarsini,P., Viggiano,V., Belli,F., Colombo,M.P., & Parmiani,G. Human Melanoma-Reactive CD4+ and CD8+ CTL Clones Resist Fas Ligand-Induced Apoptosis and Use Fas/Fas Ligand-Independent Mechanisms for Tumor Killing. *J Immunol* **161**, 1220-1230 (1998).
88. Ferrarini,M., Imro,M.A., Sciorati,C., Heltai,S., Protti,M.P., Pellicciari,C., Rovere,P., Manfredi,A.A., & Rugarli,C. Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes. *Int J Cancer* **81**, 573-579 (1999).
89. Anichini,A., Molla,A., Mortarini,R., Tragni,G., Bersani,I., Di Nicola,M., Gianni,A.M., Pilotti,S., Dunbar,R., Cerundolo,V., & Parmiani,G. An Expanded Peripheral T Cell Population to a Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)-defined, Melanocyte-specific Antigen in Metastatic Melanoma Patients Impacts on Generation of Peptide-specific CTLs but Does Not Overcome Tumor Escape from Immune Surveillance in Metastatic Lesions. *J. Exp. Med.* **190**, 651-668 (1999).
90. Rivoltini,L., Loftus,D.J., Squarcina,P., Castelli,C., Rini,F., Arienti,F., Belli,F., Marincola,F.M., Geisler,C., Borsatti,A., Appella,E., & Parmiani,G. Recognition of

melanoma-derived antigens by CTL: possible mechanisms involved in down-regulating anti-tumor T-cell reactivity. *Crit Rev Immunol* **18**, 55-63 (1998).

91. Loftus,D.J., Squarcina,P., Nielsen,M.B., Geisler,C., Castelli,C., Odum,N., Appella,E., Parmiani,G., & Rivoltini,L. Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8+ T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitope MART1(27-35). *Cancer Res* **58**, 2433-2439 (1998).
92. Vilches,C. & Parham,P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **20**, 217-251 (2002).
93. Moretta,L. & Moretta,A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Cancer Research*, Vol. **23**, 9180-9184 (2004).
94. Soloski,M.J. Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **13**, 154-162 (2001).
95. Mingari,M.C., Moretta,A., & Moretta,L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol Today* **19**, 153-157 (1998).
96. Huard,B. & Karlsson,L. A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol* **30**, 1665-1675 (2000).
97. Chen,Q., Daniel,V., Maher,D.W., & Hersey,P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* **56**, 755-760 (1994).
98. Yue,F.Y., Dummer,R., Geertsen,R., Hofbauer,G., Laine,E., Manolio,S., & Burg,G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* **71**, 630-637 (1997).
99. Mahanty,S., Mollis,S.N., Ravichandran,M., Abrams,J.S., Kumaraswami,V., Jayaraman,K., Ottesen,E.A., & Nutman,T.B. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J Infect. Dis.* **173**, 769-773 (1996).
100. Valmori,D., Scheibenbogen,C., Dutoit,V., Nagorsen,D., Asemissen,A.M., Rubio-Godoy,V., Rimoldi,D., Guillaume,P., Romero,P., Schadendorf,D., Lipp,M., Dietrich,P.Y., Thiel,E., Cerottini,J.C., Lienard,D., & Keilholz,U. Circulating Tumor-reactive CD8+ T Cells in Melanoma Patients Contain a CD45RA+CCR7- Effector Subset Exerting ex Vivo Tumor-specific Cytolytic Activity. *Cancer Res* **62**, 1743-1750 (2002).

101. Jager,E., Jager,D., & Knuth,A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* **14**, 178-182 (2002).
102. Davis,I.D., Jefford,M., Parente,P., & Cebon,J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* **73**, 3-29 (2003).
103. Rosenberg,S.A., Yang,J.C., White,D.E., & Steinberg,S.M. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* **228**, 307-319 (1998).
104. Parmiani,G., Castelli,C., Rivoltini,L., Casati,C., Tully,G.A., Novellino,L., Patuzzo,A., Tosi,D., Anichini,A., & Santinami,M. Immunotherapy of melanoma. *Semin Cancer Biol* **13**, 391-400 (2003).
105. Ridolfi,L., Ridolfi,R., Riccobon,A., De Paola,F., Petrini,M., Stefanelli,M., Flamini,E., Ravaioli,A., Verdecchia,G.M., Trevisan,G., & Amadori,D. Adjuvant immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with resected stage III and IV melanoma. *J Immunother* **26**, 156-162 (2003).
106. Rosenberg,S.A., Yang,J.C., Schwartzentruber,D.J., Hwu,P., Marincola,F.M., Topalian,S.L., Restifo,N.P., Dudley,M.E., Schwarz,S.L., Spiess,P.J., Wunderlich,J.R., Parkhurst,M.R., Kawakami,Y., Seipp,C.A., Einhorn,J.H., & White,D.E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* **4**, 321-327 (1998).
107. Pala,P., Hussell,T., & Openshaw,P.J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* **243**, 107-124 (2000).
108. Brosterhus,H., Brings,S., Leyendeckers,H., Manz,R.A., Miltenyi,S., Radbruch,A., Assenmacher,M., & Schmitz,J. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur. J Immunol* **29**, 4053-4059 (1999).
109. Suni,M.A., Picker,L.J., & Maino,V.C. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* **212**, 89-98 (1998).
110. Labarriere,N., Pandolfino,M.C., Raingeard,D., Le Guiner,S., Diez,E., Le Drean,E., Dreno,B., & Jotereau,F. Frequency and relative fraction of tumor antigen-specific T cells among lymphocytes from melanoma-invaded lymph nodes. *Int J Cancer* **78**, 209-215 (1998).
111. Misumi,Y., Misumi,Y., Miki,K., Takatsuki,A., Tamura,G., & Ikehara,Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **261**, 11398-11403 (1986).

112. Stuhler,G. & Walden,P. Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* **39**, 342-345 (1994).
113. Guo,Y., Wu,M., Chen,H., Wang,X., Liu,G., Li,G., Ma,J., & Sy,M.S. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells.*Science*, Vol. **263**, 518-520 (1994).
114. Ridge,J.P., Di Rosa,F., & Matzinger,P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478 (1998).
115. Baxevanis,C.N., Voutsas,I.F., Tsitsilonis,O.E., Gritzapis,A.D., Sotiriadou,R., & Papamichail,M. Tumor-Specific CD4+ T Lymphocytes from Cancer Patients Are Required for Optimal Induction of Cytotoxic T Cells Against the Autologous Tumor. *J Immunol* **164**, 3902-3912 (2000).
116. Cao,X., Zhang,W., Wang,J., Zhang,M., Huang,X., Hamada,H., & Chen,W. Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology* **97**, 616-625 (1999).
117. Trefzer,U. & Walden,P. Hybrid-cell vaccines for cancer immune therapy. *Mol Biotechnol* **25**, 63-69 (2003).
118. Stuhler,G. & Walden,P. Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* **39**, 342-345 (1994).
120. Gong,J., Chen,D., Kashiwaba,M., & Kufe,D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* **3**, 558-561 (1997).
121. Tanaka,H., Shimizu,K., Hayashi,T., & Shu,S. Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells. *Cell Immunol* **220**, 1-12 (2002).
122. Haenssle,H.A., Krause,S.W., Emmert,S., Zutt,M., Kretschmer,L., Schmidberger,H., Andreesen,R., & Soruri,A. Hybrid cell vaccination in metastatic melanoma: clinical and immunologic results of a phase I/II study. *J Immunother* **27**, 147-155 (2004).
123. Trefzer,U., Weingart,G., Chen,Y., Herberth,G., Adrian,K., Winter,H., Audring,H., Guo,Y., Sterry,W., & Walden,P. Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. *Int J Cancer* **85**, 618-626 (2000).

124. Trefzer,U., Herberth,G., Sterry,W., & Walden,P. The hybrid cell vaccination approach to cancer immunotherapy. *Ernst Schering Res Found Workshop* 154-166 (2000).
125. Kern,F., Sural,I.P., Brock,C., Freistedt,B., Radtke,H., Scheffold,A., Blasczyk,R., Reinke,P., Schneider,M., Radbruch,A., Walden,P., & Volk,H.D. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* **4**, 975-978 (1998).
126. Nestle,F.O., Alijagic,S., Gilliet,M., Sun,Y., Grabbe,S., Dummer,R., Burg,G., & Schadendorf,D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**, 328-332 (1998).
127. Marchand,M., van Baren,N., Weynants,P., Brichard,V., Dreno,B., Tessier,M.H., Rankin,E., Parmiani,G., Arienti,F., Humblet,Y., Bourlond,A., Vanwijck,R., Lienard,D., Beauduin,M., Dietrich,P.Y., Russo,V., Kerger,J., Masucci,G., Jager,E., De Greve,J., Atzpodien,J., Brasseur,F., Coulie,P.G., van der Bruggen,P., & Boon,T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* **80**, 219-230 (1999).
128. Thurner,B., Haendle,I., Roder,C., Dieckmann,D., Keikavoussi,P., Jonuleit,H., Bender,A., Maczek,C., Schreiner,D., den Driesch,P., Brocker,E.B., Steinman,R.M., Enk,A., Kampgen,E., & Schuler,G. Vaccination with Mage-3A1 Peptide-pulsed Mature, Monocyte-derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *J. Exp. Med.* **190**, 1669-1678 (1999).
129. Panelli,M.C., Riker,A., Kammula,U., Wang,E., Lee,K.H., Rosenberg,S.A., & Marincola,F.M. Expansion of Tumor-T Cell Pairs from Fine Needle Aspirates of Melanoma Metastases. *J Immunol* **164**, 495-504 (2000).
130. Jager,E., Hohn,H., Necker,A., Forster,R., Karbach,J., Freitag,K., Neukirch,C., Castelli,C., Salter,R.D., Knuth,A., & Maeurer,M.J. Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1. *Int J Cancer* **98**, 376-388 (2002).
131. Jager,E., Jager,D., & Knuth,A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* **14**, 178-182 (2002).
133. Krause,S.W., Neumann,C., Soruri,A., Mayer,S., Peters,J.H., & Andreesen,R. The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J Immunother* **25**, 421-428 (2002).
134. Steinman,R.M. & Dhodapkar,M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* **94**, 459-473 (2001).

135. Nielsen,M.B. & Marincola,F.M. Melanoma vaccines: the paradox of T cell activation without clinical response. *Cancer Chemother. Pharmacol* **46 Suppl**, S62-S66 (2000).
136. Rivoltini,L., Carrabba,M., Huber,V., Castelli,C., Novellino,L., Dalerba,P., Mortarini,R., Arancia,G., Anichini,A., Fais,S., & Parmiani,G. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunological Reviews* **188**, 97-113 (2002).
137. Anichini,A., Vegetti,C., & Mortarini,R. The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* (2004).
138. Boczkowski,D., Nair,S.K., Nam,J.H., Lysterly,H.K., & Gilboa,E. Induction of Tumor Immunity and Cytotoxic T Lymphocyte Responses Using Dendritic Cells Transfected with Messenger RNA Amplified from Tumor Cells. *Cancer Res* **60**, 1028-1034 (2000).
139. Nair,S.K., Morse,M., Boczkowski,D., Cumming,R.I., Vasovic,L., Gilboa,E., & Lysterly,H.K. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg* **235**, 540-549 (2002).
140. Michael B. Atkins, David e. Elder, Richard Essner, Keith T. Flaherty, Thomas F. Gajewski, Frank G. Haluska. Innovations and Challenges in Melanoma: summary Statement from the first Cambridge Conference. *Clin Cancer Res* **12**(7 Suppl)(2006)
- 141: Raikumar Savai, Ralph Theo Schermuly, Soni Savai Pullamesetti, Michael Schneider, Susanne Greschus, Hossein Ardeschir Ghofrani, Horst Traupe, Friedrich Grimminger, Gamal-Andre Banat. A Combination Hybrid Based Vaccination/Adoptive Cellular Therapy to prevent Tumor Growth by Involvement of T-Cells. *Cancer Res* 2007; **67**(11):5444-54
- 142: Trefzer, Uwe; Herberth, Gunda; Wohlan, Karolina; Milling, Annett; Thiemann, Max; Turmenjargal, Sharav; Sparbier, Kathrin; Sterry, Wolfram; Walden, Peter. Tumor-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* **23**(2005)2367-2373
- 143: Stuhler, G. and P. Walden, Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 1994. **39**(5): p. 342-5.
- 144: Lee, PP, Yee, C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999; 5:677-85

- 145: Kirkwood, J., Tarhini, A., Panelli, M., Gogas, H. et al, Next Generation of Immunotherapy for Melanoma. *J.ClinOncol.*, July 2008;26:3445-3455
- 146: Nesselhut, J, Marx, D, Chan, R, et al, Immunotherapy with dendritic cells primed with allogenic melanoma cell line in advanced metastatic melanoma. *J.ClinOncol.*, ASCO Meeting, Vol26, No15s, May 2008

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Karolina Anna Wohlan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Frequenzanalyse von tumorspezifischen T-Zellen nach Hybridzellvakzinierung bei Melanompatienten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Karolina Anna Wohlan

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Ich danke meinen Eltern Krystyna und Hubert Wohlman für ihre großartige Unterstützung.