

Aus dem Charité Centrum 14 - Tumormedizin
Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Eckhard Thiel

Habilitationsschrift

Entwicklung therapeutischer Peptid-Vakzinierung zur Behandlung
von Patienten mit hämatopoetischen und soliden Neoplasien

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Anne Letsch
geboren am 11.11.1974 in Bünde

Eingereicht im Januar 2011

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am 24.10.2011

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Mathias Freund

Für meine Eltern

Für Mini und Maxi

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	5
1 EINLEITUNG	
1.1 Krebs und Immunsystem	7
1.2 Tumorantigene	9
1.3 Spontane T-Zellimmunität gegen Tumorantigene	13
1.4 Knochenmark als wichtiges sekundäres Immunorgan	18
1.5 Tumorstimmulierung	20
1.6 T-Zell-Monitoring	30
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	34
3 EIGENE ARBEITEN	
3.1 Spontane tumorspezifische T-Zellimmunität	36
3.1.1 Hohe Frequenzen zirkulierender melanomreaktiver T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom.	37
3.1.2 Das Knochenmark enthält melanomreaktive CD8+ Effektor-T-Zellen und verglichen mit dem peripheren Blut eine vermehrte Anzahl melanomreaktiver CD8+ Memory-T-Zellen.	44
3.1.3 CD8+ T-Zell-Antwort gegen Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 (WT1) und Proteinase-3 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.	50
3.2 Klinische und immunologische Ergebnisse mit Tumorstimmulierungen in klinischen Studien	57
3.2.1 Peptid-Vakzinierung nach wiederholter Resektion von Metastasen kann ein verlängertes rezidivfreies Intervall bei Melanompatienten induzieren.	58
3.2.2 Spezifische zentrale Memory-T-Zellen im Knochenmark von Patienten nach Tyrosinasepeptid-Vakzinierung.	65
3.2.3 Klinisches und immunologisches Ansprechen im Rahmen einer Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 (WT1)-Peptid-Vakzinierung mit GM-CSF und T-Helfer-Protein bei Patienten mit AML und MDS.	73
3.2.4 Die Induktion einer kompletten Remission bei einer Patientin mit AML im Rahmen einer WT1-Peptid-Vakzinierung war begleitet vom Auftreten eines prädominanten T-Zell-Klons im peripheren Blut und Knochenmark.	82

4	DISKUSSION	
4.1	Spontane tumorspezifische T-Zell-Immunität	91
4.2	Spontane und durch Vakzinierung induzierte T-Zellen im Knochenmark	98
4.3	Immunologische Effekte von Peptid-Vakzinierungen	101
4.4	Klinische Effekte von Peptid-Vakzinierungen	111
4.5	Toxizität	116
4.6	Optimierungsansätze und Ausblick	119
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	126
7	DANKSAGUNG	146
8	ERKLÄRUNG	147

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (engl: aquired immunodeficiency syndrome)
AFP	Alpha-Fetoprotein
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl: antigen presenting cell)
Bcr-abl	Philadelphia-Chromosom, Fusionsgen bei der CML
BCG	Mykobakterium Bacille Calmette Guerin
CCR	Chemokin-Rezeptor
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD	Differenzierungscluster (engl: cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl: complementary DNA)
CDK4	Cyklin-abhängige Kinase-4 (engl: cyclin-dependent kinase 4)
CIC	Cancer Immunotherapy Consortium
CIMT	Assoziation für Krebsimmuntherapie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin.
CR	Komplette Remission (engl. complete remission)
CRI	Cancer Research Institute
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl: cytotoxic T cell)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated-molecule-4
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: Desoxyribonucleic acid)
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ELISPOT	Enzyme-linked-Immunospot
FDA	Food-and-Drug-Administration, USA
FLT-3-ITD	Fms-like tyrosine kinase 3 - interne Tandemduplikation
FOXP3+	Forkhead-box-Protein P3
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colonie-stimulierender-Faktor
Gp-100	Differenzierungsantigen
GvL	Spender-gegen-Leukämie-Effekt (engl: Graft versus Leukemia effect)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
Her2/neu	Human epidermal growth factor Receptor 2
HERV	Humanes-endogenes-Retrovirus-Antigen
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
ICC	Intrazelluläre Zytokinfärbung (engl: intracellular cytokin staining)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
iSBTc	International Society for Biological Therapy of Cancer
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LAA	Leukämieassoziierte Antigene
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
MART-1	Melanoma Antigen recognized by T cells
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
Melan-A	Melanocyte antigen A
MHC	Major histocompatibility complex
MIATA	Minimal information about T-cell assays
MNC	Mononukleäre Zellen (engl: mononuclear cells)
mRNA	Mitochondrale Ribonukleinsäure (engl: Ribonucleic acid)
NCI	National Cancer Institute, USA
NIH	National Institute of Health, USA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NY-ESO-1	Cancer-Testis Tumorantigen
PAP	Prostatic-acid-phosphatase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl: Polymerase chain reaction)
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl: progression free survival)
PR	Partielle Remission
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RDA	Repräsentative Differenzanalyse
RECIST	Response-Evaluation-Criteria-In-Solid-Tumors
RHAMM	Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität
SD	Stabile Erkrankung (engl. stable disease)
SEREX	Serological screening of cDNA expression libraries
SITC	Society for Immunotherapy of Cancer (zuvor iSBTc)
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
Tcm	Zentrale Memory T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl: T cell receptor)
Tem	Effektor-Memory T-Zellen
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
V β	Variable Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptors
WT1	Wilms Tumor Protein-1

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs und Immunsystem

Die Möglichkeit der kompletten Zerstörung eines sich entwickelnden Tumors durch das Immunsystem wurde erstmals um 1900 von Paul Ehrlich postuliert [1]. Später wurde diese Hypothese von Burnet, Thomas und Medawar als Konzept der Tumormunnsurveillance, also der immunologischen Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem etabliert [2, 3]. Sie postulierten, dass das Immunsystem in der Lage ist verändertes „Selbst“ zu erkennen, z.B. in Form von Tumorzellen, die durch genetische Aberrationen ausreichend verändert wurden. Spontan entstehende Tumoren werden hiernach direkt und permanent durch das Immunsystem bekämpft, und eine dennoch auftretende Tumorentstehung wäre als Folge von Schwächen oder Störungen des Immunsystems zu interpretieren. Einige Tumormausmodelle [4-6], sowie die im Folgenden dargestellten klinischen Beobachtungen untermauern dieses Konzept:

Bei Krebspatienten finden sich diverse Hinweise auf eine Interaktion zwischen Immunsystem und Tumoren. Spontane tumorspezifische Immunität kann bei zahlreichen Patienten nachgewiesen werden [7]. Das Risiko der Entwicklung bestimmter Tumoren ist bei Patienten mit Immunschwäche, wie AIDS oder bei Empfängern von Organtransplantaten unter Immunsuppression signifikant erhöht [8-10]. Eine Studie bei 3625 gesunden Japanern über einen Beobachtungszeitraum von 11 Jahren konnte zeigen, dass diejenigen ein niedrigeres Krebsrisiko aufwiesen, die zu Beginn der Studie hohe oder mittlere zytotoxische Aktivität der peripheren Lymphozyten aufwiesen, im Gegensatz zu den Personen mit geringer zytotoxischer Aktivität und höherem Krebsrisiko [11]. Einige weitere Studien konnten zeigen, dass der Nachweis tumorinfiltrierender T-Zellen mit verbessertem klinischen Verlauf u.a. bei Patienten mit Melanomen [12], Kolorektal- [13, 14], Nierenzell- [15], Mamma- [16], Ösophagus- [17] und insbesondere auch Ovarialkarzinomen [18] assoziiert ist, wenngleich hier auch widersprüchliche Daten vorliegen. Auf der anderen Seite hatten Ovarialkarzinom-Patientinnen, deren Tumoren mit

CD4+, CD25+, Forkhead-box-Protein P3 (FoxP3)+ regulatorischen T-Zellen (Treg) infiltriert waren ein schlechteres Überleben als Patientinnen ohne den Nachweis von intratumoralen regulatorischen T-Zellen [19]. Auch die Fälle von zwei nierentransplantierten Patienten, die Nieren eines an einem Apoplex Verstorbenen erhalten hatten, der 16 Jahre zuvor an einem Frühstadium eines malignen Melanoms erkrankt war, und die beide dann unter Immunsuppression ein malignes Melanom entwickelten, untermauern die Relevanz des Immunsurveillance-Konzept in speziellen Situationen [20].

Daneben gibt es das Konzept der Immunstimulation, welches ebenfalls schon vor 150 Jahren von Virchow beschrieben wurde. Zahlreiche experimentelle Tumormodelle unterstützen dieses Konzept und legen nahe, dass tumorinduzierte Entzündungsprozesse bzw. Immunreaktionen Tumorwachstum unterhalten und stimulieren können [21-23]. Dieses Konzept stellt aber keinen Kontrast zur Tumormunsurveillance dar, sondern beide Konzepte symbolisieren die unterschiedlichen Ausprägungen der vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten zwischen Immunsystem und Tumor [24, 25].

Daraus resultiert auch die Prägung des Begriffes „Tumor-Editing“, der die Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen charakterisiert und nach heutigen Erkenntnissen drei Phasen, die „drei Es“, beinhaltet [4, 26]: Der Prozess beginnt mit einer frühen Eliminationsphase, in der nach dem Konzept der Tumorsurveillance Tumorzellen durch das Immunsystem eliminiert werden. Darauf folgt eine Equilibriumphase, in der das Immunsystem Tumorvarianten selektioniert, die eine Immunattacke überleben könnten. Und schließlich gibt es eine dritte Escapephase, in der Tumorzellen vorherrschen, die entweder durch veränderten Genotyp, verändertes Antigenprofil, bzw. durch das Auftreten von immunregulatorischen Phänomenen der Kontrolle des Immunsystems entgehen können, oder deren Wachstum durch Immunstimulation noch gefördert wird. Diese Phasen können individuell bei verschiedenen Tumorpatienten und Tumorarten stark variieren, sie können parallel an verschiedenen Tumorlokalisationen auftreten und nicht alle Phasen finden zwangsläufig bei der Interaktion von Immunsystem und

Tumorzellen statt. Entscheidend dafür ob Immunzellen Tumorzellen attackieren, ihre Gegenwart ignorieren oder ihre Entwicklung und ihr Überleben sogar fördern, ist sicher auch das komplexe System des Tumormikroenvironments und dessen Einfluss auf Immunzellen [27, 28].

Die detaillierte Analyse der komplexen Interaktionen von Immunsystem und Tumoren und die Ausnutzung der vorhandenen Mechanismen des Immunsystems bieten vielversprechende Ansatzpunkte für eine Reihe von Strategien zur immunologischen Therapie von Krebserkrankungen. Dabei ist es entscheidend zu berücksichtigen, dass es neben generellen Phänomenen auch vielfältige individuelle Spezifika gibt, die nur für einzelne Tumoren oder v.a. auch nur für einzelne Patienten gelten und die im Vorfeld von immuntherapeutischen Ansätzen idealerweise sorgfältig analysiert werden müssten.

1.2 Tumorantigene

Die Identifizierung von Tumorantigenen hat das Feld der Tumorimmunologie entscheidend nach vorne gebracht und zahlreiche therapeutische Optionen eröffnet. Tumorantigene sind Antigene, die von Krebszellen produziert werden und in der Lage sind, im betroffenen Organismus eine Immunantwort auszulösen. Diese Eigenschaft macht die Tumorantigene zu wichtigen Zielstrukturen in der Krebsimmuntherapie und einige spielen als Tumormarker in der Diagnostik eine Rolle [29]. Die meisten Tumorantigene sind keine tumorspezifischen Strukturen, sondern ihre Expression entsteht im Prozess der malignen Transformation. Dieser kann mit der Expression von Proteinen einhergehen, die in normalen Zellen gar nicht oder in viel geringeren Konzentrationen vorhanden sind und daher beim Immunsystem nicht zu immunologischer Toleranz führen. Diese Antigene werden daher auch als tumorassoziierte Antigene (TAA) bezeichnet [30].

Tumorantigene werden in den meisten Fällen über MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II-Moleküle als Peptide auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und stellen Zielstrukturen für zytotoxische T-Zellen (CTL) [31], aber auch für

T-Helfer-Zellen [32] und Antikörper [33, 34] dar. Die Identifizierung der ersten Tumorantigene gelang 1992 der Arbeitsgruppe um Boon mit Hilfe von CTL-Klonen und mittels cDNA-transfizierten COS-Zellen [35, 36]. Inzwischen wird die Antigencharakterisierung durch neue Methoden kontinuierlich vorangetrieben. Dazu zählen die Weiterentwicklung von cDNA-Expressionssystemen durch den Einsatz von Retroviren und autologen Fibroblasten [32], die SEREX-Technik (=serological screening of cDNA expression library) [37] sowie biochemische Ansätze mittels Peptid-Elution und anschließender Massenspektrometrie [38]. Vor allem die als „Reverse Immunology“ bezeichnete Technik brachte etliche neue Tumorantigene hervor: Ausgehend von einer bekannten Protein-Sequenz eines Tumorantigens, jedoch ohne präexistente T-Zellen, erfolgt eine Epitopvorhersage. Inzwischen existieren verschiedene Vorhersageprogramme, die eine Epitopvorhersage für ein breites Spektrum an MHC-Klasse-I- und -II-restringierten Epitopen verschiedener Organismen erlauben. Die meist genutzten sind BIMAS und SYFPEITHI (Zusammenfassung in [30]). Ergänzend gibt es Programme, die eine Vorhersage der proteasomalen Spaltungsstellen erlauben [36, 39]. Die Kandidaten-Peptidsequenzen für einen bestimmten HLA-Typ werden dann synthetisiert und Peptide, die erfolgreich an HLA-Moleküle binden, werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) präsentiert und auf die Induktion einer zytolytischen Reaktion bei CTL getestet [36, 40]. Diese Strategie wird auch bei der Herstellung einer cDNA-library mittels einer repräsentativen Differenzanalyse (RDA) angewandt [41, 42]. Zusätzlich führten vergleichende Proteomanalysen und Genexpressionsanalysen zur Identifizierung neuer Tumorantigene [30].

Die ersten Tumorantigene wurden beim Melanom identifiziert [43]. Kurz darauf folgte aber die Identifizierung von Tumorantigenen für zahlreiche andere Tumorentitäten. Aufgrund der genetischen Instabilität von neoplastischen Zellen ist eine große Heterogenität bei der Expression von HLA-Molekülen und Tumorantigenen möglich [31]. Jeder einzelne Tumor ist aufgrund der chromosomalen Veränderungen während der Tumorentstehung gleichzeitig einzigartig und heterogen. Um einen optimalen therapeutischen

Einsatz von Tumorantigenen zu gewährleisten, sollten die individuellen Unterschiede zwischen Patienten und Tumorentitäten sorgfältig analysiert werden [30]. Trotz dieser individuellen Unterschiede ist es jedoch möglich auch generelle Aussagen über Tumorantigene zu treffen. Man unterscheidet im Wesentlichen fünf verschiedene Gruppen von Tumorantigenen [30] [Academy of Cancer Immunology www.cancerimmunity.org/peptidedatabase].

Die erste Gruppe beinhaltet die sogenannten Aktivierungsantigene. Diese werden von Genen codiert, die in den meisten normalen Geweben des Erwachsenen ruhen. Eine Ausnahme bilden die MHC-Klasse-I-negativen Zellen des Testis [38, 40]. Zu dieser Gruppe gehören die Cancer/Testis-Antigene wie z.B. MAGE, BAGE, GAGE/PAGE/XAGE, RAGE, NY-ESO-1/LAGE-1, SSX, SPANX, TRAG-3, SCP-1, OY-TES-1 und CT10 [44-50]. Einige Autoren zählen außerdem die Muzine zu dieser Gruppe, die man vor allem als Oberflächenproteine auf Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen findet [46]. Auf normalen Zellen sind Muzine stark glykolisiert und werden deshalb nicht von T-Zellen erkannt. Bemerkenswert ist, dass bei Muzinen die T-Zell-Erkennung auf Tumorzellen ohne HLA-Restriktion stattfindet [51].

Eine zweite Gruppe bilden die gewebespezifischen Differenzierungsantigene, die z.B. beim Melanom von Genen wie Tyrosinase, Melan-A/Mart-1, und gp100 codiert und auf Melanomen und in normalen Melanozyten exprimiert werden [52]. Außerdem zählen Antigene wie das u.a. bei kolorektalen Tumoren auftretende Karzinoembryonale Antigen (CEA), das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostata-Karzinom oder alpha-Fetoprotein (AFP) bei Leberkarzinomen [53] zu dieser Gruppe.

Daneben existiert eine dritte Gruppe von Überexpressionsantigenen, die häufig in einer Vielzahl gesunder Gewebe exprimiert, aber ausschließlich in Tumorzellen überexprimiert wird. Hier sind Her-2/neu [54], p53 oder PRAME als Beispiele zu nennen. Zu dieser Gruppe gehören auch Tumorantigene in Form von Transkriptionsfaktoren wie das Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1) [55].

Transkriptionsfaktoren mit funktioneller Relevanz für die Tumorprogression stellen besonders interessante Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze dar. Ein Großteil von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kodiert für Transkriptionsfaktoren und deregulierte Expression oder Aktivierung sowie Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren spielen eine kritische Rolle für die Tumorgenese und Progression.

Die vierte Gruppe bilden die viralen Antigene, zu denen als bekannteste das Humane-Papilloma-Virus (HPV)-16 bei Zervixkarzinomen [56] und das Epstein-Barr-Virus (EBV) beim endemischen Burkitt-Lymphom [57] zählen. Bei Leukämiepatienten wurde das Humane-endogene-Retrovirus-Antigen (HERV-K10) identifiziert [58]. Zudem sind das Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) von großer Relevanz für die Entstehung von Leberzellkarzinomen [59].

Viele tumorspezifische Antigene entstehen durch molekulare Veränderungen ubiquitär exprimierter Gene. Sie stellen die fünfte Gruppe der Mutations-Antigene dar und sind im Gegensatz zu den vorher genannten in der Regel individualspezifisch und können nur schwer als immuntherapeutische Zielstrukturen für verschiedene Patienten genutzt werden. Allerdings hat man gleiche Mutationen innerhalb einiger Antigene dieser Gruppe bereits bei verschiedenen Individuen gefunden, wie z.B. CDK4, MUM-1, β -Catenin, bcr-abl [40], p53 [60], ras-Onkogen [61] oder KIAA 0205 [62]. Die molekularen Veränderungen treten häufig als Punktmutationen auf, so dass durch veränderte Aminosäuresequenz aus einem zuvor immuntoleranten Protein neue antigene Epitope generiert werden können [63]. Daneben finden sich Translokationen wie z.B. das bcr/abl-Gen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) [64, 65], die zu neuen hoch immunogenen Fusionsproteinen führen können. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Splice-Varianten, neue offene Leserahmen, Pseudogene oder auch Antisense-Strangprodukte der DNA Zielstrukturen für das Immunsystem darstellen können [66, 67].

Die Anzahl der identifizierten Antigene für myeloische Erkrankungen wie chronisch myeloische Leukämie (CML), akute myeloische Leukämie (AML) und myelodysplastische Syndrome (MDS) ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen [68]. Gegen die meisten der leukämieassoziierten Antigene (LAA) wie BAGE, bcr-abl, OFA-iLRP, FLT3-ITD, G250, hTERT, PRAME, SPAG9, Proteinase-3, RHAMM und WT1 konnten spontane CD8 positive T-Zellen nachgewiesen werden. Die Antigene wurden inzwischen genauer charakterisiert und interessanterweise sind die meisten mit Zellzyklus-Funktionen und Proliferation assoziiert [69]. In der vorliegenden Arbeit lag ein wesentlicher Schwerpunkt auf der Vakzinierungsentwicklung mit WT1. WT1 ist bei Leukämien, dem MDS, sowie einer Vielzahl solider Tumoren hoch exprimiert, hat onkogene Funktion und spielt eine wichtige Rolle für die Proliferation von Leukämie- und Tumorzellen [55, 70]). Bei der AML ist WT1 gut geeignet, um frühes Therapieansprechen zu messen [71]. In bestimmten Situationen, wie nach allogener Transplantation, eignet es sich auch als Marker für die minimale Resterkrankung [72]. Beim MDS ist WT1 stadienabhängig hochreguliert und stellt einen verlässlichen molekularen Marker zur Verlaufsbeurteilung des MDS dar [73]. Aufgrund dieser funktionellen Relevanz scheint WT1 weit weniger anfällig für die durch immunologischen Selektionsdruck vermittelten Tumor-Escape-Varianten, die bei anderen Tumorantigenen spontan oder während der Durchführung von Vakzinierungsstudien beobachtet wurden. In einem vom National Cancer Institute (NCI) kürzlich initiierten Priorisierungsprozess erhielt WT1 unter Berücksichtigung potentiell wichtiger Eigenschaften eines „idealen“ Tumorantigens, den höchsten Punktwert unter allen einbezogenen Tumorantigenen [74].

1.3 Spontane T-Zellimmunität gegen Tumorantigene

Lange Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob Tumoren spontane Immunität bei Patienten auslösen können. Im Zuge der Etablierung sensitiver T-Zell-Assays konnten spontane T-Zellen gegen Tumorzellen oder isolierte Tumorantigene regelmäßig im peripheren Blut von Tumorpatienten nachgewiesen werden [7]. Die Mechanismen, die zur Induktion einer spontanen T-Zell-Immunität führen

sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. Zunächst konnten bei zahlreichen Tumorentitäten tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) aus dem Tumorgewebe isoliert und *in vitro* unter Zugabe von IL-2 expandiert werden [75]. Ein Großteil dieser vornehmlich CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen besitzt *in vitro* lytische Fähigkeiten gegenüber autologen und zum Teil auch gegenüber HLA-gematchten allogenen Tumorzellen. Diese Tumorzelllyse konnte durch MHC-Klasse-I-Antikörper ebenso wie durch Antikörper gegen T-Zell-Rezeptoren (TCR) blockiert werden, was für eine über MHC-Klasse-I vermittelte spezifische Erkennung der Tumorzellen spricht [76]. Neben ihrer zytotoxischen Funktion sind TILs in der Lage, nach Tumorerkennung eine Reihe von Zytokinen wie GM-CSF, IFN γ und TNF α freizusetzen [77]. Die ersten Analysen tumorantigenspezifischer T-Zellen gelangen in einigen tumorinfiltrierten Lymphknoten sowie im peripheren Blut von Melanompatienten [78-80].

Erst durch die Etablierung sensitiverer T-Zell-Assays konnten spontane tumorspezifische T-Zellen auch direkt *ex vivo*, ohne vorherige *in vitro* Stimulation im peripheren Blut und Knochenmark von Tumorpatienten verschiedener Entitäten, u.a. bei Melanomen [81, 82] Kolorektal- [83], Bronchial- [84] und Mammakarzinomen [85] sowie bei Neuroblastomen [86] und Leukämiepatienten [3.1.3] nachgewiesen werden. Einzelne Daten suggerierten einen besseren klinischen Verlauf bei Patienten mit tumorantigenspezifischer T-Zell-Antwort [84, 87], andere Studien konnten keinen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne spontane tumorantigenspezifischer T-Zell-Antwort identifizieren [88]. Eine Korrelation wird aber möglicherweise auch dadurch zunichte gemacht, dass spontane tumorspezifische T-Zellen v.a. bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien nachgewiesen werden konnten [7, 89]. Erklärungen für diese Tatsache könnten zum einen sein, dass für die Generierung einer tumorspezifischen T-Zellantwort das Auswandern von Tumorzellen, insbesondere die Migration in Lymphknoten, unabdingbar ist. Zum anderen ist denkbar, dass bei Patienten mit lokal begrenzten Tumoren zunächst nur lokal tumorspezifische T-Zellen den Tumor kontrollieren und diese erst dann in der

Peripherie nachweisbar sind, wenn Tumoren metastasieren und aufgrund von potentiellen Tumor-Escape-Mechanismen keine T-Zell-Migration zum Tumor mehr induzieren.

Diese unterschiedlichen Daten resultieren möglicherweise auch aus der individuellen Heterogenität der tumorantigenspezifischen T-Zellen mit sehr variablen Frequenzen, Phänotypen und funktionellen Charakteristika. Beim Melanom konnten beispielsweise bei einer Patientin im Stadium IV spontane tyrosinasespezifische T-Zellen mit einem Anteil von >5% der CD3+, CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden, die alle Charakteristika zytotoxischer T-Zellen aufwiesen und direkt *ex vivo* Tyrosinase-exprimierende Tumorzellen lysierten [87]. In anderen Analysen zeigten spontane tyrosinasespezifische T-Zellen dagegen eine tumorantigenspezifische funktionelle Anergie und konnten Tyrosinase-positive Melanomzellen nicht lysieren, obwohl sie zahlreiche Charakteristika von Effektor-T-Zellen aufwiesen [82]. Inzwischen konnten spontane T-Zellen gegen verschiedene HLA-spezifische Epitope immunogener Tumorantigene in ganz unterschiedlichen Frequenzen nachgewiesen und charakterisiert werden. Hohe Frequenzen spontaner T-Zellen fanden sich gegen Melan-A/MART-1 aber unter anderem auch gegen NY-ESO-1 [90, 91], gegen LAGE-1 [92] und gegen MAGE-C2 [93]. Weniger häufig dagegen waren spontane antigenspezifische T-Zellen gegen Tyrosinase und gp100 [82]. Gegen NY-ESO-1 konnte neben den T-Zellen auch eine spontane humorale Immunantwort bei Melanompatienten nachgewiesen werden [91]. Grundsätzlich kann man sagen, dass ein Großteil der Melanompatienten spontane T-Zellen gegen ihren Tumor entwickeln, irgendwann kommt es im Krankheitsverlauf aber scheinbar bei fast allen Patienten zu einem Punkt, an dem diese spontanen T-Zellen ineffektiv werden und der Tumor möglicherweise durch lokale immunsuppressive Mechanismen der Immunkontrolle entgehen kann [94]. Effektive immuntherapeutische Strategien müssen diese Gegebenheiten berücksichtigen und sich die detaillierteren Erkenntnisse der Interaktionen zwischen Immunsystem und Tumoren zu Nutze machen, um eine effektive

tumorspezifische Immunantwort zu induzieren und Resistenzmechanismen auszuschalten.

Nach Identifizierung der ersten leukämieassoziierten Antigene erfolgten verschiedene Analysen spontaner T-Zellen auch bei Leukämiepatienten. Der Nachweis von WT1-spezifischen Antikörpern bei 15-25% der AML-Patienten deutete bereits auf eine gute Immunogenität von WT1 hin und legte nahe, dass auch WT1-spezifische CD4+ T-Zellen bei Leukämiepatienten zu finden sein sollten [95, 96]. Dies veranlasste uns zu einer systematischen Analyse von WT1- und Proteinase-3-spezifischen T-Zellen bei AML-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Wie unter 3.1.3 näher beschrieben, konnten wir bei einem signifikanten Anteil der Patienten zytokinproduzierende antigenspezifische T-Zellen gegen HLA-A2-bindende Epitope von WT1 und Proteinase-3 zeigen, wohingegen keine spezifischen zytokinproduzierenden T-Zellen bei Gesunden nachweisbar waren [3.1.3]. Andere Arbeitsgruppen konnten bei AML-Patienten spontane leukämieantigenspezifische T-Zellen auch gegen RHAMM und PRAME in hohen Frequenzen nachweisen, während diese nur sehr selten bei gesunden Individuen detektierbar waren [97-99].

Bei Gesunden finden sich nur in einem geringen Prozentsatz spontane T-Zellen gegen Tumorantigene. Eine Ausnahme stellt das melanomassoziierte Antigen Melan-A/MART-1 dar, gegen das zwischen 8 und 60% der Gesunden eine spontane T-Zell-Immunität zeigen [81, 100, 101]. Bei Melanompatienten variieren die Frequenzen Melan-A/MART-1 spezifischer T-Zellen zwischen 10 und 70% und in den meisten Studien konnten höhere Frequenzen bei Melanompatienten nachgewiesen werden als bei Gesunden. Bei Gesunden zeigten 95% der spezifischen T-Zellen einen naiven Phänotyp, während bei Melanompatienten neben naiven Zellen auch ein Drittel der spezifischen T-Zellen einen Effektor-Memory-Phänotyp besaßen [81, 102]. Der Grund für die hohe spontane Immunität gegen Melan-A/MART-1 könnte in der übermäßigen thymischen Expression potentiell kreuzreaktiver Sequenzen liegen [103]. Gegen andere melanomassoziierte Antigene liegen unterschiedliche Daten

vor. Von einigen Autoren konnten spezifische T-Zellen bei einem geringen Prozentsatz der analysierten gesunden Probanden nachgewiesen werden, so zeigten z.B. gegen Tyrosinase und gp100 4 und 3 von 12 Gesunden niedrige Frequenzen spezifischer T-Zellen [101]. Ähnlich niedrige Frequenzen spontaner T-Zellen wurden bei Gesunden gegen leukämieassoziierte Antigene detektiert [3.1.3]. Dennoch konnten etliche Studien der letzten Jahre zeigen, dass tumorantigenspezifische T-Zellen sich aus dem peripheren Blut von Gesunden nach *in vitro* Stimulation expandieren lassen [104, 105] und unter bestimmten Umständen, z.B. im Kontext allogener Stammzelltransplantationen, für therapeutische Zwecke genutzt werden können. Inwieweit es sich hier um eine *de novo* Induktion tumorantigenspezifischer T-Zellen handelt, oder um eine Anreicherung von bereits in geringen Frequenzen vorhandenen spontanen T-Zellen kann bisher nicht vollständig geklärt werden.

Trotz der Vielzahl der in der Vergangenheit identifizierten Tumorantigene repräsentiert die T-Zellimmunität gegen Tumorantigene wahrscheinlich aber nur einen kleinen Teil der gesamten tumorspezifischen Immunität. Zur umfassenden Charakterisierung sind neben der Analyse tumorantigenspezifischer T-Zellen ergänzende Analysen mittels Stimulation durch den autologen Tumor sinnvoll, insbesondere wenn nur wenige Tumorantigene für den jeweiligen Tumor bekannt sind. In vielen Fällen liegen jedoch keine autologen Tumorzellen für *in vitro* Analysen vor. Um dennoch die T-Zell-Antwort gegen ein breites Spektrum von Antigenen zu analysieren haben wir, wie unter 3.1.1 näher beschrieben, untersucht, inwieweit sich auch allogene HLA-gematchte Tumorzelllinien als Zielzellen für funktionelle *ex vivo* Assays eignen. Zum damaligen Zeitpunkt wurde diese Methode zur T-Zell-Charakterisierung unabhängig von definierten Tumorantigenen zunächst im ELISPOT für Melanompatienten etabliert. Inzwischen wird dieser Ansatz auch in durchflußzytometrischen Analysen und für diverse andere Tumorentitäten und Leukämien zum Routinemonitoring spontaner und durch Vakzinierung induzierter T-Zell-Immunität genutzt.

1.4 Knochenmark als wichtiges sekundäres Immunorgan

Ähnlich wie die T-Zell-Antwort gegen definierte Tumorantigene nicht die gesamte T-Zellimmunität gegen Tumoren ausmachen, sind die Analysen spontaner und durch Vakzinierung induzierter T-Zellen im peripheren Blut möglicherweise nicht repräsentativ für das gesamte Spektrum der T-Zell-Immunität in anderen Kompartimenten des Organismus. Zahlreiche Arbeiten konnten sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede zwischen der tumorspezifischen Immunantwort im peripheren Blut und anderen Kompartimenten, wie dem Tumor [106, 107], Lymphknoten [108] oder dem Knochenmark zeigen [3.1.2, 3.2.2] [85, 109]. Wir haben uns in den letzten Jahren intensiv mit den Spezifika der tumorspezifischen Immunität in unterschiedlichen Kompartimenten, insbesondere im Knochenmark beschäftigt und konnten gemeinsam mit anderen Arbeitsgruppen Phänomene aufdecken, die das KM als sekundäres lymphatisches Organ charakterisieren und es sehr interessant für die Analyse sowie die Generierung von tumorspezifischen Immunzellen erscheinen lassen [3.1.2, 3.2.2]. Detaillierte Analysen der Induktion von tumorspezifischen T-Zellen der Arbeitsgruppe um Schirmacher konnten zeigen, dass zirkulierende naive T-Zellen Tumorantigene nicht direkt erkennen, sondern eine Interaktion mit tumorantigenpräsentierenden dendritischen Zellen notwendig ist. Tumorantigene von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut gelangen demnach ins Knochenmark und in die Milz und werden dort von ortständigen dendritischen Zellen prozessiert und präsentiert. Dies kann zur Stimulation von T-Zellen und zur Generierung von Effektor- und Memory-T-Zellen führen, die entweder Tumorzellen zerstören oder sie in einem ruhenden Zustand kontrollieren können [110, 111].

Bei vielen Krebspatienten im fortgeschrittenen Stadium lassen sich geringe Frequenzen an Tumorzellen bzw. Mikrometastasen im Knochenmark nachweisen [112-115]. Allerdings existierten vor 10 Jahren noch wenig systematische Analysen bezüglich des Nachweises von tumorspezifischen T-Zellen im Knochenmark. Unsere Analysen, die detailliert unter 3.1.2, 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben sind, sowie die anderer Arbeitsgruppen [109,

110, 116] konnten eine Anreicherung von tumorspezifischen und von spontanen und durch Vakzinierung induzierten tumorantigen-spezifischen Memory-T-Zellen im Knochenmark nachweisen. Bei Mammakarzinom-Patientinnen und bei Melanompatienten konnte gezeigt werden, dass erst die systemische Präsenz von Tumorantigenen wie im metastasierten Stadium oder bei erhöhten Tumormarkern im peripheren Blut die Induktion von tumorspezifischen Memory-T-Zellen im Knochenmark zur Folge hat [109, 117]. Diese Analysen untermauern, insbesondere auch im Zusammenhang mit der Analyse virusspezifischer T-Zellen, dass das Knochenmark ein wichtiges Kompartiment für die Akkumulation, Proliferation und Persistenz von Memory-T-Zellen darstellt [118, 119]. Memory-T-Zellen sind die Träger der eigentlichen langanhaltenden Immunität und zeichnen sich durch persistierende, funktionell ruhende und immunkompetente T-Zellen aus. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen zeigen sie eine schnellere Proliferation auch auf einen geringeren Antigenreiz hin [120] und benötigen keine zusätzliche Kostimulation durch APC [121]. In der Regel fällt die Sekundärantwort stärker und spezifischer aus und ist durch Multifunktionalität der Memory-T-Zellen gekennzeichnet.

Inzwischen existieren mehrere Differenzierungsmodelle, die z.T. kontrovers diskutiert werden [122-126]. Nach einem Modell von Sallusto kann man Effektor- (Tem) und zentrale Memory-T-Zellen (Tcm) unterscheiden [127, 128]. Tem, die als CD45RA⁺, CCR7⁻ T-Zellen charakterisiert sind, weisen ein hohes Effektorpotential auf, jedoch nur geringes Proliferationspotential nach Antigenstimulation und die Fähigkeit sich in peripheren Geweben anzureichern [129, 130]. Im Gegensatz dazu sind die CD45RA⁻, CCR7⁺ Tcm durch ein hohes Proliferationspotential gekennzeichnet und besitzen die Fähigkeit im Organismus zu persistieren und in lymphatische Organe zu migrieren [127, 131, 132]. Eine weitere Charakterisierung der Memory-T-Zellen gelingt über ihren Funktionszustand und besonders interessant sind sogenannte multifunktionalen Memory-T-Zellen, die in der Lage sind simultan IFN γ , TNF α und IL-2 zu produzieren. Für Memory-T-Zellen mit diesem Phänotyp konnte sowohl in dem Modell einer Leishmania-Vakzinierung als

auch bei HIV-Patienten eine höhere protektive Immunität bzw. längere progressionsfreie Zeit gezeigt werden [133, 134].

Basierend auf diesen Daten sollte eine effektive antigenspezifische Vakzinierung bzw. Immuntherapie sowohl Effektor-T-Zellen, die in der Lage sind Tumorzellen zu zerstören, als auch Memory-T-Zellen, als Garant der anhaltenden Immunität induzieren [131]. Von besonderem Interesse, insbesondere auch für adoptive Therapieansätze sind jedoch die T_{cm} und es konnte bereits in Virus- und in Tumormodellen eine höhere protektive und therapeutische Immunität für T_{cm} als für T_{em} nachgewiesen werden [135].

1.5 Tumorstabilisierung

Vakzinierungen repräsentieren eine potentiell erfolgreiche Strategie um Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität zu verhindern oder einzudämmen. Während die Entwicklung von Vakzinierungen gegen pathogene Mikroorganismen in den meisten Fällen sehr erfolgreich war, ist die Effektivität von Vakzinierungen mit dem Ziel der Induktion einer Antitumor-Aktivität des Immunsystems bisher sehr unbefriedigend. Im Bereich der präventiven Krebsvakzinierungen gab es in den letzten Jahren wichtige Fortschritte mit zwei zugelassenen präventiven Krebsvakzinierungen gegen HBV und HPV, zur Verhinderung HBV-assoziiertes hepatozelluläres Karzinome [136] bzw. HPV-assoziiertes Zervixkarzinome [137, 138].

In der Situation einer bereits etablierten Krebserkrankung gab es trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten insgesamt nur wenig Fortschritte. Dennoch zeichnen sich im Jahre 2010 neben enttäuschenden Daten auch einige vielversprechende Entwicklungen ab. Mit Sipuleucel-T[®] gibt es nun die erste von der „Food-and-Drug-Administration“-Behörde der USA (FDA) zugelassene Vakzinierung beim hormonrefraktären Prostatakarzinom die einen Überlebensvorteil zeigen konnte [139-141]. Sipuleucel-T[®] besteht aus autologen antigenpräsentierenden Zellen, die mit

einem Fusionsprotein aus GM-CSF und dem prostataspezifischen Antigen prostatic-acid-phosphatase (PAP) beladen wurden. Daneben stehen mit BiovaxID® [142] und Rindopepimut® [143, 144] zwei weitere Vakzinierungs-Kombinationen bei follikulären Lymphomen und Glioblastomen möglicherweise kurz vor der Zulassung.

Prinzipiell ist das Ziel aller Vakzinierungsansätze die Aktivierung von APC und die Stimulation einer durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelten Immunantwort. Idealerweise sollten neben Effektor-T-Zellen auch Memory-T-Zellen induziert werden, die eine langanhaltende Immunität vermitteln. Unklar ist bisher noch, welche Rolle eine möglicherweise durch die Vakzinierung induzierte antigenspezifische Antikörperantwort spielt [34, 145]. APCs können das jeweilige tumorspezifische Antigen oder mehrere Antigene in verschiedenen Formen aufnehmen: Grundsätzlich kann man zwischen tumorbasierten, virusbasierten, peptid- oder proteinbasierten, APC-basierten und DNA- oder RNA-basierten Vakzinierungen unterscheiden.

In den letzten 20 Jahren wurde die Vakzinierung mit definierten Tumorantigenen mit dem Ziel der Generierung tumorspezifischer T-Zellen in klinischen Studien erprobt und weiterentwickelt. Solche Vakzinierungen bestehen in der Regel aus drei Teilen: Antigen oder Antigene, Adjuvanz oder mehrere Adjuvantien und einem Applikationssystem. Angesichts der zuvor beschriebenen Vielfalt an Antigenen, diversen verfügbaren Adjuvantien und Applikationssystemen gibt es eine große Zahl an potentiell wirksamen Vakzinierungskombinationen. Erst in den letzten Jahren gab es sinnvolle und dringend notwendige Priorisierungsinitiativen unter Federführung des National Institutes of Health (NIH) in den USA [74, 146, 147], um die Vakzinierungsentwicklung strukturierter und effektiver voranzutreiben. Die bisherigen Studien konnten bei Patienten mit aktiver Tumorerkrankung im Rahmen von klinischen Phase I/II-Studien mit unterschiedlichen Vakzinierungsprotokollen bei der Mehrzahl der Patienten eine T-Zell-Antwort gegen Tumorantigene im Blut induzieren [148-153]. Bei nur wenigen

Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung gelang es jedoch durch die durch die Vakzinierung induzierte T-Zell-Antwort eine Rückbildung des Tumors nach „Response-Evaluation-Criteria-In-Solid-Tumors,“ (RECIST)-Kriterien zu erreichen [150, 151, 154, 155]. Mögliche Ursachen dieser limitierten klinischen Effizienz könnten in einer qualitativ und funktionell nicht ausreichenden, durch die Vakzinierung induzierten T-Zell-Antwort begründet sein, die möglicherweise Folge von immunregulatorischen und immunsuppressiven Mechanismen ist, die bei Tumorpatienten häufig auftreten. Klinisch vielversprechender sind Tumorkvakzinierungen für Hochrisikopatienten in der adjuvanten Situation.

1.5.1 Tumorkvakzinierung bei Melanom

Die Mehrzahl der Vakzinierungsstudien sind bisher beim Melanom durchgeführt worden, zum einen aufgrund von Hinweisen auf eine gute Immunogenität der Erkrankung, zum anderen auch weil es beim metastasierten Melanom jenseits der Erstlinientherapie kaum etablierte und effektive Therapien gibt und die Patienten häufig mit experimentellen Ansätzen in klinischen Studien behandelt werden. Weiterhin ist die Erkrankung in fortgeschrittenen Stadien meistens rasch progredient [156, 157], so dass Aussagen über eine klinische Effektivität der Vakzinierung innerhalb eines kurzen Zeitfensters getroffen werden können. Gleichzeitig ist dies möglicherweise ein Faktor, der eine effektive Immuntherapie erschwert, da es zum Teil bis zu Monaten dauern kann bis eine effektive Immunantwort induziert wird [158]. Ergebnisse aus Phase-II-Studien, die in unserer Arbeitsgruppe und in anderen Arbeitsgruppen in der adjuvanten Situation oder bei Patienten mit geringer Tumorlast durchgeführt wurden sprechen dafür, dass eine Vakzinierung mit Tumorantigenen beim metastasierten Melanom das Wiederauftreten von Rezidiven verzögern bzw. z.T. verhindern kann [3.4.1] [159]. Allerdings müssen diese Daten der Prüfung in kontrollierten, randomisierten Studien standhalten, bevor ein breiter Einsatz in der Klinik zu rechtfertigen ist.

Im Zusammenhang mit der Vakzinierungsentwicklung hat man in den letzten Jahren zunehmend regulatorische Mechanismen identifiziert und charakterisiert, welche sowohl die natürliche, als auch die potentiell durch die Vakzinierung induzierte Immunantwort gegen Tumoren limitieren können. Eine Effektivitätssteigerung von Vakzinierungsansätzen gelingt möglicherweise über die Beeinflussung solcher Moleküle. Eines der vielversprechendsten Moleküle stellt das Cytotoxic-T-Lymphocyte-associated-Antigen-4 (CTLA-4) als sogenanntes Immun-Checkpoint-Molekül dar, welches T-Zell-Aktivierungswege herunterreguliert. Sehr interessant sind daher die Daten einer 2010 publizierten Studie von Hodi et al. die - als erste randomisierte Phase-III-Studie beim metastasierten Melanom überhaupt - zeigen konnte, dass Ipilimumab als CTLA-4-Antagonist mit oder ohne gp-100-Vakzinierung im Vergleich zu gp-100-Vakzinierung allein das Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem Melanom mit 10,1 vs. 6,4 Monaten verbessern konnte [160]. Wider Erwarten bewirkte die Kombination mit der in Montanide gelösten gp-100-Vakzinierung in dieser Studie keinen weiteren Benefit, sondern es war im Gegenteil sogar eine Verschlechterung im Vergleich zu Ipilimumab allein zu beobachten. Dafür zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz. Auch in einer kürzlich publizierten Phase-II Studie von Weber *et al.* bei Melanompatienten mit reseziertem Stadium IIIc und IV [161] konnte eine, ebenfalls in Montanide gelöste, Multiepitop-Vakzinierung bestehend aus Klasse-I-bindenden Peptiden von Tyrosinase, gp-100 und MART-1 keinen klinischen Vorteil gegenüber Ipilimumab allein in gesteigerter Dosis zeigen.

Im Kontrast dazu steht eine Phase-III-Studie mit einer ähnlichen, in Montanide gelösten gp-100-Peptid-Vakzinierung, die in Kombination mit hochdosiertem IL-2 ein signifikant besseres Ansprechen zeigte als hochdosiertes IL-2 alleine [162]. Diese Daten unterstreichen, dass die Effektivität von Vakzinierungen abhängig ist von den zusätzlich verabreichten Adjuvantien und es ist zu beachten, dass Vakzinierungen in bestimmten Konstellationen durchaus nachteilig sein können. Dies erfordert einen sehr sorgsamen Umgang mit der weiteren Entwicklung von Vakzinierungen, insbesondere im Hinblick auf die

Planung weiterer Studien, Komedikationen sowie Patienten- bzw. Kontrollgruppen.

Insgesamt sind die Daten aus mehreren Phase-III-Studien beim Melanom widersprüchlich: Zum Teil zeigt sich ein Benefit der Vakzinierung [162-164], andere Studien wie eine Multi-epitop-Vakzinierung mit dendritischen Zellen [165] konnten keinen Unterschied zwischen Vakzinierungsarm und Kontrollarm nachweisen. Aber es existieren auch Phase-III-Daten von Gangliosid-Vakzinierungen [166, 167] und Canvaxin® [168], bestehend aus allogenen Melanomzellen in Kombination mit Bacille-Calmette-Guerin, die eine Verschlechterung des klinischen Ansprechens durch die Vakzinierung im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten, so dass die Studien vorzeitig beendet wurden. Auch die Daten von Phase-III-Vakzinierungsstudien bei anderen Tumorentitäten zeigen ein uneinheitliches Bild (Zusammenfassung in [155, 169]) und es konnten sowohl positive (Provenge, PSA-TRICOM (Prostatakarzinom), Oncophage (Melanom), OncoVAX (Kolonkarzinom), Reniale (Nierenzellkarzinom)), neutrale (PANVAC-VF (Pankreaskarzinom), GVAX (Prostatakarzinom), Oncophage (Nierenzell-Karzinom), Stimuvax (Bronchialkarzinom)) als auch nachteilige Effekte (GVAX/Docetaxel) der Vakzinierung nachgewiesen werden.

Für die Weiterentwicklung von effektiven Tumorstimmtherapien bzw. von Tumorstimmtherapien wird die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern, die mit einem klinischen Vorteil assoziiert sind, sowie die Identifizierung von Immunresistenzmechanismen gerade bei negativen Studien von essentieller Bedeutung sein [170]. Das alleinige T-Zell-Monitoring, insbesondere wenn es isoliert im peripheren Blut erfolgt, erscheint nach den bisherigen Erfahrungen bezüglich des klinischen Ansprechens nicht aussagekräftig genug. Insgesamt sind trotz der z.T. negativen Daten weitere, gut designte Vakzinierungsstudien mit funktionell relevanteren Antigenen und potenteren Adjuvantien insbesondere als Kombinationstherapien durchaus gerechtfertigt, um das

therapeutische Potential immuntherapeutischer Ansätze optimal zu nutzen [171-174].

1.5.2 Tumorstabilisierung bei Leukämien

Basierend auf den Erfahrungen beim Melanom und anderen soliden Tumoren haben wir uns bereits seit 10 Jahren mit der Entwicklung von Stabilisierungen bei Leukämien beschäftigt. Die Grundlage dafür stellten die im Folgenden aufgeführten Daten bezüglich der Interaktion von Leukämien und dem Immunsystem dar:

In den 70er Jahren wurde klar, dass mit den neu entwickelten Chemotherapeutika Daunorubicin und Cytarabin bei einem Großteil der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) Remissionen erreicht werden konnten. Allerdings zeigte sich auch, dass durch Konsolidierungs- und Erhaltungstherapien nicht immer anhaltende Remissionen erreicht werden konnten. Damit kam der Impuls zu testen, ob Rezidive durch Stabilisierungen gegen Leukämien zum Zeitpunkt der Remission, wenn die Erkrankung nur noch geringe residuelle Aktivität aufweist, verhindert werden könnten. Bereits 1977 konnte eine Stabilisierung mit Bacille-Calmette-Guerin (BCG) und bestrahlten autologen Leukämiezellen verlängerte Remissionen und Überleben in der Stabilisierungsgruppe zeigen [175]. Allerdings sank mit der Etablierung von Hochdosischemotherapien und allogenen Stammzelltransplantationen zunächst das Interesse an der Weiterentwicklung von Stabilisierungsstrategien bei AML-Patienten. In den nachfolgenden Dekaden wurde aber v.a. durch die Erfahrungen mit allogenen Stammzelltransplantationen klar, dass das Spender-Immunsystem in der Lage ist einen Spender-gegen-Leukämie (GvL)-Effekt aufzubauen, dessen Potential zunehmend realisiert wurde und auf eine wichtige Rolle sowohl von T-Zellen als auch von NK-Zellen hinweist. In den letzten Jahren stieg, auch angesichts von nur geringen Verbesserungen im Langzeitüberleben v.a. der Patienten über 60 Jahre, wieder das Interesse an Immunmechanismen die in der Lage sind, die Leukämie langfristig zu kontrollieren. Die Eliminierung einer minimalen Resttumor bei Patienten mit Leukämien ist nach wie vor

schwierig und stellt sicher den entscheidenden Schritt dar, um Gesamtüberleben und Heilungsraten signifikant zu verbessern. Die immuntherapeutischen Ansätze könnten dabei das Portfolio an Leukämietherapien sinnvoll ergänzen.

Bezüglich der Immunogenität von Leukämiezellen gibt es zahlreiche Hinweise, dass AML-Zellen geeignete Zielstrukturen sowohl für innerte als auch für adaptive Immunantworten darstellen. Mit der Expression sowohl von HLA-Klasse-I- als auch HLA-Klasse-II-Molekülen sind AML-Zellen empfindlich gegenüber T-Zellerkennung und -zerstörung [176, 177]. T-Zellen die autologe AML-Blasten erkennen, konnten *in vitro* nach Stimulation mit antigenpräsentierenden AML-Zellen generiert werden [178, 179]. Spontane T-Zellen gegen häufige Leukämieantigene wurden bereits im Kapitel zuvor beschrieben und sind bei AML-Patienten in hohen Frequenzen nachweisbar, dagegen nur sehr selten bei gesunden Individuen [98, 180, 181].

Bislang existieren nur sehr indirekte Hinweise für das Auftreten von Immunsurveillance bei AML-Patienten. Allerdings konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Lymphozytenregeneration nach Induktionschemotherapie einen prädiktiven Wert für das klinische Ansprechen hat: Patienten mit den höchsten Lymphozytenwerten 6 Wochen nach Chemotherapie wiesen die niedrigsten Rezidivraten auf und ebenso waren die Langzeitüberlebensdaten besser bei Patienten mit rasch normalisierten Lymphozytenwerten [182-184].

In den letzten Jahren wurden allerdings auch diverse Veränderungen von AML-Zellen sowohl bei Erstdiagnose als auch im Rezidiv identifiziert, die vermuten lassen wie Leukämien trotz potentieller Immunsurveillance entstehen und wie bereits etablierte Leukämien ihre Charakteristika so verändern, dass sie der Immunkontrolle entgehen können [185]: Mit zunehmender Frequenz wurden AML-Blasten identifiziert, die für Immun-Escape prädisponierende Moleküle exprimieren, wie z.B. das Cytotoxic-Lymphocyte-Antigen-4 (CTLA-4) [186], 4-1BB-Ligand [187] oder das inhibitorische „Killer-cell-Ig-like-receptor“- (KIR)-Molekül KIR2DL2 [188]. Weiterhin tragen AML-Blasten häufig nur in geringem Maße kostimulatorische

Moleküle und so konnte nachgewiesen werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer anhaltenden Remission am größten bei Patienten mit Expression von sowohl CD80 als auch CD86 auf den AML-Blasten ist [176]. Zudem können AML-Blasten zahlreiche Faktoren sezernieren die für T-Zell- und NK-Zell-Dysfunktionen verantwortlich sein könnten [189, 190]. Ein weiterer Resistenzmechanismus akuter myeloischer Leukämien besteht in der Generierung von leukämischen dendritischen Zellen (AML-DC), die als antigenpräsentierende Zellen fungieren. Allerdings weisen diese AML-DC abnormale Funktionen auf [191], inhibieren zytotoxische T-Zellen [192], induzieren T-Zell-Anergie [193, 194], generieren regulatorische T-Zellen (Treg) [195] und reduzieren die Anzahl naiver T-Zellen die aus dem Thymus entstehen. Neben diesen Mechanismen scheint außerdem das Mikroenvironment im Knochenmark zum Beispiel mit mesenchymalen Stromazellen, die ein immunsuppressives Milieu generieren oder protektiven endostalen Regionen das Überleben der Leukämie zu fördern.

In den letzten Jahren wurden die ersten antigenspezifischen Vakzinierungen bei Leukämie-Patienten entwickelt und getestet. Die Basis dafür bilden inzwischen mehr als 14 Kandidaten-Antigene die wie bereits beschrieben als leukämieassoziierte Antigene (LAA) auf AML-Blasten identifiziert werden konnten [196]. Am besten untersucht und als Peptid-Vakzinierungen in klinischen Studien weiterentwickelt sind bislang WT1, Proteinase-3 und RHAMM [197]. In der Regel wurden in den klinischen Studien Klasse-I-Epitope verwendet in Kombination mit Adjuvantien wie BCG, Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) oder inkomplettem Freund's Adjuvanz mit oder ohne gleichzeitig appliziertem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF). Obwohl alle Studien unterschiedliche Vakzinierungsschemata, Peptide, Peptidkonzentrationen und Adjuvantien verwendeten und bei unterschiedlichen Patientengruppen durchgeführt wurden, zeigten sich bei nahezu allen klare Hinweise für eine immunologische, molekulare und klinische Effektivität.

Basierend auf den Erfahrungen der Vakzinierungstherapie bei Patienten mit Malignen Melanomen [3.4.1] und im Anschluss an die Analysen der WT1-

spezifischen spontanen Immunität bei Patienten mit AML und MDS [3.2.2] begannen wir in unserer Arbeitsgruppe 2002 mit der ersten WT1-Peptid-Vakzinierung mit einem HLA-A201-bindenden WT1.126-134 Peptid in Kombination mit KLH und GM-CSF bei Patienten mit aktiver AML und MDS [198] [3.4.2]. Parallel dazu wurden weitere kleinere WT1-Peptid-Vakzinierungsstudien bei AML-Patienten in Kompletter Remission (CR) durchgeführt, die eine gute Immunogenität und klinische Effektivität im Sinne von Reduktion der WT1-m-RNA-Expression als Marker einer minimalen Resterkrankung zeigten [153, 199]. In der ersten Studie von Oka *et al.* wurden 12 AML Patienten in CR und 2 MDS-Patienten mit unterschiedlichen Mengen (0,3mg, 1,0mg and 3,0mg) eines HLA-A24-bindenden WT1-Klasse-I-Epitops gelöst in Montanide vakziniert. In der zweiten Studie von Rezvani *et al.* erhielten 5 AML Patienten in CR und 2 MDS Patienten eine Vakzinierung mit dem HLA-A0201-bindenden WT1.126-134 Peptide in Kombination mit einem Proteinase-3-Peptid, Montanide und GM-CSF.

Inzwischen wurde von Scheinberg *et al.* bei AML-Patienten in CR eine Vakzinestudie mit einer, in Montanide gelösten, polyvalenten WT1-Peptid-Vakzine durchgeführt, welche sowohl CD4- als CD8-Epitope enthielt [200]. Die Patienten erhielten jeweils 6 Vakzinierungen im Abstand von 2 Wochen in Kombination mit GM-CSF. Von 9 auswertbaren Patienten konnten bei 7 Patienten alle 6 Vakzinierungen durchgeführt werden. Ein weiterer Ansatz einer WT1-Vakzinerung wurde kürzlich von van Tendeloo *et al.* publiziert, die eine Vakzinierung mit WT1-mRNA beladenen dendritischen Zellen bei AML-Patienten in partieller Remission und CR durchführten [201]. Daneben wurden einige Studien mit anderen Antigenen wie Proteinase-3-Peptid in Dosen von 0,25-1,0mg in Kombination mit Montanide und GM-CSF bei Patienten mit CML, AML und MDS [202] und RHAMM-Peptid in Dosen von 0,3 und 1mg zusammen mit Montanide und GM-CSF bei AML-Patienten durchgeführt [68].

Tabelle 1 Klinische Vakzinierungsstudien mit WT1 bei Patienten mit AML und MDS

Patienten	Vakzinierungs-Schema (in Wochen)	Antigen HLA-Klasse-I	Antigen HLA-Klasse-II	GM-CSF	Montanide	Andere Adjuvantien	T-Zell-Antwort	Molekulares Ansprechen	Klinisches Ansprecher
AML n=12 CR MDS n=1 sAML n=1	0,2,4,6,8,10,...	A24 235-243 0,3, 1,0, 3,0mg	-	-	+	-	9/13 Tetramer	5/14	7/14
MDS n=1	0,2,4,6,8,10,...	A24 235-243 0,005 mg	-	-	+	-	1/1 Tetramer	1/1	1/1
AML n=1 PR3 MDS n=1	0,2,4,6,8,...40	A24 235-242 1mg	-	-	+	-	2/2 Tetramer	1 SD (>3 Jahre) 1 Sistieren Transfusion	2/2
AML n=5 CR MDS n=2	eine Vakzine	WT1 A2, 126-134 PR1 A2, 169-177	-	+	+	-	5/8 Tetramer und ICC temporär	3/6 temporär	2 SD 3 anhaltende CR 2 Rezidive (3, 6 Monate)
AML n=17 mit aktiver Erkrankung MDS n=2	I: 0,2,4,6,10,14,... II: 0,2,4,6,8,10,...	A2, 126-134, 0,2mg	KLH 1mg	+	-	-	8/19 Tetramer 7/19 ICC	6/17 3/17 stabil	1 CR 14 SD (3-54 Monate)
AML n=7 Hochrisiko CR	I: 0,2,4,6,10,14,... II: 0,2,4,6,8,10,...	A2, 126-134, 0,2mg	KLH 1mg	+	-	-	4/7 Tetramer 3/7 ICC	4/7	PFS 2,2,4,5,10, 17,24+,32 Monate
AML n=4 mit aktiver Erkrankung	0,2,4,6,8,10,12	WT1 A2 126-134 PR3 169-177 1mg	PADRE 1mg	-	+	CpG 7909 1mg	0/4 Absinken präexist. T-Zellen	0/4	0/4
AML n=9 CR, WT1+	0,2,4,6,8,10,12	WT1-A1, WT1-122A1 long 200mg	WT1 427 long, 331 long, 122A1 long 200mg	+	+	-	7/9 CD4+ 3/9 CD8+ 2/9 DTH+	Kaum Verände- rungen	5 anhaltende CR (41+, 36+, 33+, 34+, 33+ Monate)
AML n=10 2 PR, 8 CR	0,2,4,6,14,22,30, 38,...	WT1 mRNA	WT1 mRNA	- (Monozyten generierte DC)	-	-	2/5 Tetramer 9/9 ICC (in vitro IL-2) 4/9 NK	5/10	2 CR aus PR, 3 molekulare Antworten in CR

1.6 T-Zell-Monitoring

In den letzten 20 Jahren gelang durch die Entwicklung sensitiver Assays ein wesentlicher Fortschritt in der Charakterisierung tumorspezifischer T-Zellen. Dennoch ist die valide Messung natürlicher, ebenso wie therapieinduzierter T-Zellen weiterhin eine große Herausforderung. Dabei stellt v.a. die niedrige Frequenz der tumorspezifischen T-Zellen mit $1/10^4$ - $1/10^5$ und das Bestreben T-Zellen direkt *ex vivo* ohne vorherige *in vitro* Stimulation zu messen hohe Anforderungen an akkurate und reproduzierbare Testmethoden. Die verwendeten Assays sollten zudem für die klinische Routine geeignet und standardisierbar sein [203].

Ein wesentlicher Durchbruch war daher die Entwicklung von inzwischen kommerziell vertriebenen fluoreszierenden Peptid-MHC-Klasse-I-Multimeren [204]. Multimere ermöglichen eine direkte Identifizierung, Quantifizierung und Phänotypisierung, sowie eine Isolierung antigenspezifischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Allerdings lässt die Multimeranalyse keine Rückschlüsse auf die Effektorfunktion antigenspezifischer T-Zellen zu, so dass eine Kombination mit anderen funktionellen Assays notwendig ist.

Funktionale T-Zell-Assays wie der ELISPOT-Assay und die intrazelluläre Zytokin-Durchflusszytometrie (ICC) nutzen die antigenspezifische Induktion von Zytokinen um spezifische T-Zellen auf Einzelzell-Niveau zu detektieren. Mit Hilfe des ELISPOT-Assays, der 1988 von Czerkinsky zur Detektion zytokinproduzierender Zellen etabliert wurde, gelingt der sensitive Nachweis von antigenreaktiven T-Zellen auf Einzelzellniveau ohne vorherige *in vitro* Stimulation in Frequenzen von $1/10^5$ zytokinproduzierender T-Zellen [100, 204-206]. Der Test besitzt eine hohe Reproduzierbarkeit [205], die in zahlreichen Ringversuchen belegt werden konnte [207-211]. Die Entwicklungen der letzten Jahre ermöglichen inzwischen die Detektion verschiedener Zytokine und anderer Moleküle wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TGF\beta$, Granzyme B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, Fas-Ligand und MMP-1. Die Analyse kann auch als Kombination zweier Marker im

dualen Ansatz [212] erfolgen und ist inzwischen für Hochdurchsatzanalysen angepasst [213].

Die ICC hat den Vorteil, dass eine simultane phänotypische Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen möglich ist. Die Vielfarben-Durchflußzytometrie ermöglicht die genaue phänotypische und funktionelle Analyse einzelner T-Zell-Populationen [214], u.a. mit der Frage der Memory-/ Effektor-T-Zelldifferenzierung, dem Aktivierungsstatus, dem Zytokinprofil, der Expression von Migration regulierenden Chemokinrezeptoren, nach suppressiven Faktoren, dem Proliferationspotential [215] und der zytotoxischen Funktion [216, 217]. Die Entwicklung von modernen Vielfarben-Durchflusszytometern, die inzwischen mehr als 20 Fluorochrome gleichzeitig detektieren können, ermöglicht allein schon durch eine Vielfarbenfärbung eine Unterscheidung in hunderte verschiedener zellulärer Subphänotypen. Dies bringt jedoch enorme Datensätze hervor, die in sinnvoller Weise nur mit Hilfe von Software-gestützten Auswertetools bewältigt werden können um dann potentiell klinisch relevante Phänomene zu identifizieren ([218-220]. Weiterhin wird mit der Verfügbarkeit vieler verschiedener Fluorochrome, die Selektion optimaler Fluorochromkombinationen zunehmend komplizierter und es zeigen sich enorme Variationsbreiten zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen und Zytometern [221].

Daneben bekommen molekularbiologische Analysen in den letzten Jahren einen vermehrten Stellenwert in der Charakterisierung der T-Zell-Immunität. Neben der Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires [3.2.4] lassen sich auch Transkripte verschiedener Zytokine in antigenstimulierten T-Zellen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen [222]. Die Entwicklung von Mikroarrays ermöglicht in bestimmten T-Zellsubpopulationen oder bei zuvor separierten antigenspezifischen T-Zellen die parallele Analyse der Expression vieler tausend Gene [223, 224]. Damit gelingt möglicherweise die Identifizierung von bisher unbekanntem Mechanismen und Charakteristika einer effektiven tumorspezifischen Immunität [225]. Parallel dazu bieten Mikroarrays die Möglichkeit der detaillierten Analyse des Tumorgewebes und für etliche Tumoren konnten bereits sogenannte „immunologische Signaturen“

identifiziert werden, die mit einem verbesserten Überleben assoziiert waren [226-230]. Insgesamt waren v.a. Gene, die mit Interferon assoziiert sind, Moleküle der Zellerkennung, v.a. MHC-Klasse-II und Gene im Zusammenhang mit T-Zell-Aktivierung von Relevanz (Zusammenfassung in [231]).

Einige wenige klinische Tumorstudien konnten mittels zytokinbasierten T-Zellassays bisher eine Assoziationen zwischen klinischem Ansprechen und dem Nachweis von durch die Vakzinierung induzierten T-Zellen zeigen [159, 232, 233]. Vielfach war die Induktion einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort allerdings nicht mit einem klinischen Vorteil assoziiert oder umgekehrt ließ sich bei Patienten mit Hinweisen auf eine klinische Effizienz keine T-Zell-Antwort nachweisen.

Diese Daten und die Erkenntnis, dass Assays zur Detektion von zellulären Immunantworten höchst variable Ergebnisse liefern können, hat dazu geführt, dass es seit 2004 zahlreiche Initiativen des Cancer-Immunotherapy Consortiums des Cancer-Research-Institute (CIC-CRI) in den USA, in Kooperation mit der „Society for Immunotherapy of Cancer“ (SITC zuvor International Society for Biological Therapy of Cancer (iSBTc)) und der Assoziation für Krebsimmuntherapie (CIMT) in Europa zur Assay-Harmonisierung insbesondere im Rahmen von Multizenterstudien gab. Ziel war es, die Variabilität zu minimieren und die zelluläre Immunantwort als reproduzierbaren Biomarker zu etablieren und eine mögliche Korrelation zum klinischen Ansprechen zu dokumentieren [170]. Basierend auf den Erfahrungen mehrerer großer Ringversuche, die z.T. erstaunliche Diskrepanzen hervorbrachten, sind inzwischen Richtlinien zur Harmonisierung von ELISPOT-Assays und Tetramer-Assays veröffentlicht [208, 234] und auch Empfehlungen für ICC ausgesprochen worden [235].

Daneben gibt es eine weitere Initiative „MIATA“ (Minimal information about T-cell assays), deren Ziel es ist, ein standardisiertes Gerüst für die Publikation von Immunmonitoring-Studien zu etablieren [236]. Zunächst erfolgte ein öffentlicher Konsultationsprozess um ein Feedback der „Immuntherapie-

Gemeinschaft“ einzuholen. Neben vielen positiven Voten gab es im Rahmen dieses Meinungsbildungsprozesses auch einige kritische Stimmen, die trotz aller sicher notwendigen Harmonisierung und Standardisierung anmerkten, dass möglicherweise das größere Problem des derzeitigen Immunmonitorings nicht die fehlende Validierung der Assays, sondern die Tatsache ist, dass die Parameter, die analysiert werden, nicht von Relevanz für die untersuchte Tumorbiologie sind [Marincola, www.miataproject.org] Möglicherweise sind Parameter, die die Biologie des einzelnen Tumors, dessen Mikroenvironments und die genetischen Vorraussetzungen der Patienten berücksichtigen viel relevanter als die isolierte Analyse der Frequenzen zirkulierender T-Zellen, die nicht die Komplexität der Vorgänge widerspiegeln die zu Tumorregressionen führen. Weiterhin sollte nach Einschätzung anderer Autoren sorgfältig zwischen 1. der Standardisierung und Validierung von Assays, die zur klinischen Entscheidungsfindung führen und 2. der kontinuierlichen Implementierung von guten wissenschaftlichen Prinzipien in Studien im Zusammenhang mit Grundlagen- und translationaler Forschung unterschieden werden. Eine zu große Fokussierung auf Standardisierung bisheriger Assays berge die Gefahr einer Einschränkung von Kreativität und damit einer Verzögerung der Entwicklung neuer Assays. Eine weitere gemeinsame Initiative sollte sich daher v.a. auch auf die Identifizierung neuer Assays konzentrieren, die Daten generieren können, um geeignete Patienten für einzelne Immuntherapien identifizieren zu können, unnötige potentiell toxische Therapien zu vermeiden und vielversprechendere Therapien an den Anfang zu stellen [Sharma, Allison, Wolchok, Yee, Greenberg, www.miataproject.org].

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Zielsetzung der hier zusammengefassten Arbeiten war die detaillierte Analyse spontaner und durch Vakzinierung induzierter T-Zellen bei Patienten mit soliden und hämatopoetischen Neoplasien im Kontext von Vakzinierungsstudien. Zunächst erfolgten grundlegende Analysen der spontanen T-Zellimmunität bei Melanompatienten. Mit dem Ziel das Spektrum der detektierbaren T-Zellen zu erweitern, wurde ein Assay-System etabliert mit dem die Analyse spontaner tumorreaktiver T-Zellen gegen allogene und autologe Tumorzelllinien direkt *ex vivo* aus dem peripheren Blut gelang. Im Anschluss sollte geklärt werden, inwieweit sich tumor- und tumorantigen-spezifische T-Zellen in verschiedenen Kompartimenten des Körpers unterscheiden. Im Mittelpunkt stand dabei die vergleichende Analyse der melanomspezifischen T-Zellimmunität im peripheren Blut und in dem immunologisch sehr interessanten Kompartiment Knochenmark. Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen erfolgte die Durchführung einer Tyrosinase-Peptid-Vakzinierungsstudie bei Patienten mit metastasiertem Melanom in der adjuvanten Situation. Daran anschließend führten wir ein detailliertes immunologisches und klinisches Monitoring insbesondere bei Patienten mit wiederholten Rezidiven im Vorfeld der Vakzinierungstherapie und klinisch gut zu evaluierendem Ansprechen durch. Im Rahmen des Immunmonitorings wurde auch geprüft, inwieweit sich im Knochenmark ähnliche Phänomene wie bei spontanen, auch bei den durch Vakzinierung induzierten, melanomspezifischen T-Zellen identifizieren lassen.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die Erkenntnisse von Peptid-Vakzinierungen beim Melanom auf Patienten mit hämatopoetischen Neoplasien übertragen werden. Um die Problematik von immunologischer Toleranz oder Induktion von Autoimmunität in Zusammenhang mit den leukämieassoziierten Antigenen WT1 und Proteinase-3 zu evaluieren, wurde zunächst analysiert, ob spontane WT1- und Proteinase-3-spezifische T-Zellen bei Patienten mit AML und gesunden Kontrollpersonen vorkommen. Aufbauend auf diesen Daten wurde in Anlehnung an das erfolgreiche Vakzinierungsprotokoll beim Melanom eine WT1-Peptid-Vakzinierungsstudie

bei Patienten mit AML und MDS initiiert. Unter Berücksichtigung der Studienziele Immunogenität, Toxizität und klinische Effektivität erfolgte ein detailliertes Monitoring dieser Studie. Zur genaueren Charakterisierung der durch die Vakzinierung induzierten WT1-spezifischen T-Zellen und potentieller Resistenzmechanismen erfolgte bei einer Patientin mit sehr interessantem klinischen Verlauf eine klonotypische Analyse der WT1-spezifischen T-Zellantwort unter besonderer Berücksichtigung der klonalen T-Zellexpansion sowie der Verteilung in verschiedenen Kompartimente.

3 EIGENE ARBEITEN

3.1 Spontane tumorspezifische T-Zellimmunität

Spontan vorkommende T-Zellen gegen Tumorzellen und Tumorantigene sind ein häufiges Phänomen bei Tumorpatienten. Das Verständnis der Mechanismen und des Verhaltens von spontanen tumor- und tumorantigen-spezifischen T-Zellen bietet wichtige Informationen für die Entwicklung effizienterer T-Zell-basierter Immuntherapien. Im Vorfeld von geplanten Vakzinierungsstudien spricht der Nachweis von spontanen, funktionellen T-Zellen gegen Immuntoleranz, aufgrund von selektioniertem T-Zell-Rezeptor-Repertoire oder T-Zellenergie. Des Weiteren macht der Nachweis spontaner T-Zellen in Abwesenheit von Autoimmunphänomenen es weniger wahrscheinlich, dass durch die Vakzinierung induzierte T-Zellen sich gegen normales Gewebe richten.

Spontane T-Zellen gegen melanomassoziierte Antigene können regelmäßig im peripheren Blut von Melanompatienten nachgewiesen werden. In der ersten Arbeit (3.1.1) untersuchten wir spontane T-Zellen gegen HLA-gematchte, allogene und autologe Tumorzelllinien bei Patienten mit metastasiertem Melanom, um ein breiteres Spektrum an potentiellen Tumorantigenen, als die zu dem Zeitpunkt der Analyse für das Melanom definierten Tumorantigene abzudecken. Die meisten Analysen spontaner T-Zellen erfolgten im peripheren Blut oder im Tumorgewebe und zu dem Zeitpunkt der Analyse (3.1.2) gab es keine funktionellen oder phänotypischen Analysen tumorspezifischer T-Zellen im Knochenmark, einem Kompartiment, welches häufig Mikrometastasen des Melanoms aufweist.

In der dritten Arbeit (3.1.3) wurde als wichtige Vorarbeit für eine spätere Vakzinierungsstudie bei Patienten mit Leukämien die spontane T-Zell-Immunität gegen die leukämieassoziierten Antigene Proteinase-3 und WT1 mittels IFN γ -ELISPOT-Assay und durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN γ -Sekretion analysiert.

3.1.1 Hohe Frequenzen zirkulierender melanomreaktiver T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom

(Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Nagorsen D, Schmittel A, Thiel E und Scheibenbogen C: High frequencies of circulating melanoma reactive CD8+T cells in patients with advanced melanoma, Int J Cancer. 2000: 87: 659-664.)

Zusammenfassung

Die primäre Fragestellung dieser Arbeit galt dem Nachweis zirkulierender tumorreaktiver T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten. Dazu wurden unstimulierte T-Zellen aus dem peripheren Blut von Melanompatienten auf die Erkennung von HLA-A2- oder HLA-A1-gematchten Melanomzelllinien mittels ELISPOT-Assay getestet. Elf von 19 Patienten mit metastasiertem Melanom zeigten eine T-Zell-Antwort mit Frequenzen von bis zu 0,81%, 0,78%, 0,53%, 0,12%, 0,10%, 0,09%, 0,07%, 0,06%, 0,06%, 0,04% und 0,04% der peripheren mononukleären Zellen (PBMC), die IFN γ nach Kontakt mit verschiedenen HLA-A2 oder HLA-A1-gematchten Melanomzelllinien freisetzen. Diese T-Zell-Antwort wurde von CD8+ T-Zellen vermittelt und konnte bei HLA-A2+ Patienten durch einen anti-HLA-A2-Antikörper spezifisch blockiert werden. Zur näheren Charakterisierung wurden bei einem Patienten CD8+ T-Zellen in CD8+, CD45RA+- und CD8+, CD45RO+-Subpopulationen aufgetrennt und im ELISPOT-Assay getestet. Tumorreaktive T-Zellen konnten sowohl im CD8+ Effektor-T-Zell- (CD45RA+, IFN γ +) als auch im CD8+ Memory-T-Zell-Kompartiment (CD45RO+, IFN γ +) nachgewiesen werden. Bei drei von fünf Patienten, bei denen zusätzlich autologe Tumorzellen zur Verfügung standen, konnten ähnliche T-Zell-Frequenzen sowohl gegen die allogenen HLA-A2- oder HLA-A1-gematchten, als auch gegen die autologen Tumorzelllinien beobachtet werden. Bei den weiteren 2 Patienten konnten nur T-Zellen entweder gegen die autologen oder gegen die allogenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen tumorreaktive CD8+ T-Zellen bei mehr als der Hälfte der untersuchten Melanompatienten. Bei einigen der Patienten, bei denen tumorreaktive T-Zellen nachgewiesen wurden, fanden sich klinische Hinweise für eine möglicherweise immunologisch vermittelte Tumorkontrolle. Andererseits hatten viele Patienten progredient wachsende Tumoren, denen Tumor-Escape-Mechanismen zugrunde liegen könnten.

3.1.2 Das Knochenmark enthält melanomreaktive CD8+ Effektor-T-Zellen und verglichen mit dem peripheren Blut eine vermehrte Anzahl melanomreaktiver CD8+ Memory-T-Zellen

(Letsch A, Keilholz U, Assfalg G, Mailänder V, Thiel E and Scheibenbogen C. The bone marrow contains melanoma-reactive CD8⁺ effector T cells and compared to peripheral blood enriched numbers of melanoma-reactive CD8⁺ memory T cells. Cancer Res. 2003; 63: 5582-5586.)

Zusammenfassung

Zirkulierende melanomspezifische T-Zellen können häufig bei Patienten mit Melanom nachgewiesen werden. Eine effektive T-Zell-Immunität und Tumorüberwachung ist jedoch abhängig von der Anwesenheit spezifischer T-Zellen in Geweben, die von Tumorzellen infiltriert werden. Das Knochenmark (KM) ist ein Kompartiment, in dem häufig mikrometastatische Tumorzellen vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden direkt *ex vivo* Frequenzen und Phänotypen von T-Zellen nach Stimulation mit dem melanomassoziierten Antigen Tyrosinase und autologen Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark verglichen. Mittels intrazellulärer Zytokin- und Tetramer-Färbung konnten tyrosinase- und melanomspezifische CD3⁺, CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark in gleichen oder höheren Frequenzen nachgewiesen werden als im peripheren Blut. Eine zusätzliche Charakterisierung durch die Differenzierungsantigene CCR7 und CD45RA zeigte die Präsenz von spezifischen Effektor- und Memory-T-Zellen im Knochenmark aller 5 analysierten Patienten. Bemerkenswerterweise war die Frequenz tyrosinase- und melanomspezifischer Memory-T-Zellen im Knochenmark signifikant höher als im peripheren Blut. Das Knochenmark stellt somit möglicherweise ein wichtiges Kompartiment für die Tumorüberwachung und das T-Zell-Gedächtnis dar.

3.1.3 CD8+ T-Zellantwort gegen Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 und Proteinase-3 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

(Scheibenbogen C*, Letsch A*, Thiel E, Schmittel A, Mailaender V, Baerwolf S, Nagorsen D, Keilholz U. CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2002; 100: 2132-2137. * geteilte Erstautorenschaft)

Zusammenfassung

Wilms-Tumor-Gen-Produkt WT1 und Proteinase-3 sind überexprimierte Antigene bei der akuten myeloischen Leukämie gegen die zytotoxische T-Zellen *in vitro* und in Maus-Modellen generiert werden konnten. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt um zu analysieren, ob spontane WT1- und Proteinase-3-spezifische T-Zellen bei AML-Patienten detektierbar sind. T-Zellen, die HLA-A2.1-bindende Epitope von WT1 oder Proteinase-3 erkennen, konnten bei 5/15 HLA-A2+ AML-Patienten mittels IFN γ -ELISPOT-Assay und durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN γ -Sekretion nachgewiesen werden. Bei drei weiteren Patienten zeigte sich nur durchflusszytometrisch eine IFN γ -Sekretion. T-Zellen die nach Proteinase-3-Stimulation IFN γ produzierten wurden bei einem Patienten mittels 4-Farben-Durchflusszytometrie weiter analysiert, als CD3+, CD8+, CD45RA+, CCR7-T-Zellen charakterisiert und somit als zytotoxische Effektor-T-Zellen eingeordnet. Passend zu diesem Phänotyp waren fast alle WT1- und Proteinase-3 reaktiven T-Zellen Granzyme-B positiv. Diese Ergebnisse belegten zum ersten Mal die Existenz spontaner T-Zell-Reaktivität gegen definierte Antigene bei AML-Patienten. Die Daten deuten auf eine gute Immunogenität von WT1 und Proteinase-3 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie hin und unterstreichen das Potential dieser Antigene für Vakzinierungen bei Leukämien.

3.2 Klinische und immunologische Ergebnisse mit Tumorvakzinierungen in klinischen Studien

Bei den im Folgenden näher beschriebenen Peptid-Vakzinierungsstudien handelte es sich um Phase-II-Studien bei Patienten mit metastasiertem Melanom und AML bzw. MDS. Das primäre Studienziel in beiden Vakzinestudien war die immunologische Effektivität, daneben die Analyse von Toxizität und klinischem Ansprechen. Essentiell für die Interpretation und Weiterentwicklung solcher früher Vakzinierungsstudien ist das detaillierte Immunmonitoring, welches in den folgenden Arbeiten ausführlich dargelegt wird.

3.2.1 Peptid-Vakzinierung nach wiederholter Resektion von Metastasen kann ein verlängertes Rezidiv-freies Intervall bei Melanompatienten induzieren

(Letsch A, Keilholz U, Fluck M, Nagorsen D, Asemissen AM, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. Peptide vaccination after repeated resection of metastases can induce a prolonged relapse-free interval in melanoma patients. Int J Cancer. 2005; 114: 936-40.)

Zusammenfassung

Diese Pilotstudie wurde durchgeführt um ein erstes Verständnis der Effektivität einer Peptid-Vakzinierung bei Melanompatienten in einer adjuvanten Krankheitssituation mit einem hohen Risiko für ein Rezidiv zu erlangen. Für die vorliegenden Analysen wurden aus den bisherigen adjuvanten Peptid-Vakzinierungsstudien, die in unserer Klinik seit 1998 durchgeführt wurden, alle Melanompatienten identifiziert, die in ihrer Krankheitsgeschichte mindestens 3 komplett rezidierte Metastasen in dem Jahr vor Einschluss in die Vakzinierungsstudie hatten. Die immunologischen und klinischen Verläufe sind hier beschreiben: Von insgesamt 44 Patienten mit rezidierten kutanen Melanomen, die in adjuvante Peptid-Vakzinierungsstudien eingeschlossen wurden konnten 9 Patienten mit mehr als 3 Metastasen im Jahr vor Beginn der Vakzinierung identifiziert werden. Nach Beginn der Vakzinierung blieben 2 Patienten für 27 und 42+ Monate Rezidiv-frei, 2 Patienten hatten einzelne oder mehrere initiale Rezidive, gefolgt von einer rezidivfreien Phase von 18 und 65+ Monaten und 5 Patienten zeigten einen Progress der Erkrankung. Bei beiden Patienten mit Rezidiv nach einer langen rezidivfreien Phase waren die Rezidive auf den Dünndarm beschränkt und konnten vollständig rezidiert werden. Bezüglich der Immunität der Vakzinierung konnte eine Induktion oder ein Boost funktioneller tyrosinasespezifischer T-Zellen bei 6 von 8 Patienten beobachtet werden, darunter alle 4 Patienten mit langen rezidivfreien Intervallen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Peptid-Vakzinierung bei 4 von 9 Patienten mit einem Sistieren der zuvor wiederholten Rezidive assoziiert war und dass bei allen dieser 4 Patienten eine immunologische Antwort auf die Vakzinierung nachzuweisen war.

3.2.2 Spezifische zentrale Memory-T-Zellen im Knochenmark von Patienten nach Tyrosinasepeptid-Vakzinierung

(Letsch A, Keilholz U, Kern F, Asemissen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. Specific central memory T cells in the bone marrow of patients immunized against tyrosinase peptides. J Immunother. 2006; 29: 201-7.)

Zusammenfassung

Das Ziel von Vakzinierungen gegen Tumoren ist zum einen die Induktion von Effektor-T-Zellen die eine Tumorzerstörung vermitteln und zum anderen die von Memory-T-Zellen die eine lang anhaltende Immunität garantieren. Zahlreiche bisherige Studien bei Patienten, die mit Major-Histocompatibility-Complex (MHC)-Klasse-I-Peptiden vakziniert wurden konnten keine Induktion von zentralen Memory-T-Zellen nachweisen, die als wichtig für eine lang anhaltende Immunität angesehen werden. Diese Studie analysiert im peripheren Blut und Knochenmark von Melanompatienten die Subgruppen-Zusammensetzung und Funktion spezifischer T-Zellen die durch Immunisierung mit MHC-Klasse-I-bindenden Tyrosinase-Peptiden in Kombination mit den Adjuvantien Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) und Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) induziert wurden. Die meisten der Tyrosinase-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut hatten einen CD45RA+, CCR7+ Effektor-Phänotyp. Im Gegensatz dazu war im Knochenmark ein Großteil der Tyrosinase-spezifischen T-Zellen Memory-T-Zellen, mit sowohl CD45RA-/CCR7+ zentralen Memory- als auch CD45RA-/CCR7- Effektor-Memory-T-Zell-Phänotyp. Die Tyrosinase-spezifischen T-Zellen des Knochenmarkes waren funktionell mit Nachweis einer IFN γ -Produktion und proliferativem Potential. Diese Studie zeigt, dass Peptid-Vakzinierungen in der Lage sind eine funktionelle Memory-T-Zellantwort zu generieren, die durch zentrale Memory- und Effektor-Memory-Phänotypen, proliferatives Potential und Knochenmark-Tropismus charakterisiert ist.

3.2.3 Klinisches und immunologisches Ansprechen im Rahmen einer Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 (WT1)-Peptid-Vakzinierung mit GM-CSF und T-Helfer-Protein bei Patienten mit AML und MDS

(Keilholz U*, Letsch A*, Busse A, Asemissen AM, Hofmann WK, Uharek L, Blau IW, Mackensen A, Thiel E, Scheibenbogen C. Clinical and immunological outcome of WT1 Peptide Vaccination with GM-CSF and Helper Protein in Patients with AML and MDS, Blood. 2009; 113:6541-8. * geteilte Erstautorenschaft)

Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte die Immunogenität einer Wilms-Tumor-Gen-Produkt 1 (WT1) Peptid-Vakzinierung bei Patienten mit WT1-exprimierenden akuten myeloischen Leukämien (AML) und myelodysplastischen Syndromen (MDS) ohne kurative Therapieoptionen. Die Vakzinierung bestand aus einer 4-tägigen subkutanen Gabe von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierendem-Faktor (GM-CSF) und zusätzlich am dritten Tag 0,2mg WT1-126-134-Peptid und 1mg Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH). Die ersten 9 Patienten erhielten 4 Vakzinierungen zweiwöchentlich und dann weitere in monatlichen Abständen, die weiteren 10 Patienten wurden kontinuierlich in zweiwöchentlichen Abständen vakziniert. Siebzehn AML Patienten und zwei Patienten mit Refraktärer Anämie mit Blastenexzess (RAEB) erhielten im Median 11 Vakzinierungen. Die Behandlung wurde gut toleriert. Nach objektiven Kriterien konnten bei den AML Patienten 10 Krankheitsstabilisierungen (SD) erreicht werden, davon 4 SDs mit mehr als 50% Blastenreduktion und 2 mit einer hämatologischen Verbesserung. Vier weitere Patienten hatten einen klinischen Benefit nach initialer Progression, darunter eine komplette Remission, sowie 3 SDs. Die WT1-mRNA-Last im Knochenmark verringerte sich im Verlauf bei mehr als 35% der Patienten auf unter ein Drittel. Bei 8 von 18 Patienten kam es unter der Vakzinierung zu einem mindestens 2-fachen Anstieg der WT1-Tetramer+ T-Zellen im peripheren Blut und bei 8 von 17 Patienten im Knochenmark mit einer medianen Frequenz im Knochenmark von 0,18% vor Vakzinierung und 0,41% in Woche 18. Zusammenfassend zeigt diese WT1-Vakzinierungsstudie immunologische und molekulare Effizienz sowie präliminäre Hinweise für eine klinische Effizienz, die weitere klinische Studien rechtfertigen.

3.2.4 Die Induktion einer kompletten Remission bei einer Patientin mit AML im Rahmen einer WT1-Peptid-Vakzinierung war begleitet vom Auftreten eines prädominanten T-Zell-Klons im peripheren Blut und Knochenmark

(Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, Bauer S, Scheibenbogen C, Stather D, Thiel E, Keilholz U, Letsch A. Wilms' Tumor Protein 1 (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emerge of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow, J Immunotherapy, 2011;34:85-91)

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden die ersten Vakzinierungsstudien bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie durchgeführt. Epitop-spezifische T-Zellen konnten sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark nachgewiesen werden, bislang ist jedoch wenig über deren klonale Zusammensetzung bekannt. In dieser Studie wurde Material einer Patientin mit rezidivierender AML detailliert analysiert, die unter Vakzinierung mit einem WT1-Peptid eine 12 Monate anhaltende komplette Remission erreichte. Zur Identifikation der expandierten WT1-spezifischen T-Zell-Klone erfolgte eine Anreicherung mittels Tetramer-Assay und Nachweis intrazellulärer IFN γ -Sekretion. Diesem Anreicherungsschritt folgte eine quantitative reverse transcribed PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung aller T-Zell-Rezeptor (TCR) V β -Familien. Die V β -Familien in der angereicherten Fraktion wurden kloniert und sequenziert. Ein prädominanter Klon wurde mittels klonotypischer qRT-PCR sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark nachgewiesen. Die Quantifizierung und funktionelle Analyse der WT1-spezifischen T-Zellen erfolgte mittels Tetramer-Analysen und intrazellulärem IFN γ -Nachweis. Ein spezifischer prädominanter Klon wurde während der Phase der klinischen Remission gefunden. Die Klon-spezifische qRT-PCR zeigte einen Anstieg des Klons sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark nach 8 Vakzinierungen. Sechs Monate nach Erreichen der kompletten Remission sank das Transkriptionsniveau im Knochenmark ab. Zum Zeitpunkt des Rezidives kam es zu einem zweiten Anstieg des WT-1 spezifischen Klons im peripheren Blut, jedoch nicht im Knochenmark. Parallel dazu zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein Fehlen der WT1-spezifischen IFN γ -Produktion im peripheren Blut.

Insgesamt konnten damit zum ersten Mal Daten gezeigt werden, die eine Evolution und Kompartimentalisierung eines, durch eine Peptid-Vakzinierung induzierten T-Zell-Klons im peripheren Blut und Knochenmark eines AML-Patienten dokumentieren. Zum Zeitpunkt des Rezidives zeigte sich derselbe Klon spontan wieder im peripheren Blut, jedoch nicht im Knochenmark, als Hinweis auf eine eingeschränkte Funktionalität.

4 DISKUSSION

4.1 Spontane tumorspezifische T-Zell-Immunität

Noch vor einigen Jahren war nicht klar, ob spontane T-Zell-Immunität gegen Tumore und Tumorantigene im peripheren Blut von Krebspatienten existieren. Vor allem war wenig darüber bekannt, wie repräsentativ die zumeist nach vorheriger *in vitro* Stimulation mit Tumorzellen oder Tumorantigenen und in Anwesenheit von IL-2 generierten T-Zellen für die tumorspezifische Immunität *in vivo* waren. In unserer ersten Arbeit konnten wir bei einem unerwartet hohen Anteil an Melanompatienten mit fortgeschrittener Erkrankung CD8⁺ T-Zellen nachweisen, die gegen allogene und z.T. auch gegen autologe Tumorzelllinien reagierten [3.1.1]. Dies unterstrich die Hypothese, dass das Antigenrepertoire beim Melanom sehr viel größer zu sein schien als bislang bekannt. Trotz der relativ kleinen und heterogenen Gruppe an Patienten konnten Hinweise für interessante tumorimmunologische Phänomene gewonnen werden. Bei 5 Patienten konnten wir neben den allogenen Melanomzelllinien auch autologe Tumorzellen analysieren: Bei 3 dieser 5 Patienten zeigten sich ähnliche T-Zell-Frequenzen gegen die allogenen Linien wie gegen die autologe Tumorzelllinie. Ein Patient hatte jedoch nur T-Zellen gegen seine autologe Tumorzelllinie, als möglichen Hinweis der Erkennung eines individuellen tumorspezifischen Antigens. Ein weiterer Patient reagierte gegen alle 4 allogenen Linien, jedoch nicht gegen seine autologe Tumorzelllinie, als Hinweis für einen Verlust der Zielantigene oder die mangelnde Fähigkeit, diese zu präsentieren.

Bis heute ist unklar, ob spontan auftretende tumorspezifische T-Zellen in der Lage sind, autologe Tumorzellen *in vivo* zu zerstören. Aus unseren Analysen konnten wir aber indirekte Hinweise auf die Funktionalität der tumorspezifischen T-Zellen ableiten. Sie waren in der Lage, nach Kontakt mit den Melanomzelllinien direkt IFN γ freizusetzen, was als Eigenschaft von Memory- und Effektor-T-Zellen, nicht jedoch von naiven T-Zellen bekannt ist. Die phänotypische Analyse mittels CD45R0 und CD45RA charakterisierte die CD8⁺ T-Zellen zudem als Memory- und Effektor-T-Zellen.

Bei der Untersuchung von spontanen WT1- und Proteinase-3-spezifischen CD8+ T-Zellen bei Leukämiepatienten [3.1.3] erfolgte die parallele Analyse von IFN γ -freisetzenden T-Zellen mittels ELISPOT-Assay und ICC. Bei 5/15 und 3/15 Patienten konnten wir IFN γ -freisetzende T-Zellen in Reaktion auf WT1 oder Proteinase-3 direkt *ex vivo* nachweisen. Die Abwesenheit von IFN γ -produzierenden, antigenspezifischen T-Zellen bei gesunden Kontrollpersonen suggerierte eine durch die Leukämie induzierte spontane Immunität gegen die analysierten Antigene bei AML-Patienten. Unsere Daten korrelierten gut mit den Frequenzen WT1-spezifischer Antikörper bei AML-Patienten und Gesunden [95, 96, 237] sowie mit Proteinase-3-spezifischen T-Zellen bei CML-Patienten mit zytogenetischem Ansprechen [238]. Durch die Charakterisierung der T-Zellen als CD45RA+, CCR7-, IFN γ - und Granzym-B-produzierende Effektor-T-Zellen konnten wir auch in dieser Studie indirekte Hinweise für eine gegen die Leukämie gerichtete Zytotoxizität liefern. Ein direkter Nachweis der Zytotoxizität *in vitro* erfolgte jedoch nicht.

In unserer Analyse zeigten sich im ELISPOT-Assay um ein Vielfaches geringere Frequenzen antigenspezifischer, IFN γ -produzierender T-Zellen als mittels ICC. Dies liegt möglicherweise an der geringeren Sensitivität des ELISPOT-Assays, T-Zellen zu detektieren, die geringe Mengen IFN γ freisetzen. Interessanterweise zeigten nämlich WT1- und Proteinase-3-spezifische T-Zellen eine deutlich geringe mittlere Fluoreszenzintensität des IFN γ -Signals als influenzaspezifische T-Zellen, die in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe bei Gesunden in ähnlichen Frequenzen mittels ELISPOT und ICC detektiert wurden [239]. Die Weiterentwicklung sensitiver Assays zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen, insbesondere die Entwicklung der Multimer-Technologie, erlaubt eine Charakterisierung der T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor. Damit können auch anerge, funktionell nicht aktive antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen werden, deren Relevanz *in vivo* jedoch nicht vollständig klar ist [82, 107]. Dies erklärt möglicherweise auch die z.T. erheblichen Schwankungen im Hinblick auf den Nachweis

antigenspezifischer T-Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Detektionsmethoden. In unserer WT1-Vakzine-Studie konnten mittels Tetramer-Assay bei 4/19 und im ICC bei 2/19 AML-Patienten spontane WT1-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Die Frequenzen lagen zwischen 0,38% und 2,0% Tetramer+, CD3+, CD8+ T-Zellen und zwischen 0,06% und 0,2% IFN γ +, CD3+, CD8+ T-Zellen im ICC. Diese Daten zeigen eine gute Korrelation zum Nachweis spontaner WT1-spezifischer T-Zellen bei AML-Patienten in Vakzinierungsstudien anderer Arbeitsgruppen, die WT1-Tetramer-positive T-Zellen bei 0/9 [199], 0/2 [240], 0/3 [200] und 2/5 Patienten [201] nachweisen konnten. In der von Oka *et al.* publizierten Studie konnten bei 14 Patienten WT1-Tetramer+, CD8+ T-Zellen in Frequenzen zwischen 0,11% und 0,98% mit einem Mittelwert von 0,27% nachgewiesen werden und 7/14 Patienten zeigten Frequenzen > 0,3% Tetramer+, CD8+ T-Zellen [153]. Die Schwierigkeit bei der Analyse spontaner T-Zellen mittels Tetrameren oder Multimeren liegt in einer potentiell möglichen unspezifischen Bindung durch CD8+ T-Zellen, aber auch durch CD4-Helferzellen, B-Zellen oder - insbesondere bei AML-Patienten - durch Leukämienblasten [241]. Wir haben daher für unsere Analysen eine zusätzliche „Trash-Färbung“ etabliert, in der mittels CD4, CD13, CD19, CD33 und CD34 solche unspezifischen Bindungen minimiert werden sollten. Wünschenswert als Negativkontrolle wäre weiterhin der Vergleich mit einem Multimer, gegen das keine spezifischen T-Zellen zu erwarten sind. Da dies häufig aufgrund von Material-, Verfügbarkeits- oder Kostengründen nicht möglich ist, interpretierten wir, angesichts der Abwesenheit von WT1-spezifischen Antikörpern und zytokinproduzierenden T-Zellen bei Gesunden, die in geringen Frequenzen nachweisbaren Tetramer+ T-Zellen bei Gesunden als unspezifische Hintergrundreaktion. Basierend darauf werteten wir bei AML-Patienten nur spontane WT1-Tetramer+ T-Zellfrequenzen als positive Reaktion, die über einer Grenze von 0,3% CD8+T-Zellen lagen, definiert als Mittelwert (0,16%) und zweifache Standardabweichung (0,14%) der Tetramer+,CD8+ T-Zellen bei Gesunden. Damit haben wir möglicherweise einige geringe WT1-spezifische Tetramer+ T-Zellen bei AML-Patienten und Gesunden als falsch-negativ interpretiert. Allerdings konnten diese Daten kürzlich durch eine Studie am National Institute of Health (NIH) bestätigt werden, die bei 35 gesunden

Kontrollpersonen überwiegend keine WT1-Tetramer+, CD8+ T-Zellen und nur bei 4/35 Gesunden geringe Frequenzen von <0,15% Tetramer+, CD8+ T-Zellen detektierten konnten [242]. Im Kontrast dazu stehen Daten von Schmitt *et al.*, die mittels WT1-spezifischen Streptameren bei 40 Gesunden im Median eine Frequenz von 0,6% WT1-Streptamer+, CD3+, CD8+ T-Zellen mit einer Variationsbreite zwischen 0,11% und 1,6% detektieren konnten [243]. Mehr als die Hälfte der Gesunden zeigte Frequenzen über 0,5% und 1/5 der Gesunden sogar über 1% WT1-Streptamer+, CD3+, CD8+ T-Zellen. Bei AML-Patienten in Remission fanden sich Frequenzen zwischen 0,68% und 3,6% und bei Patienten mit Erstdiagnose oder Rezidiv zwischen 0,13% und 0,9% WT1-Streptamer+, CD3+, CD8+ T-Zellen. Ob mit diesen WT1-spezifischen Streptameren erstmals ein sensitiverer Nachweis spontaner, WT1-spezifischer T-Zellen gelingt oder ob es sich hier eher um eine unspezifische Reaktion handelt, kann angesichts der Limitation von jeweils nur 100.000 eingelesenen Zellen und von fehlenden Kontroll-Streptameren nur schwer beurteilt werden. Für eine, wenn auch in den Frequenzen möglicherweise geringere, spontane WT1-spezifische T-Zellimmunität bei Gesunden spricht allerdings die Tatsache, dass sich die WT1-Streptamer-positiven T-Zellen bis auf das 20-fache expandieren ließen. Allerdings fehlt in dieser Studie der funktionelle Nachweis einer WT1-spezifischer Zytotoxizität zur endgültigen Bestätigung. Die *in vitro* Expansion zytotoxischer, WT1-spezifischer T-Zellen konnte bei Tumorpatienten bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden [244-249]. Zusätzlich konnten Weber *et al.* 2009 erstmals die Expansion von WT1-spezifischen T-Zellen aus dem peripheren Blut von 9/10 Gesunden zeigen, die in der Lage waren WT1+ Tumorzelllinien zu lysieren, jedoch keine allogenen PBMC oder CD34+ periphere Stammzellen [105]. Neben diesen potentiell für adoptive Therapiestrategien nutzbaren Erkenntnissen war für die weitere Vakzinierungsentwicklung wichtig, dass sich weder bei Leukämiepatienten noch bei Gesunden Hinweise auf Autoimmunität im Zusammenhang mit der spontanen T-Zellantwort gegen WT1 oder Proteinase-3 zeigten.

Eine weitere Frage im Zusammenhang mit spontaner T-Zellimmunität bei Tumorpatienten ist, ob diese einen Einfluss auf den Tumorprogress haben. In unserer Studie beim Melanom hatten 4 von 11 Patienten mit tumorreaktiven T-Zellen Hinweise für eine immunologisch vermittelte Kontrolle des Tumorwachstums. Bei 6 Patienten dieser Gruppe waren progrediente metastasierende Tumoren nachweisbar, die auf eine Ineffektivität der tumorspezifischen T-Zellantwort oder Resistenzmechanismen der Tumoren hindeuten. Von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) ist bekannt, dass sie bei verschiedenen Tumorentitäten mit einer besseren Prognose assoziiert sind [siehe Einleitung]. Für die spontane tumorspezifische Immunität im peripheren Blut konnte bisher jedoch keine Korrelation mit einem klinischen Benefit gezeigt werden. Der Nachweis einer spontanen tumorspezifischen Immunität im peripheren Blut war bei einigen Tumoren wie Kolonkarzinom und Melanom mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert, was entweder auf eine längere Auseinandersetzung von Immunsystem und Tumor oder auf das Vorhandensein von Tumorzellen in bestimmten immunologisch relevanten Kompartimenten hindeutet [7]. Bei Leukämiepatienten konnten wir keine Assoziation zwischen spontanen T-Zellen und der Krankheitssituation oder dem Anteil an Leukämieblasten nachweisen. Zudem zeigte sich erstaunlicherweise auch keine Limitation der allgemeinen Immunität durch einen hohen Anteil an Leukämieblasten und keine verminderte Reaktivität gegen Influenzapeptide wie z.B. bei Patienten mit fortgeschrittenen Melanom oder Kolonkarzinom [100, 250].

Eine weitere, bisher nicht vollständig geklärte Frage ist, ob spontane, tumorantigenspezifische T-Zellen einen Einfluss auf die Effektivität von Vakzinierungen bei Krebspatienten haben. Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass der Nachweis von spontanen peripheren T-Zellen vor Vakzinierungsbeginn notwendig für eine effektive Vakzinierung ist [251, 252]. Andere Arbeitsgruppen und auch einzelne Daten unserer Vakzinierungsstudien zeigen dagegen, dass präexistente T-Zellen auch die Induzierbarkeit vakzinespezifischer T-Zellen vermindern können und diese T-Zellen möglicherweise eine reduzierte Anti-Tumor-Effektivität aufweisen [253].

In unserer WT1-Vakzinierungsstudie bei AML-Patienten konnten wir nur bei einem von 4 Patienten mit vor Vakzinierung nachweisbaren, spontanen WT1-spezifischen T-Zellen diese im Verlauf steigern. Bei den anderen 3 Patienten blieben die T-Zellfrequenzen gleich oder nahmen sogar ab. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der Existenz spontaner T-Zellen und dem Krankheitsverlauf. Ähnliche Daten konnten wir bei Melanompatienten nachweisen, wo eine Vakzinierung mit Tyrosinase-Peptid in Kombination mit GM-CSF und KLH nicht in der Lage war, präexistente T-Zellen zu steigern [254]. In beiden Vakzinierungsstudien zeigte sich allerdings bei Patienten mit präexistenten T-Zellen vereinzelt eine Zunahme oder Veränderung der funktionellen Charakteristika [eigene, bisher unveröffentlichte Daten]. Ob es sich dabei um eine Reaktivierung bereits vorhandener spezifischer Klone oder um eine *de novo* Induktion antigenspezifischer T-Zellen handelt, ist bisher jedoch nicht aufgeklärt.

Weiterhin stellt sich die Frage: Warum hat bei den Patienten mit manifesten Tumoren die Immunantwort versagt. Einige Autoren gehen davon aus, dass zumindest Melanompatienten in der Regel spontane T-Zellen gegen ihren Tumor entwickeln, diese tumorspezifischen T-Zellen jedoch bei vielen Patienten an einem bestimmten Punkt ineffektiv werden, entweder weil der Tumor nicht mehr sensitiv gegenüber den Effektorzellen ist, oder die Effektorzellen nicht mehr durch Tumorantigene stimuliert werden können oder anerg werden [107]. Diese Anergie resultiert am ehesten aus lokalen immunsuppressiven Mechanismen im Tumorgewebe [94]. Es wird immer offensichtlicher, dass ein wichtiger Faktor für Tumorwachstum das Ungleichgewicht zwischen regulatorischen Elementen und Tumormunität ist. Neben Resistenzmechanismen auf Seiten der Tumorzellen sind mögliche Vermittler dieses Ungleichgewichts zugunsten des Tumorwachstums regulatorische T-Zellen (Treg), die erstmals in den späten 60ziger Jahren von Nishizuka beschrieben [255] und von Sakaguchi 1995 als CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen charakterisiert wurden [256]. Inzwischen wurde die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 als Indikator für die suppressive Funktion von CD4⁺, CD25⁺ T-Zellen etabliert und es sind verschiedene Subtypen mit

unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen bekannt [257]. In steigender Zahl konnten Tregs im peripheren Blut, im Aszites, im Tumor und in tumordrainierenden Lymphknoten von Patienten mit soliden Tumoren nachgewiesen werden [19]. Die Akkumulation von Tregs korrelierte bei etlichen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose, insbesondere bei B-Zell-Lymphomen existieren jedoch auch Daten, die zeigten, dass eine Infiltration von FOXP3+ Zellen mit verbessertem Überleben assoziiert war [258]. Neue Erkenntnisse, dass FOXP3 sich auch auf Tumorzellen [259] und nach Stimulation vorübergehend auf nicht-suppressiven T-Zellen finden lässt [260], komplizieren jedoch die Interpretation der Daten im Zusammenhang mit dem Nachweis FOXP3+ Zellen. Neben Tregs finden sich noch weitere Zellpopulationen mit potentiell regulatorischen Eigenschaften wie z.B. Myeloid-derived-Suppressor-Cells (MDSC) oder Arginase-produzierende Granulozyten [261].

Der Großteil der Forschung hat sich auf die spontane T-Zell-Immunität konzentriert, aber es erfolgten nur wenige systematische Analysen bezüglich der spontanen humoralen Immunität bei Tumoren. Deren diagnostische, prognostische und ätiologische Relevanz ist bislang nicht vollständig geklärt. Humorale Immunität gegen eine Vielzahl von Tumorantigenen konnte aber bereits in variablen Frequenzen bei Tumorpatienten detektiert werden (Zusammenfassung in [262]). Antikörper gegen bestimmte Antigenfamilien scheinen von prognostischer Relevanz zu sein. Allerdings deuten viele Daten darauf hin, dass auch Autoantikörper in der Interaktion mit Tumorzellen verschiedene funktionelle Rollen spielen können und sowohl in der Lage sind, Tumorstadium zu hemmen, als auch in anderen Fällen von Tumorzellen instrumentalisiert zu werden, um der Immunkontrolle zu entgehen [34]. Die Analyse von WT1-Antikörpern von Elisseeva *et al.* zeigte bei 68% IgM-, bei 50% IgG- und bei 37,5% sowohl IgM- als auch IgG-WT1-Antikörper [237]. Ähnliche Frequenzen waren bei MDS-Patienten nachweisbar, wobei ein Isotyp-Switch von IgM zu IgG mit der Krankheitsprogression korreliert war [263]. Bei AML-Patienten im Kontext unserer Vakzinierungsstudie konnten wir spontane WT1-spezifische Antikörper bei 5 von 14 Patienten nachweisen,

wobei 2 Patienten IgM-Antikörper und 3 Patienten IgG-Antikörper aufwiesen [264].

4.2 Spontane und durch Vakzinierung induzierte T-Zellen im Knochenmark

Mit der unter 3.1.2 näher beschriebenen Studie führten wir als erste Arbeitsgruppe eine direkte funktionelle und phänotypische Analyse melanomspezifischer T-Zellen im Knochenmark von Melanompatienten durch [3.1.2]. Mit dem Nachweis ähnlicher oder höherer Frequenzen melanomantigenspezifischer T-Zellen im Knochenmark als im peripheren Blut und dem Nachweis einer Akkumulation von Memory-T-Zellen im Knochenmark konnten wir zeigen, dass das Knochenmark ein Kompartiment ist, in dem effektive Tumorüberwachung stattfinden kann. Unsere Daten deckten sich mit den Daten von Feuerer *et al.*, die bei Brustkrebspatientinnen zeigen konnten, dass tumorspezifische T-Zellen aus dem Knochenmark, aber nicht aus dem peripheren Blut expandiert werden konnten [116]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Schadendorf bei Melanompatienten zeigen, dass bei 6 von 21 Patienten im Stadium IV und 1 von 10 Patienten im Stadium III, jedoch bei keinem Patient im Stadium II tumorreaktive T-Zellen im Knochenmark nachweisbar waren. Dies weist auf eine Abhängigkeit des Nachweises tumorreaktiver T-Zellen im Knochenmark vom Tumorstadium, der Krankheitsdauer und der Tumorlast, jedoch unabhängig von den Vortherapien hin [109].

Wir konnten im Rahmen der Studie nicht klären, ob die melanomspezifischen T-Zellen im Knochenmark generiert worden waren, oder ob das Knochenmark ein Kompartiment ist, in das spezifische Memory-T-Zellen bevorzugt migrieren. Genauso wenig konnte die klinische Signifikanz in Korrelation mit Mikrometastasen bzw. klinisch manifesten Metastasen vollständig geklärt werden. Dennoch lieferte die Studie wichtige Informationen für weitere immuntherapeutische Konzepte: Erstens ergab sich daraus die Rationale für Vakzinierungsstrategien bei Patienten mit Nachweis

von Mikrometastasen im Knochenmark. Zweitens konnten wir aufzeigen, dass das alleinige Monitoring im peripheren Blut die tatsächliche Art und das Ausmaß von tumorspezifischen T-Zellen unterschätzt. Und drittens deutete der Nachweis von tumorreaktiven Memory-T-Zellen darauf hin, dass das Knochenmark ein potentiell wertvolles Kompartiment für adoptive T-Zelltherapien darstellt.

In den folgenden Arbeiten haben wir diese Punkte weiterverfolgt und erweitert. Im Kontext unserer Tyrosinasepeptid-Vakzinierungsstudie bei Melanompatienten konnten wir zeigen, dass der Großteil der durch die Vakzinierung induzierten T-Zellen im peripheren Blut ähnlich wie in anderen Studien [265, 266] einen Effektor-Phänotyp aufwies. Im Knochenmark dagegen war der Großteil der tyrosinasespezifischen T-Zellen vom Memory-Phänotyp mit Nachweis von Tem und Tcm, die in der Lage waren, $IFN\gamma$ zu produzieren und nach IL-2-Stimulation zu proliferieren. Dabei zeigte sich v.a. eine Anreicherung von Tcm und in Übereinstimmung mit diesen Daten konnten wir in einer erweiterten Analyse bei gesunden Kontrollpersonen CMV-spezifische Tcm auch nur im Knochenmark, jedoch nicht im peripheren Blut nachweisen [267]. Ähnliche Daten konnte Melenhorst *et al.* für leukämiespezifische T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation zeigen [268]. Proteinase-3- und WT1-spezifische T-Zellen waren ausschließlich im Knochenmark nachweisbar und zeichneten sich durch Anreicherung von Tcm und Verminderung der terminal-differenzierten Effektor-T-Zellen aus.

In weiteren Analysen konnten wir in unserer Arbeitsgruppe tyrosinase- und CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen [3.2.2],[267] und auch CD4⁺ CMV-spezifische T-Zellen in höheren Frequenzen aus dem Knochenmark als aus dem peripheren Blut expandieren [269]. Interessanterweise hatte ein höherer Anteil der aus dem Knochenmark expandierten, CMV-spezifischen, CD4⁺ T-Zellen auch einen sogenannten multifunktionalen Phänotyp, der sich durch simultane Produktion von $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 auszeichnet und in etlichen Studien mit einer höheren und länger anhaltenden protektiven Immunität

assoziiert war [269]. Das Knochenmark stellt somit eine enorme Ressource für die Expansion und Generierung von langlebigen Memory-T-Zellen für Vakzinierungstherapien sowie für adoptive Zelltherapien dar.

Unter bestimmten Bedingungen gelingt aber möglicherweise auch eine Expansion von T_{cm} aus dem peripheren Blut. So wurden kürzlich Daten von Schlegel *et al.* publiziert, die nach Stimulation mit peptidbeladenen IFN γ /Lipopolysaccharid-gereiften dendritischen Zellen und IL-21, IL-7 and IL-15 aus zuvor separierten, naiven CD8⁺ T-Zellen tumorreaktive, multifunktionale T-Zellen mit einem (CD62L(+), CCR7(+), CD28(+)) T_{cm}-ähnlichen Phänotyp generieren konnten [270]. Eine weitere Möglichkeit Memory-T-Zellen zu induzieren besteht u.U. auch in der Applikation von CTLA-4-Antikörpern, für die gezeigt werden konnte, dass eine vorübergehende Blockade von CTLA-4 CD8⁺ Memory-T-Zellen verstärken kann [271].

Bei hämatopoetischen Neoplasien spielt das Knochenmark sowohl als Reservoir der homeostatischen Proliferation von Memory-T-Zellen als auch als primäres Tumorkompartiment eine doppelte Rolle. Im Rahmen der WT1-Vakzinierungs-Studie bei AML-Patienten waren leukämiespezifische T-Zellen im Knochenmark in ähnlichen Frequenzen nachweisbar wie im peripheren Blut. Es zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg im Vergleich von Woche 18 zu Woche 0, der im peripheren Blut nicht nachweisbar war. Bei den meisten Patienten waren WT1-spezifische T-Zellen im Knochenmark jedoch erst in Woche 18 detektierbar und nicht schon in Woche 10 wie im peripheren Blut. Die genaue klonotypische Analyse der WT1-spezifischen T-Zell-Immunität im Kontext der Vakzinierungsstudie [3.2.4] konnte zeigen, dass der prädominante Klon bereits vor Vakzinierung in geringem Maße im Knochenmark nachweisbar war und sich unter Vakzinierung expandieren ließ. Zum Zeitpunkt des Rezidives war dieser Klon jedoch nicht mehr funktionell und nur im peripheren Blut und nicht im Knochenmark nachweisbar.

4.3 Immunologische Effektivität von Peptid-Vakzinierungen

Das primäre Studienziel der hier dargestellten Vakzinierungsstudien beim Melanom und bei Patienten mit Leukämie und MDS war die immunologische Effektivität. Da Patienten mit aktiver Tumorerkrankung eingeschlossen wurden und v.a. bei Leukämiepatienten nicht klar war, ob die Anwesenheit von AML-Blasten die Induzierbarkeit einer vakzinespezifischen Immunantwort limitieren würde, lag die primäre Zielsetzung der Studie zunächst auf der Induktion oder Verstärkung von vakzinespezifischen Tetramer+ T-Zellen bei mindestens 25% der Patienten in Woche 10 nach Beginn der Vakzinierung. Unter Berücksichtigung der iSBTc-Empfehlungen [203] erfolgte eine Analyse der vakzinespezifischen T-Zell-Immunität mit zwei verschiedenen Assays im peripheren Blut und bei Leukämie-Patienten zusätzlich im Knochenmark, dem eigentlichen Tumorkompartiment.

Bei Leukämiepatienten konnte nach WT1-Vakzinierung mittels Tetramer-Analyse und ICC eine gute Immunogenität, deutlich über 25% nachgewiesen werden. Die Zahl der Patienten mit positiver Immunantwort im Tetramer-Assay zum Zeitpunkt Woche 10 lag bei ca. 50% sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark [3.4.2]. Allerdings konnten wir keine Korrelation zwischen der Induktion spezifischer T-Zellen und einem Parameter für das klinische oder molekulare Ansprechen nachweisen. In Zusammenhang damit sind verschiedene Punkte von möglicher Relevanz: In unserer Studie hatten 4/19 Patienten bereits spontane WT-1-spezifische T-Zellen, die durch die Vakzinierung nicht gesteigert werden konnten. Bei 2 dieser Patienten und bei 3 weiteren Patienten konnten trotz Nachweis einer klinischen Effektivität keine WT1-spezifische T-Zellen im peripheren Blut oder Knochenmark nachgewiesen werden. Mit den eingesetzten Assays wird somit möglicherweise die Frequenz der induzierten T-Zellen unterschätzt. Unklar ist bislang, ob dies aus der Art der Immunantwort resultiert, die mit den zum Monitoring verwendeten Assays und in den analysierten Kompartimenten nicht detektiert werden kann, oder ob Interaktionen zwischen T-Zellen und

Blasten oder anderen regulatorischen Elementen des Immunsystems oder des Mikroenvironments der Leukämie, von Relevanz sind.

Da seit vielen Jahren bekannt ist, dass Leukämieblasten Lymphozytenzahlen und -funktionen beeinflussen können haben wir in unserer Studie Unterschiede zwischen Patienten mit niedriger und hoher Anzahl an Leukämieblasten im Knochenmark gesondert verglichen: In der Gruppe mit niedriger Blastenzahl im Knochenmark zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der WT1-Tetramer+ T-Zellen im peripheren Blut. Bei Patienten mit einem hohen Blastenanteil im peripheren Blut fand sich kein signifikanter Anstieg, was einen potentiell hemmenden Effekt einer hohen Leukämielast auf die Induzierbarkeit WT1-spezifischer T-Zellen nahelegt [3.4.1]. Passend dazu war die Frequenz der, durch die Vakzinierung induzierten, WT1-spezifischen T-Zellen bei Leukämiepatienten in der adjuvanten Situation mit 87% (n=9) nochmals höher als in der Gruppe mit geringem Blastenanteil [eigene, bisher unveröffentlichte Daten].

Diese Daten korrelieren gut mit zwei weiteren klinischen Vakzinierungsstudien mit HLA-Klasse-I-bindenden WT1-Peptiden bei AML-Patienten in kompletter Remission (CR), die in der Arbeitsgruppe von Sugiyama *et al.* in Osaka, Japan, sowie in der Arbeitsgruppe um Rezvani *et al.* in Houston, USA durchgeführt wurden [153, 199]. In der japanischen Arbeitsgruppe wurden 12 AML Patienten in kompletter Remission und 2 Patienten mit MDS vakziniert. Bei 9/13 Patienten konnten WT1-spezifische Tetramer+ T-Zellen im peripheren Blut induziert werden. Bei 5 von 14 Patienten resultierte die Vakzinierung zudem in einem Absinken der initial erhöhten WT1-mRNA-Werte im Sinne einer molekularen Antwort [153]. Die Arbeitsgruppe um Rezvani konnte durch eine einmalige Vakzinierung mit dem HLA-A2-bindendem WT1-Epitop 126-134 und Proteinase-3 Epitop 169-177 zusammen mit Montanide und GM-CSF bei 5/8 Patienten mit AML/MDS in CR vorübergehende WT1-spezifische-T-Zellen induzieren. Auch in dieser

Studie zeigte sich eine molekulare Antwort bei 3 von 6 Patienten, die allerdings ebenfalls nur vorübergehend war [199].

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser WT1-Peptid-Vakzinierungsstudien und unserer Studie konnten trotz unterschiedlicher Vakzinierungsprotokolle, Impfpeptide, Peptiddosierungen und Adjuvantien in allen Studien eine gewisse immunologische und molekulare Effektivität mit klinisch relevanter Aktivität nachgewiesen werden [153, 199], [3.2.3, Tabelle 1]. Dabei lag der Anteil der Patienten mit nachweisbarer Induktion einer WT1-spezifischen Immunität bei Patienten in CR mit 87%, 70%, und 62,5% höher als in unserer Studie mit 44% bei Patienten mit aktiver AML. Dies deutet auf eine inverse Korrelation zwischen Blastenanteil im Knochenmark und der Induzierbarkeit einer vakzinespezifischen T-Zell-Antwort hin. Weiterhin unterstreichen die Daten, dass Vakzinierungsansätze umso erfolgreicher zu sein scheinen, je geringer die Tumor- oder Leukämiebelastung ist. Damit erscheint die adjuvante Situation besonders attraktiv für Tumorkvakzinierungen. Insgesamt sind aber alle Studien eher als „Proof-of-principle“-Studien zu verstehen, die untermauern, dass WT1 ein immunogenes und klinisch relevantes Tumorantigen bei der Leukämie darstellt. Dennoch sind Verbesserungen sowohl an der klinischen Situation in der die Vakzinierung erfolgt, der Antigenpräsentation, den verwendeten Adjuvantien und einer möglichen Kombination mit anderen Therapiemodalitäten zur Effektivitätssteigerung unabdingbar.

Eine Nachfolgestudie von Rezvani *et al.* verdeutlicht, dass die Wahl der Adjuvantien erheblichen Einfluss auf die Charakteristika der induzierten vakzinespezifischen Immunantwort hat [272]. Die Arbeitsgruppe hatte zuvor gezeigt, dass eine einmalige Vakzinierung mit HLA-Klasse-I-bindenden Proteinase-3- und WT1-Peptiden gemeinsam mit Montanide und GM-CSF nur eine vorübergehende immunologische und molekulare Antwort induzieren konnte, die nach Beendigung der Vakzinierung nicht persistierte. Im Anschluss wurden Patienten mit myeloischen Erkrankungen sechsmal im

monatlichen Abstand mit dem oben genannten Vakzinierungsschema immunisiert. Die wiederholte Vakzinierung resultierte jedoch in einer Deletion von hochaffinen Proteinase-3- und WT1-spezifischen T-Zellen und nach sechs Immunisierungen war bei keinem der Patienten die initial induzierte spezifische T-Zell-Antwort mehr nachweisbar. Auch eine erneute Vakzinierung drei Monate später führte nur zu einer geringen Expansion niedrigaffiner WT1-spezifischer T-Zellen ohne Einfluss auf hochaffine WT1-spezifische T-Zellen. Im Gegensatz zu unserer Studie konnten die Autoren keine Proteinase-3- oder WT1-spezifischen T-Zellen im Knochenmark nachweisen. Weiterhin konnte keine molekulare Effektivität der Vakzinierung demonstriert werden und es kam zu keiner Reduktion der WT1-Expression im Knochenmark. Diese Daten untermauern, dass die alleinige Immunisierung mit HLA-Klasse-I-Epitopen in Kombination mit GM-CSF und Montanide und ohne spezifischen CD4-Stimulus möglicherweise nicht ausreicht, um lang anhaltende, hochaffine Memory-T-Zellen gegen Leukämieantigene zu induzieren. Zahlreiche weitere humane Vakzinierungsstudien und Mausmodelle [273-276] unterstützen diese Hypothese und es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen zwar entbehrlich sind für die primäre Expansion von CD8⁺ T-Zellen und deren Differenzierung in zytotoxische Effektorzellen, aber die sekundäre Expansion abhängig ist von CD4⁺ T-Helfer-Zellen [277].

Insgesamt können suboptimale wiederholte Vakzinierungen zur T-Zell-Erschöpfung oder Deletion führen und im Laufe der Zeit Toleranz induzieren, ähnlich der klonalen Erschöpfung hochaffiner T-Zellen, die während chronischen Virusinfektionen beobachtet wurde [278]. Molldrem *et al.* konnten dazu passend nachweisen, dass hochaffine Proteinase-3-spezifische, zytotoxische T-Zellen in Apoptose gehen, wenn sie mit hohen Mengen Peptidantigenen oder Proteinase-3-überexprimierenden Leukämiezellen in Kontakt kommen [279]. Weitere Hinweise auf die Entwicklung funktioneller Defizite von durch die Vakzinierung induzierten T-Zellen liefert die Studie von Walker *et al.*, die zeigen konnte, dass bei Melanompatienten in der adjuvanten Situation eine Wiederholung der

Vakzinierung mit gp-100-Peptid plus Montanide nicht zur verbesserten Funktionalität der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen führte, wie man sie normalerweise bei einer Memory-T-Zellentwicklung erwarten würde [280]. Slingluff *et al.* konnten zeigen, dass eine Multi-peptid-Vakzinierung mit inkomplettem Freund's Adjuvanz ein Th2-dominiertes Mikroenvironment schaffen kann, welches nach wiederholter Vakzinierung reversibel ist. Wiederholte Vakzinierungen scheinen aber auch zu einem Anstieg von FoxP3⁺ T-Zellen und Eosinophilen führen zu können [281].

Ähnliche Vorsicht beim Design effektiver Vakzinierungsstrategien gebieten die Daten von Kuball *et al.*, die zeigen, dass eine Vakzinierung bestehend aus WT1- und Proteinase-3-bindenden Klasse-I Epitopen zusammen mit dem pan-HLA-DR-T-Helfer-Zell-Epitop (PADRE), CpG7909 und Montanide bei 4 Patienten mit AML kein klinisches Ansprechen induzieren konnte [282]. Durch die Vakzinierung wurden weder präexistente noch naive WT1- oder Proteinase-3-spezifische CD8⁺ T-Zellen expandiert und die vorhandenen vakzinespezifischen CD8⁺ T-Zellen nahmen ab. PADRE-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden induziert, allerdings produzierten diese kein IL-2 und insgesamt nahmen CD4⁺ Tregs zu. Diese Daten lassen vermuten, obwohl es sich nur um eine sehr kleine Patientengruppe handelte, dass eine Vakzinierung mit leukämieassoziierten Antigenen auch einen negativen immunregulatorischen Effekt haben kann, wenn sie möglicherweise mit den falschen Adjuvantien kombiniert wird.

Ergänzend dazu sind Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bei Melanompatienten im Rahmen einer Tyrosinasepeptid-Vakzinierung interessant [283]. Vier Gruppen von Melanompatienten wurden mit einem HLA-Klasse-I-bindendem Tyrosinasepeptid entweder allein, in Kombination mit GM-CSF oder KLH oder gemeinsam mit beiden Adjuvantien immunisiert. In der Gruppe der Patienten, die mit Tyrosinasepeptiden, GM-CSF und KLH immunisiert wurden, fand sich mittels IFN γ -ELISPOT eine deutlich häufigere und frühere Induktion tyrosinasespezifischer, IFN γ -produzierender T-Zellen.

Dagegen wurde mit GM-CSF oder KLH allein keine Verbesserung bzw. eine leicht schlechtere Immunogenität der Tyrosinasepeptid-Vakzinierung erreicht als im Vergleich zur Peptidvakzinierung ohne Adjuvantien. Diese Daten werden von einer Vakzinierungsstudie beim Melanom bestätigt, die keine Verbesserung der Immunogenität der Multiepitop-Melanom-Vakzinierung durch GM-CSF als alleiniges Adjuvanz oder in Kombination mit IFN α -2b nachweisen konnte [232]. Der adjuvante Effekt von GM-CSF in Zusammenhang mit Vakzinierungsstudien ist demnach weiterhin schwer zu interpretieren. Bislang konnte gezeigt werden, dass es zur Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen und damit zu einer verbesserten Antigenpräsentation für T-Zellen führt [284]. Daneben ist GM-CSF in der Lage das Überleben von tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu verbessern und konnte entweder allein oder in Kombination mit IL-2, Rituximab oder Chemotherapie bei verschiedenen Tumoren bemerkenswerte klinische Effekte erzielen (Zusammenfassung in [285]). Kritisch für den adjuvanten Effekt scheinen aber sowohl höhere Dosen von GM-CSF, als auch die alleinige Kombination mit Klasse-I-Epitopen im Kontext von Vakzinierungsstudien [286, 287].

Insgesamt sollte eine effektive Peptidvakzinierung demnach idealerweise ein kombiniertes Produkt darstellen, welches von professionellen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen wird, einen Entzündungsreiz setzt, CD8⁺ T-Zellen und gleichzeitig CD4⁺ T-Zellen stimuliert [288].

Im letzten Jahr wurden zwei weitere WT1-Vakzinierungsstudien publiziert, die zum einen durch den Einsatz modifizierter, polyvalenter und längerer WT1-Epitope in Kombination mit Montanide und GM-CSF [200] und zum anderen durch die Verwendung von aus Monozyten generierten, WT1-mRNA-beladenen dendritischen Zellen [201] versuchten, die Immunogenität und Effektivität der Vakzinierung mit WT1 zu verbessern. In der Studie von Maslak *et al.* konnten bei AML-Patienten in CR mit Überexpression von WT1 bei einem Großteil der Patienten (7 von 9) WT1-spezifische CD4⁺ T-Zellen

und bei einem geringeren Teil der Patienten (3 von 9) auch WT1-spezifische CD8+ T-Zellen induziert werden [200]. Die dendritische-Zell-Vakzinierung mit WT1-mRNA zeigte bei 2 von 5 analysierten Patienten durch die Vakzinierung induzierte, WT1-spezifische, Tetramer+ T-Zellen gegen ein Klasse-I-Epitop, die mit dem klinischen Ansprechen korrelierten [201]. Interessanterweise handelte es sich dabei bei beiden Patienten um eine polyepitopspezifische T-Zellantwort gegen 2 bzw. 4 der getesteten Antigene. Zudem fand sich ein Anstieg von aktivierten NK-Zellen in Korrelation zum klinischen Verlauf. Das übrige Immunmonitoring zeigte - ohne Korrelation zum klinischen Verlauf - einen Anstieg des IL-2-Plasma-Levels, von HLA-DR+, CD4+ T-Zellen und nach vorheriger *in vitro* Stimulation mit IL-2 bei neun von neun Patienten vermehrt CD8+, WT1-spezifische, IFN γ + T-Zellen [201]. Diese Daten unterstreichen den Einfluss der unterschiedlichen Vakzinierungsschemata auf die Charakteristika der induzierten Immunantwort. Allerdings fällt es aufgrund der insgesamt kleinen und heterogenen Patientenkollektive bislang schwer, die Überlegenheit eines einzelnen WT1-Vakzinierungsansatzes zu identifizieren.

Basierend auf den ersten ermutigenden Daten bei Patienten mit Leukämien wurden mehrere WT1-Vakzinierungsstudien bei Patienten mit soliden Tumoren initiiert. Die japanischen Arbeitsgruppen konnten bei verschiedenen Karzinomen, darunter v.a. beim Glioblastom, Bronchial- und Nierenzellkarzinom ebenfalls klinisch relevante Aktivität zeigen [153, 289-291]. In unserer Arbeitsgruppe wurden bisher 18 Patienten mit WT1-überexprimierenden Tumoren, darunter 8 Ovarialkarzinome, 3 Pleuramesotheliome, 2 Schilddrüsenkarzinome und 5 weitere Karzinome mit dem WT1-Peptid immunisiert. Auch in dieser Gruppe mit z.T. vielfach vorbehandelten Tumoren zeigte sich bei etwa der Hälfte eine überraschend gute klinische Aktivität. Die Induktion von WT1-spezifischen T-Zellen gelang bei 70% der Patienten und war damit sogar höher als bei Patienten mit Leukämien [eigene, bisher unveröffentlichte Daten].

Eine ähnlich gute Immunogenität konnte mit der Tyrosinasepeptid-Vakzinierung erzielt werden, die mit GM-CSF und KLH als Adjuvantien bei Patienten mit metastasiertem Melanom in der adjuvanten Situation zwischen 1998 und 2004 in unserer Klinik durchgeführt wurde [3.4.1]. Trotz der geringen Anzahl der für die Publikation ausgewählten Patienten zeigte sich eine Assoziation zwischen der Induktion von tyrosinasespezifischen T-Zellen und dem klinischem Verlauf. Bei allen Patienten mit klinischem Ansprechen (n=4) konnten wir eine *de novo* Induktion funktioneller vakzinespezifischer T-Zellen nachweisen, was aber nur bei einem der 4 klinisch progredienten Patienten der Fall war. In vielen weiteren Studien konnte mit unterschiedlichen Protokollen die prinzipielle immunologische Effektivität von Peptidvakzinierungen beim Melanom gezeigt werden, aber nur bei einem Teil der Patienten gelang die Induktion klinisch relevanter Antitumor-T-Zellen [159, 232, 292]. Andere Studien konnten eine klinische Effektivität demonstrieren, jedoch ohne messbare T-Zell-Antwort.

Insgesamt konnte die detaillierte immunologische Analyse der meisten kleinen Phase-II-Studien, möglicherweise auch aufgrund der geringen Fallzahlen, keine Korrelation zum klinischen Ansprechen zeigen. Im Kontrast dazu wurden im Rahmen der großen Phase-III-Studien kaum immunologische Daten generiert, die eine statistisch verwertbare Aussage über eine potentiell relevante Immunantwort oder Resistenzmechanismen erlauben würden [293].

Insgesamt zeigen diese Daten weiterhin ein erhebliches Verbesserungspotential im Hinblick auf das Monitoring von Vakzinierungsstudien auf. Neben der Verfeinerung, Standardisierung und Validierung von Assays zur Detektion der durch Vakzinierung induzierten T-Zellen steht v.a. die Identifizierung anderer, potentiell besser geeigneter Surrogat-Marker zur Abschätzung der Vakzinierungseffizienz im Vordergrund. In den letzten Jahren ist bereits eine Vielzahl an Informationen verfügbar, die ein besseres Verständnis der Bedeutung einer spezifischen,

durch Vakzinierung induzierten Immunität ermöglichen (Zusammenfassung in [294]). Vielversprechende Ansätze bieten dabei möglicherweise Gen-Expressions-Analysen, Assays wie Protein-Mikroarrays oder das Luciferase-Immunpräzipitations-System zur Charakterisierung von Antikörper-Profilen und der humoralen Immunität. Daneben sind detaillierte phänotypische und funktionelle T-Zell-Analysen mittels Vielfarben-Durchflusszytometrie, neue durchflusszytometrisch-gestützte Assays zum Monitoring der Zell-vermittelten Zytotoxizität [216], durchflusszytometrische Analysen intrazellulärer Phosphorylierungswege, auch „Phosphflow“ genannt [295], sowie detaillierte Klonalitätsanalysen der durch Vakzinierung induzierten T-Zellen verfügbar. Alle diese Methoden sollten zu einer besseren und detaillierteren Analyse der einzelnen Komponenten der durch die Vakzinierung induzierten Immunantwort führen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei auch die Identifizierung und Spezifizierung von potentiellen Escape-Mechanismen [169], wie Anstieg von Zahl und Funktion regulatorischer Zellen, die Balance zwischen positiver und negativer Regulation der Antitumorantwort, CD28, CTLA-4, programmed death-1-Molekül (PD-1) und der dazugehörigen Liganten PD-L1 und PD-L2. Daneben sollten die Analysen v.a. auch das Tumormikroenvironment, verschiedene Kompartimente wie Lymphknoten, Knochenmark und Tumorlokalisationen sowie bestimmte genetische Gegebenheiten des einzelnen Tumors bzw. Patienten berücksichtigen. Die seit einigen Jahren laufenden koordinierten Anstrengungen der „Immuntherapie-Gesellschaften“ wie z.B. durch das Cancer Immunotherapy Consortium des Cancer Research Institutes [170] und der Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) sind insofern vielversprechende Ansätze [296].

Bei den genannten Fortschritten im Bezug auf die Charakterisierung der durch Immuntherapien induzierten Immunantwort bleibt die große Herausforderung aus der Masse der verfügbaren Informationen den Biomarker zu identifizieren, der das größte Potential hat, mit dem klinischen Ansprechen zu korrelieren [231]. Für den breiten Einsatz in der Praxis, v.a. auch im Rahmen von Multizenterstudien, sollte dieser idealerweise in

Körperflüssigkeiten (z.B. dem peripheren Blut) zu messen sein und quantitative und qualitative Aussagen über die Effizienz der Vakzinierung, den Wirkmechanismus und letztlich das Ansprechen auf die Behandlung ermöglichen. Beispiele dafür wären die Messung der Höhe der induzierten T-Zellen als Marker für die Vakzinierungseffektivität, potentiell Epitopspreading als Indikator eines im Tumor stattfindenden Cross-Primings nach Infiltration von durch die Vakzinierung induzierten T-Zellen und letztlich die Messung von Autoantikörpern als Indikatoren für Tumorzerstörung und ein Ansprechen des Tumors [231].

Dieser Ansatz wird durch eine kürzlich publizierte Arbeit der Gruppe um Pierre Coulie unterstrichen, die zeigt, dass die induzierten vakzinespezifischen T-Zellen möglicherweise gar nicht verantwortlich sind für den Antitumor-Effekt [297]. Bei einem Melanompatienten der in Folge einer MAGE-Vakzinierung geringe MAGE-spezifische T-Zellen und eine Regression seines Tumors zeigte, konnte mittels detaillierten TCR β -cDNA-Analysen ein Klon identifiziert werden, der sich gegen ein mutiertes tumorspezifisches Neoantigen richtete und HLA-A2-abhängig autologe Tumorzellen lysierte. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass durch Antigenpreading T-Zellen, die durch die Vakzinierung induziert wurden, weitere Immunantworten gegen tumorspezifische Antigene auslösen können, die dann entscheidend zur Tumorregression beitragen. Dies unterstreicht die Tumorregressions-Hypothese der Gruppe in Brüssel. Demnach finden sich in Tumormetastasen vor der Vakzinierung in der Regel hohe Frequenzen der durch immunsuppressive Mechanismen inaktiverter Antitumor-T-Zellen. Bei einigen Patienten migrieren vakzinespezifische T-Zellen in den Tumor, attackieren einige Tumorzellen und können so die Immunsuppression lokal umkehren („spark“-Hypothese). Dies resultiert in der Stimulation und Proliferation von zuvor inaktiven oder *de novo* induzierten Antitumor-T-Zellen. Die Tumorregression wiederum kann dann zu einer zweiten Stimulation der vakzinespezifischen-T-Zellantwort führen, die potentiell messbar wäre [94].

4.4 Klinische Effektivität von Peptidvakzinierungen

In der Vergangenheit konnten viele Vakzinierungsstudien beim metastasierten Melanom zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung eine hohe klinische Effektivität zu induzieren, relativ gering ist [298, 299]. Dies unterstreicht auch eine Metaanalyse, die kürzlich die Daten der Vakzinierungsstudien unterschiedlicher Tumorentitäten zwischen September 2007 und September 2009 zusammenfasste und sich bei 313 vakzinierten Melanopatienten, davon 58% im Stadium III oder IV, eine CR/Partielle Remission (PR)-Rate von 8.9% und Krankheitsstabilisierungen bei 11,8% der Patienten zeigten [300]. Adjuvante Situationen bzw. die Situation einer minimalen Tumoraktivität sind daher vielversprechender für den Einsatz von Vakzinierungstherapien. Oft bedarf es dann aber großer Kollektive bzw. langer Beobachtungszeiten, um einen klinischen Effekt abschätzen zu können. Wir haben uns in der unter 3.2.1 beschriebenen Studie daher die besondere Situation einer Gruppe von Melanopatienten zunutze gemacht, die im Vorfeld der Vakzinierungstherapie wiederholte rezidierbare Rezidive entwickelt hatten und deren klinischer Verlauf in einem kurzen Zeitintervall zu evaluieren war. Bei 4 von 9 Patienten war die Vakzinierung mit einer deutlichen Verlängerung des rezidivfreien Intervalls assoziiert, was eine klinische Effektivität der Vakzinierung suggerierte. Bei allen 4 Patienten war der gute klinische Verlauf auch mit der Induktion einer vakzinespezifischen Immunität assoziiert. Die detaillierte Analyse unserer Daten zeigte auch, dass eine Herausforderung an adjuvante Vakzinierungsansätze die Induktion tumorspezifischer T-Zellen darstellt, die in der Lage sein sollten, in alle Kompartimente des Organismus zu migrieren, die potentiell von Tumorzellen befallen werden können. Dies steht im Kontrast zu der Situation einer metastasierten Tumorerkrankung, wo die T-Zell-Migration ins Tumorgewebe durch vom Tumor sezernierte Botenstoffe induziert werden kann. Im Zusammenhang damit ist die Beobachtung in unserer Trypsinase-Vakzinierungsstudie von großem Interesse, dass 2 Melanopatienten mit langanhaltendem rezidivfreiem Intervall isolierte Dünndarmmetastasen entwickelten [3.2.1]. Isolierte, klinisch manifeste Dünndarmmetastasen sind

bei Melanompatienten sehr selten, allerdings treten sie gehäuft im Kontext einer multilokalen Tumormanifestation im fortgeschrittenen Stadium auf. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte die fehlende Migrationsfähigkeit tyrosinasespezifischer T-Zellen in den Dünndarm sein, die durch eine intradermale Vakzinierung induziert wurden. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits im Mausmodell gemacht werden, in dem transferierte Memory-T-Zellen ubiquitär nachweisbar waren, jedoch nicht im Dünndarm [126]. Die Hypothese der limitierten Migrationsfähigkeit von durch Vakzinierung induzierten T-Zellen als ein Resistenzmechanismus könnte auch das Phänomen erklären, dass bei einer Patientin in unserer Studie nach Initiierung der Vakzinierung, die zuvor häufigen mukosalen Rezidive gestoppt werden konnten, sich dann aber multiple neue Lymphknotenmetastasen entwickelten.

Insgesamt korrelieren unsere Daten mit anderen Phase-II-Studien in der adjuvanten Situation beim Melanom, die zum Teil auch klinische Effekte zeigen konnten (Zusammenfassung in [292, 301]). Allerdings blieb die Bestätigung dieser vielversprechenden „Proof-of-Principle“-Studien in großen randomisierten Phase-II- oder Phase-III-Studien bisher aus. Keine der getesteten Vakzinierungstherapien konnte bisher eine Verbesserung des Gesamtüberlebens oder des krankheitsfreien Überlebens zeigen (siehe 1.5). Einzelne retrospektive Subgruppenanalysen konnten jedoch Vorteile für einzelne Patientengruppen nachweisen, so dass zukünftige Studien gerechtfertigt sind und die Auswahl von sehr gut charakterisierten Patientengruppen potentielle Vorteile bringen könnte.

Beispielhaft für neue Entwicklungen im Bereich der Immuntherapien ist der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab. Phase-II-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom hatten teilweise objektives Ansprechen gezeigt, und der Großteil der Patienten hatte Krankheitsstabilisierungen [302]. In der Phase-III-Studie war es nun die erste Substanz überhaupt, die bei Patienten mit vorbehandelten Melanom das Gesamtüberleben verbessern konnte [293].

Die Monotherapie mit Ipilimumab zeigt konventionelle, aber auch neue Aktivitätsmuster und hat damit einen wichtigen Einfluss und Beispielcharakter für neue Paradigmen von Behandlungsstrategien und für das Erfassen des Klinischen Ansprechens im Rahmen von Immuntherapien. Insbesondere das spezielle Nebenwirkungsprofil erfordert neue Kenntnisse in der Handhabung und Therapie von Autoimmunphänomenen, gerade wenn Ipilimumab zukünftig standardisiert und außerhalb klinischer Studien eingesetzt wird [303]. In Kenntnis der vielversprechenden Daten mit CTLA-4-Antikörpern im Gegensatz zu bisherigen Vakzinierungsdaten beim Melanom, ist zu erwähnen, dass es Stimmen gibt, die postulieren, dass therapeutische Vakzinierungen beim Melanom insgesamt eine schlechtere Effektivität zeigen als z.B. bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen oder Nierenzellkarzinomen. Diese Tatsache könnte unter Umständen damit zusammenhängen, dass das Melanom als sehr immunogener Tumor gut in der Lage ist der endogenen Immunantwort zu entgehen und demzufolge eher auf Therapien anspricht, die auf immunregulatorische Signalwege zielen [300].

Möglicherweise zeigen Vakzinierungen eine höhere Effektivität bei hämatologischen Neoplasien als bei soliden Tumoren. Wir haben daher vor mehr als 10 Jahren mit der Etablierung von Vakzinierungstherapien bei Patienten mit AML und MDS begonnen. Die primäre Intention der hier dargestellten WT1-Vakzinierungsstudie bei Patienten mit AML und MDS war die immunologische Effektivität. Dennoch konnten wir in dieser Gruppe von Patienten mit aktiver AML erstaunliche und vielversprechende klinische Effekte nachweisen, mit einer modifizierten kompletten Remission (mCR), die zwölf Monate anhielt, und 14 Krankheitsstabilisierungen (SD), die zwischen 3 und 54+ Monaten anhielten. Der gute klinische Verlauf war mit molekularem Ansprechen im Sinne einer Verminderung des WT1-mRNA-Levels korreliert, was erneut die Bedeutung von WT1 als guten molekularen Marker für den Krankheitsverlauf und eine minimale Resterkrankung bei der AML unterstreicht [304]. Hinweise für eine klinische Effektivität konnten auch Phase-I/II-WT1-Vakzinierungsstudien anderer Arbeitsgruppen zeigen, wobei

zumeist Patienten in kompletter Remission (CR) eingeschlossen wurden, so dass ein direkter Vergleich schwierig ist. In der Studie von Oka *et al.* wurden 12 AML-Patienten in CR, 1 MDS-Patient mit Myelofibrose sowie 1 Patient mit sekundärer AML aus MDS mit 50% Blasten im Knochenmark behandelt. Bei 5 von 8 auswertbaren Patienten in CR zeigte sich ein molekulares Ansprechen und bei den anderen beiden Patienten kam es zu einer Reduktion der Blastenzahl im Knochenmark [153]. Auch Rezvani *et al.* konnten bei 2 MDS Patienten Krankheitsstabilisierungen induzieren und von den 5 AML-Patienten zeigten 3 eine anhaltende CR, während 2 progredient waren [199]. Klinisch konnte in der Studie von Maslak *et al.* bei 5 von 9 Patienten eine anhaltende CR mit 33+, 33+, 34+, 36+ und 41+ Monaten Dauer nachgewiesen werden. Allerdings fanden sich nur geringe Veränderungen im WT1-mRNA-Gehalt des Knochenmarkes, was angesichts der kurzen Nachbeobachtungszeit eine eindeutige Aussage über eine klinische Effektivität schwierig macht [200]. In der von van Tendeloo *et al.* durchgeführten Studie zeigten 5 von 10 Patienten ein klinisches Ansprechen mit 2 Patienten in partieller Remission, die nach Vakzinierung eine CR entwickelten und drei weiteren Patienten in CR, die ein molekulares Ansprechen in Form von Normalisierung der WT1-mRNA-Level zeigten [201].

Ähnliche Daten konnten auch Peptid-Vakzinierungen mit anderen Antigenen bei Patienten mit Leukämie zeigen: In der Studie von Mollidrem *et al.* bei 66 Patienten mit CML, AML und MDS, die mit einem Proteinase-3-Peptid in Dosen von 0,25-1,0mg, in Kombination mit Montanide und GM-CSF vakziniert wurden, konnten sowohl Krankheitsstabilisierungen als auch einige CRs beobachtet werden, die alle mit einer Immunantwort gegen Proteinase-3 assoziiert waren [202]. Auch die Daten von Schmitt *et al.* mit einer RHAMM-Peptid-Vakzinierung zeigten bei 4 von 9 Patienten die Induktion einer immunologischen Antwort und bei 3 von 9 Patienten mit Reduktion der Blastenzahl und verbesserten peripheren Blutwerten ein klinisches Ansprechen [68].

Die Daten der ersten Peptid-Vakzinierungsstudien bei Patienten mit AML sind insgesamt vielversprechend, allerdings sind die Studien zu klein und zu unterschiedlich, um aussagekräftige Schlussfolgerungen über die tatsächliche Wirksamkeit von Peptid-Vakzinierungen bei Patienten mit AML zu ziehen. Es ist aber denkbar, dass Leukämien im Gegensatz zu soliden Tumoren viel besser vom Immunsystem gefunden werden können und immunsuppressive Mechanismen eine geringere Rolle spielen. Als „Proof of principle“-Studien rechtfertigen sie die weitere Entwicklung in randomisierten Phase-II-Studien, deren Ziel der Effektivitätsnachweis sein sollte [305, 306]. Sollten auch diese positive Resultate zeigen, wäre dies die Basis für Phase-III-Studien in einem größeren Patientenkollektiv. Ein kritischer Punkt für die Evaluation der Effektivität ist sicher die Einschätzung des klinischen Ansprechens in den oft sehr heterogenen Patientenpopulationen von Leukämiepatienten. Eine möglichst homogene Patientenpopulation ist daher erstrebenswert, um klinische Aussagen zu erleichtern.

Sowohl in unserer Tyrosinasepeptide-Vakzinierungs-Studie bei Patienten mit metastasiertem Melanom [3.2.1] als auch in der WT1-Vakzinierungsstudie bei Patienten mit AML und MDS [3.2.3] konnten wir das Phänomen eines klinischen Ansprechens im Anschluss an eine frühe Progression beobachten: Bei 4/19 AML-Patienten in der WT1-Vakzinierungsstudie zeigte sich ein klinisches Ansprechen erst nach einer vorübergehenden Phase der initialen Progression, die wir nach Definition modifizierter Kriterien für ein klinisches Ansprechen als eine mCR und 3 mSD einordneten. Drei der vier Patienten waren vor Vakzinierungsbeginn unbehandelt und zeigten nur eine minimale Progression der Erkrankung. Zwei davon hatten eine *de-novo*-AML mit 50 und 80% Blasten und ein Patient entwickelte kurz nach Vakzinierungsbeginn eine Transformation seines MDS in eine AML. Die vierte Patientin [198] zeigte kurz nach Rezidiv-Chemotherapie und Erreichen einer zweiten PR eine rasche Progression nach 2 Vakzinierungen. Erstaunlicherweise kam es unter Fortsetzung der Vakzinierung nach 4 Zyklen zu einer CR der Leukämie. Gleiche Phänomene konnten wir auch im Rahmen der Tyrosinasepeptid-Vakzinierung bei Patienten mit metastasiertem Melanom beobachten, die im

Vorfeld der Vakzinierungstherapie wiederholt Rezidive entwickelt hatten. Nach Initiierung der Vakzinierung kam es bei einigen Patienten auch anfangs noch zu kutanen und/oder Lymphknoten-Metastasen, bevor sich länger andauernde Phasen der Rezidivfreiheit anschlossen. Weiterhin zeigten zwei der Melanompatienten mit gutem Ansprechen unter Vakzinierung spontane Rückbildungen, sowohl von kutanen als auch von Lymphknotenmetastasen [3.2.1].

In den letzten Jahren konnte auch in zahlreichen anderen Vakzinierungsstudien sowie mit CTLA-4-Antikörpern gezeigt werden, dass eine klinische Effektivität z.T. erst mit relativ langer Latenz einsetzt [170]. Dies ist am ehesten dadurch bedingt, dass eine bestimmte Zeit benötigt wird, um effektive T-Zellen zu induzieren und die Migration von aktivierten T-Zellen ins Tumorgewebe zu gewährleisten. Als Ausdruck dessen findet sich immer wieder das Phänomen, dass es trotz eines initialen Progresses der Erkrankung zu einem späteren klinischen Ansprechen auf die Vakzinierungstherapie kommt. Da die bislang etablierten Kriterien zur Evaluation klinischer Effektivität im Kontext von Tumortherapien in solchen Situationen nur wenig Hilfestellung und Standardisierung ermöglichen, kam es im Rahmen von diversen Workshops unter Federführung des „Cancer Immunotherapy (zuvor Vaccine) Consortiums“ und der „Society for Immunotherapy of Cancer“ (SITC zuvor iSBTc) zur Erarbeitung von modifizierten „immune-related response criteria“ (irRC) [158, 170]. Weitere prospektive Analysen dieser irRCs müssen nun die Anwendbarkeit dieser Kriterien in der Klinik zeigen und deren Eignung insbesondere im Hinblick auf ihre Assoziation mit bisher geltenden Kriterien für das Ansprechen von Tumoren.

4.5 Toxizität

Insgesamt wurden unsere Vakzinierungstherapien beim Melanom und bei der AML gut toleriert und es zeigten sich lediglich geringe lokale Nebenwirkungen an der Impfstelle am Oberschenkel oder Oberarm und leichte grippeähnliche

Symptome bei einem Teil der Patienten. In Einzelfällen kam es zu selbstlimitierenden, allergischen Hautexanthenen, Erythema-nodosum-ähnlichen Hauterscheinungen, intermittierend auftretenden Gelenkschmerzen und Reizhusten, als mögliche Hinweise auf eine geringe Autoimmunität.

Im Kontext von Vakzinierungsstudien und anderen Immuntherapien ist die Induktion von Autoimmunität wiederholt beschrieben. Vor allem beim Melanom konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass das Auftreten von Vitiligo einen unabhängigen, prognostisch günstigen Faktor bei Melanompatienten im Stadium III und IV darstellt [307]. Auch im Kontext von IL-2-Therapien beim Melanom schienen Patienten mit Induktion einer Schilddrüsendysfunktion oder einer Vitiligo unter IL-2 ein verbessertes Überleben zu haben [308]. Allerdings waren die Daten in dieser Studie, ebenso wie im Kontext von IFN α -Therapien, nicht mehr statistisch signifikant, wenn man den Effekt der Therapiedauer (guarantee-time bias) mit einrechnet [309]. Interessant war dennoch, dass etliche Patienten unter IFN α Autoantikörper entwickelten, was auf ein insgesamt möglicherweise unterschätztes Phänomen von Autoimmunität im Kontext von Immuntherapien hinweist.

Häufiger sind Autoimmunphänomene im Rahmen der Therapie mit CTLA-4-Antikörpern beobachtet worden. Diese nicht unerheblichen Nebenwirkungen, in Form von Autoimmunreaktionen oder sogenannten „immune-related-adverse-events“ (irAEs), erfordern in der Regel eine spezifische und konsequente Behandlung, z.T. über Jahre. Allerdings scheint das Auftreten von irAEs prognostisch günstig zu sein und sowohl Melanom- als auch Nierenzellkarzinompatienten mit einer Enterokolitis zeigten eine signifikant verbesserte Ansprechrate [161, 310]. Angesichts dieser Daten stellt sich im Hinblick auf effektive Immuntherapien beim Melanom die Frage, ob zukünftig Tumormunität von Autoimmunität zu trennen ist [309].

Im Kontext unserer WT1-Vakzinierungsstudie waren angesichts der Überexpression von WT1 auf CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen und bei der Nephritis potentielle hämatologische und renale Toxizitäten denkbar. Weder in unserer Studie, noch in den anderen bisher publizierten WT1-Vakzinierungsstudien bei Patienten mit hämatologischen und soliden Neoplasien zeigten sich jedoch Hinweise auf eine Nephrotoxizität. Die Studie von Oka *et al.* hatte bei einem Patienten mit hypoplastischem MDS und Myelofibrose und einem Patienten mit sekundärer AML aus MDS eine vorübergehende Hämatotoxizität gezeigt, die unter hochdosierten Steroiden reversibel war [153]. Des Weiteren trat bei einem von Yasukawa *et al.* publizierten AML-Patienten nach der 5. Vakzinierung eine Panzytopenie und Hypoplasie des Knochenmarkes auf, die Myeloblasten blieben jedoch konstant niedrig und der Patient war zum Zeitpunkt der Publikation seit 3 Jahren stabil [240]. In unserer und auch in keiner der weiteren Studien (siehe Tabelle 1) traten bei AML- oder MDS-Patienten weitere Hinweise für eine mit der Vakzinierung assoziierte Hämatotoxizität auf. In diesem Zusammenhang sind die Daten einer kürzlich in Blood publizierten Studie interessant, die MDS-Patienten mit Trisomie 8 untersuchten [242]. Von diesen Patienten war bereits bekannt, dass sie mit größerer Wahrscheinlichkeit auf eine immunsuppressive Therapie ansprechen und ein verändertes T-Zell-Rezeptor-V β -Profil mit klonaler Expansion von CD8+ T-Zellen haben, die *in vitro* Vorläuferzellen lysieren konnten [105, 311]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen bei Patienten mit Trisomie 8 im Vergleich zu denen von Gesunden eine deutliche Überexpression von WT1 zeigten [312]. Die Arbeitsgruppe konnte nun nachweisen, dass die Patienten mit Trisomie 8, die auf eine immunsuppressive Therapie ansprechen, im Anschluss der Therapie signifikant erhöhte WT1-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen aufwiesen. Diese hatten *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die Hämatopoese autologer Vorläuferzellen, so dass die Autoren WT1 eine mögliche Rolle als Trigger einer T-Zell-vermittelten Myelosuppression bei bestimmten MDS-Patienten zuschreiben. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind sicher weitere Daten notwendig, dennoch unterstreicht diese Studie, dass WT1-Vakzinierungstherapien bei Patienten mit MDS, insbesondere bei solchen mit

schweren Panzytopenien, nur mit großer Sorgfalt angewendet werden sollten. Mit diesem Vorbehalt einer potentiellen Hämatotoxizität waren die beschriebenen Peptid-Vakzinierungsstudien bei Patienten mit AML sicher und ohne signifikante Toxizitäten.

4.6 Optimierungsansätze und Ausblick

Nachdem immer mehr über die Interaktionen von Immunsystem und Krebs bekannt ist, erscheinen in Kenntnis des komplexen multifaktoriellen Charakters der Tumorummunologie am ehesten Kombinationstherapien geeignet, um eine effektive immunologische Tumorkontrolle zu induzieren.

Für optimale Vakzinierungsansätze sollten zukünftig Antigene basierend auf „idealen“ Charakteristika und dem Konsens internationaler Priorisierungsinitiativen ausgewählt werden [74]. Sie sollten idealerweise „tumorspezifisch“ sein und der zu Grunde liegenden Biologie des Tumor Rechnung tragen. Bislang waren die eingesetzten Impfstoffe im Wesentlichen auf HLA-Klasse-I-Epitope begrenzt. Ein breiteres Spektrum an Epitopen, die die häufigsten HLA-Moleküle einschließen und auch HLA-Klasse-II-Epitope beinhalten, würde nicht nur die Anwendbarkeit dieser Vakzinierungen bei einem größeren Patientenkollektiv ermöglichen, sondern ebenso CD4+ T-Helfer-Zellen rekrutieren, die CD8+ T-Zellen über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten könnten [185]. Alternativ sind Protein- oder DNA-Vakzinierungen denkbar und bereits in der Entwicklung, die ein größeres Spektrum oder auch die gesamte Sequenz des Antigens beinhalten. Der Einsatz von modifizierten Epitopen, die möglicherweise die Immungenität verbessern, bleibt weiter umstritten und inzwischen existieren auch vergleichende Studien, die keine Differenz zwischen der Vakzinierungseffizienz des Wildtyp- und des modifizierten Peptidepitops zeigen konnten [313]. Möglicherweise schützt die Verwendung von Multi-epitopvakzinierungen vor Antigenverlusten und umgeht Tumor-Escape-Mechanismen.

Die Kombination verschiedener Adjuvantien sollte die Immunogenität der eingesetzten Tumorantigene unterstützen [146, 147] und in der Lage sein, eine robuste Immunität zu induzieren. Vakzinierungen sollten entweder so platziert werden, dass sie der Entwicklung von suppressiven Immunmechanismen zuvorkommen, oder im Kontext von anderen Therapien angewendet werden, die die Tumorlast und die damit einhergehenden immunsuppressiven Mechanismen reduzieren und die Balance zugunsten der tumorgerichteten Immunität verschieben [314]. Zu diesem Zweck sind spezifische Antagonisten wie CTLA-4-Antikörper, Antikörper gegen PD1, CD40 und CD25, aber auch die Kombination mit Strahlentherapie und Chemotherapeutika vielversprechend.

Für diverse Chemotherapeutika konnten immunmodulierende Effekte gezeigt werden (Zusammenfassung in [172]). Anthrazykline und Gemcitabine führen z.B. zu verbesserter Expression von Tumorantigenen nach Destruktion von Tumorzellen durch Apoptose und damit zu einer besseren Stimulation von CD8+ T-Zellen [315, 316]. Nach Fludarabin kommt es zur Lymphodepletion und damit einhergehendem Anstieg von IL-7 und IL-15 im Plasma [317]. Darüber hinaus führen bestimmte Chemotherapeutika zur Elimination von regulatorischen Zellen. In diesem Zusammenhang sind zwei Studien interessant, die bei Bronchialkarzinom- und Lymphompatienten zeigen konnten, dass zuvor vakzinierter und unter der Vakzinierung progrediente Patienten signifikant besser auf eine anschließende Chemotherapie ansprachen, als Patienten ohne vorherige Vakzinierungstherapie (Zusammenfassung in [318]). Auch im Rahmen von Chemotherapien kann es zur Resistenz kommen und es konnte gezeigt werden, dass mit Chemoresistenz assoziierte Proteine Zielstrukturen für T-Zellen darstellen können und für einen potentiellen Effekt von Kombinationstherapien sprechen [172].

Vielversprechend ist womöglich auch die Kombination mit allogener Stammzelltransplantation, da die direkt im Anschluss an die Transplantation vorherrschende Lymphopenie mit hohen Spiegeln an IL-12 und IL-15 für eine

effektive T-Zell-Expansion günstig ist [319-321]. Insbesondere die Kombination von Lymphopenie, im Kontext von allogenen Stammzelltransplantationen, Vakzinierungstherapien und adoptivem Transfer erscheinen ideal um eine langanhaltende Memory-Antwort zu induzieren [322].

Daneben sind adjuvante Effekte neuerer Substanzen der Tumorthherapie wie die gesteigerte Antigenexpression durch 5-Azazytidine [323], immunmodulatorische Effekte bestimmter Tyrosin-Kinase-Inhibitoren oder der immunmodulatorischen Medikamente (iMiDs), wie z.B. Lenalidomid, attraktiv für die Kombinationstherapie. Beim Melanom könnten die neu entwickelten BRAF-Kinase-Inhibitoren potentielle Kombinationspartner für immuntherapeutische Strategien sein und kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch hohe Dosen keine negativen Effekte auf Lymphozytenüberleben und -funktion haben [324].

Insgesamt wäre es erstrebenswert, spezifische Patienten, Tumorentitäten und Krankheitssituationen besser identifizieren zu können, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein verbessertes Ansprechen auf Immuntherapien zeigen. Dies würde womöglich sowohl die Entwicklung neuer Immuntherapien beschleunigen, existierende Therapien optimieren als auch die Patientenselektion für bestimmte Interventionen verbessern [231]. Alleinige Vakzinierungsansätze scheinen insgesamt jedoch eher für Tumorpatienten in der adjuvanten bzw. prophylaktischen Situation geeignet zu sein. Für Patienten mit aktiver Tumorerkrankung sollten adoptive Therapieansätze, insbesondere auch in Kombination mit Vakzinierungen, sowie Kombinationstherapien aus Vakzinierungen mit verschiedenen, potentiell immunmodulatorischen Therapiemodalitäten favorisiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem besitzt die einzigartige Fähigkeit Tumorzellen gezielt zu erkennen und zu zerstören, ohne gleichzeitig normale Körperzellen zu schädigen. Vakzinierungstherapien mit dem Ziel der Induktion einer tumorspezifischen Immunität stellen daher einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention und möglicherweise auch zur Behandlung von Tumoren dar.

Im Vorfeld der Entwicklung therapeutischer Vakzinierungen lag der primäre Fokus der hier vorliegenden Arbeit zunächst auf der Evaluation von T-Zellen mit spontaner Reaktivität gegen Tumorzellen und definierte Tumorantigene. Spontane T-Zellen gegen melanomassoziierte Antigene konnten regelmäßig im peripheren Blut von Melanompatienten nachgewiesen werden. Um ein breiteres Spektrum potentieller Tumorantigene zu evaluieren, etablierten wir einen neuen ELISPOT-Assay und untersuchten das Spektrum der spontanen T-Zell-Antwort gegen HLA-gematchte allogene und autologe Tumorzelllinien im peripheren Blut von Patienten mit metastasiertem Melanom. Bei mehr als der Hälfte der Patienten konnten wir IFN γ -freisetzende T-Zellen nach Stimulation mit den allogenen Tumorzelllinien nachweisen. Dabei handelte es sich sowohl um Effektor-, als auch um Memory-CD8⁺ T-Zellen, die eine HLA-Klasse-I-abhängige T-Zellantwort gegen allogene Tumorzelllinien und bei 4 von 5 Patienten auch gegen autologe Tumorzellen zeigten. Einige der Patienten mit tumorreaktiven T-Zellen zeigten klinische Hinweise für eine möglicherweise immunologisch vermittelte, partielle Tumorkontrolle. Andere hatten progredient wachsende Tumoren, als indirekten Hinweis auf relevante Tumor-Escape-Mechanismen.

Diese Beobachtung unterstreicht, dass eine effektive T-Zellimmunität und Tumorüberwachung möglicherweise abhängig ist von der Anwesenheit spezifischer T-Zellen in den Geweben, die von Tumorzellen infiltriert werden. Wir untersuchten daher im Folgenden das Knochenmark als ein Kompartiment, in dem häufig mikrometastatische Tumorzellen vorhanden sind. Nach Stimulation mit dem melanomassoziierten Antigen Tyrosinase und autologen Tumorzellen konnten bei Melanompatienten tyrosinase- und

melanomspezifische CD3+, CD8+ T-Zellen im Knochenmark in gleichen oder höheren Frequenzen nachgewiesen werden als im peripheren Blut. Auch hier fanden sich wieder spezifische Effektor- und Memory-T-Zellen, wobei die Frequenzen tyrosinase- und melanomspezifischer Memory-T-Zellen im Knochenmark signifikant höher waren als im peripheren Blut.

Im Anschluss an diese grundlegenden Analysen erfolgte die Durchführung einer Pilotstudie einer Tyrosinasepeptid-Vakzinierung bei Patienten mit metastasiertem Melanom in der adjuvanten Situation. Um ein erstes Verständnis der Effektivität einer Peptid-Vakzinierung bei Melanompatienten in einer adjuvanten Krankheitssituation zu erlangen, wurden aus den bisherigen, in unserer Klinik durchgeführten, adjuvanten Peptid-Vakzinierungsstudien alle Melanompatienten identifiziert, die in dem Jahr vor Einschluss in die Vakzinierungsstudie mindestens 3 komplett rezidierte Metastasen hatten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Peptid-Vakzinierung bei 4 von 9 Patienten mit einem Sistieren der zuvor wiederholt aufgetretenen Rezidive assoziiert war und dass bei allen 4 Patienten durch die Vakzinierung induzierte T-Zellen *ex vivo* nachzuweisen waren.

In einer weiteren Arbeit wurden diese, durch die Tyrosinase-Peptid-Vakzinierung in Kombination mit GM-CSF und KLH induzierten T-Zellen sowohl im peripheren Blut, als auch im Knochenmark weiter charakterisiert. Wir konnten nachweisen, dass eine Peptid-Vakzinierung mit einem CD8-Epitop und den Adjuvantien GM-CSF und KLH in der Lage ist, eine funktionelle Memory-T-Zellantwort zu generieren, die durch zentrale Memory- und Effektor-Memory-Phänotypen, proliferatives Potential und Knochenmarktropismus charakterisiert ist. Dies steht im Kontrast zu mehreren anderen Vakzinierungsstudien mit HLA-Klasse-I-bindenden Epitopen, die nicht in der Lage waren, zentrale Memory-T-Zellen als Garanten einer langanhaltenden Immunität zu induzieren. Wir vermuten, dass die von uns gewählte Adjuvantienkombination für diese Ergebnisse verantwortlich ist.

Der zweite Teil der Arbeit fokussierte auf die Etablierung einer WT1-Peptid-Vakzinierung bei Patienten mit AML und MDS. Als wichtige Vorarbeit konnten wir bei Patienten mit Leukämien erstmals spontane T-Zellen gegen die leukämieassoziierten Antigene Proteinase-3 und WT1 mittels IFN γ -ELISPOT-Assay und durchflusszytometrisch mittels intrazellulärer IFN γ -Sekretion nachweisen. Die Daten deuteten auf eine gute Immunogenität von WT1 und Proteinase-3 bei Patienten mit AML hin und unterstreichen das Potential dieser Antigene für Vakzinierungen bei Leukämien. Gleichzeitig zeigte sich weder bei Leukämiepatienten, noch bei gesunden Kontrollpersonen ein Hinweis auf WT1- oder Proteinase-3-vermittelte, klinisch relevante Autoimmunität.

Aufbauend auf diesen Daten wurde in Anlehnung an das erfolgreiche Vakzinierungsprotokoll beim Melanom eine WT1-Peptid-Vakzinierungsstudie mit GM-CSF und KLH als Adjuvantien bei Patienten mit AML und MDS initiiert. Zunächst war völlig unklar, ob die Vakzinierung mit einem einzelnen Peptid bei Patienten mit akuter Leukämie nach Chemotherapie überhaupt immunologische Effizienz haben kann. Überraschend zeigte sich dann aber einerseits eine immunologische Reaktivität, die mit der bei nicht vorbehandelten Melanompatienten vergleichbar war, und andererseits eine überraschende klinische Aktivität, die weitere Untersuchungen rechtfertigt. Inzwischen konnten unsere Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden und bilden die Grundlage für kommerzielle Vakzinierungsstudien mit einem trunkierten WT1-Protein bei Leukämiepatienten.

Essentiell für die Weiterentwicklung von Vakzinierungsstudien ist nun neben der detaillierten immunologischen, molekularen und klinischen Analyse, insbesondere auch die Identifizierung von Immunresistenzmechanismen der Tumorzellen unter dem Druck einer durch Vakzinierungen induzierten Immunantwort. In diesem Zusammenhang konnte in einer, nicht in dieser Arbeit enthaltenen Analyse unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Defekte der Antigenpräsentation, die entweder durch WT1-Verlust bzw. WT1-Mutationen oder Herunterregulation von HLA-Molekülen bedingt sind, für Immunescape im Rahmen der WT1-Vakzinierung eine untergeordnete Rolle

spielen [325]. Eine weitere Arbeit untersuchte bei einer Patientin mit rezidivierender AML, die unter der Vakzinierung eine 12 Monate anhaltende komplette Remission erreichte, die klonale Komposition der durch die Vakzinierung induzierten T-Zellen. Wir konnten damit erstmals eine Evolution und Kompartimentalisierung eines durch eine Peptid-Vakzinierung induzierten T-Zell-Klons im peripheren Blut und Knochenmark eines AML-Patienten dokumentieren. Zum Zeitpunkt des Rezidives zeigte sich derselbe Klon wieder im peripheren Blut, jedoch nicht im Knochenmark, als Hinweis auf eine eingeschränkte Funktionalität.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit wichtige immunologische Grundlagenanalysen bezüglich der spontanen und durch Vakzinierung induzierten T-Zell-Immunität bei Melanom- und Leukämiepatienten liefern. Insbesondere konnten wir das Knochenmark als wichtiges immunologisches Organ identifizieren, welches hohe Frequenzen an Memory-T-Zellen beherbergt und eine potentiell wertvolle Ressource für die Generierung von spezifischen Memory-T-Zellen für Vakzinierungen und adoptive Therapiestrategien darstellt. Die Demonstration von immunologischer und klinischer Effizienz der Peptid-Vakzinierungen in Kombination mit GM-CSF und KLH sowohl bei Melanom- als auch bei Leukämiepatienten ist eine wichtige Grundlage für die effektive Weiterentwicklung von Vakzinierungsansätzen. In diesem Zusammenhang ist in Zukunft die weitergehende und konsequente Identifizierung klinisch relevanter Resistenzmechanismen von zentraler Bedeutung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie, 1909: 117-164.
2. Burnet, F.M., *Biological approach to carcinogenesis*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1959. 15(1): 31-4.
3. Thomas, *Cellular and humoral Aspects of the Hypersensitive States*. Edited by Lawrence HS, Hoeper-Harper, 1959.
4. Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D., *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. 21(2): 137-48.
5. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. 410(6832): 1107-11.
6. Pardoll, D., *Does the immune system see tumors as foreign or self?* Annu Rev Immunol, 2003. 21: 807-39.
7. Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola, F.M., Letsch, A., and Keilholz, U., *Natural T cell immunity against cancer*, in *Clin Cancer Res*2003. p. 4296-303.
8. Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L., and et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. Int J Cancer, 1995. 60(2): 183-9.
9. Penn, I., *Malignant melanoma in organ allograft recipients*. Transplantation, 1996. 61(2): 274-8.
10. Roithmaier, S., Haydon, A.M., Loi, S., Esmore, D., Griffiths, A., Bergin, P., Williams, T.J., and Schwarz, M.A., *Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience*. J Heart Lung Transplant, 2007. 26(8): 845-9.
11. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet, 2000. 356(9244): 1795-9.
12. Ladanyi, A., Kiss, J., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Mohos, A., Gaudi, I., and Timar, J., *Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor*. Cancer Immunol Immunother, 2007. 56(9): 1459-69.
13. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. 58(16): 3491-4.
14. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Pages, F., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. 313(5795): 1960-4.
15. Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and Ohtani, H., *Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity*. Cancer Res, 2001. 61(13): 5132-6.
16. Kohrt, H.E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., and Lee, P.P., *Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer*. PLoS Med, 2005. 2(9): e284.
17. Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C., and Schlag, P.M., *Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas*. Cancer Res, 2001. 61(10): 3932-6.
18. Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., and Coukos, G., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. 348(3): 203-13.
19. Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Krczyk, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L.,

- and Zou, W., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med*, 2004. 10(9): 942-9.
20. MacKie, R.M., Reid, R., and Junor, B., *Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery*. *N Engl J Med*, 2003. 348(6): 567-8.
 21. Balkwill, F. and Mantovani, A., *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. 357(9255): 539-45.
 22. Coussens, L.M. and Werb, Z., *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. 420(6917): 860-7.
 23. Philip, M., Rowley, D.A., and Schreiber, H., *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. *Semin Cancer Biol*, 2004. 14(6): 433-9.
 24. Blankenstein, T., *Do autochthonous tumors interfere with effector T cell responses?* *Semin Cancer Biol*, 2007. 17(4): 267-74.
 25. Blankenstein, T., *The role of inflammation in tumour growth and tumour suppression*. *Novartis Found Symp*, 2004. 256: 205-10; discussion 210-4, 259-69.
 26. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): 991-8.
 27. Yu, P., Rowley, D.A., Fu, Y.X., and Schreiber, H., *The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors*. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(2): 226-31.
 28. Gajewski, T.F., *Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(18 Pt 1): 5256-61.
 29. Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., and Castelli, C., *Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials*. *J Immunol*, 2007. 178(4): 1975-9.
 30. Stevanovic, S., *Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(7): 514-20.
 31. Ohnmacht, G.A. and Marincola, F.M., *Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma*. *J Cell Physiol*, 2000. 182(3): 332-8.
 32. Wang, R.F. and Rosenberg, S.A., *Human tumor antigens for cancer vaccine development*. *Immunol Rev*, 1999. 170: 85-100.
 33. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M., *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(25): 11810-3.
 34. Kobold, S., Lutkens, T., Cao, Y., Bokemeyer, C., and Atanackovic, D., *Autoantibodies against tumor-related antigens: incidence and biologic significance*. *Hum Immunol*, 2010. 71(7): 643-51.
 35. Boon, T., *Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens*. *Adv Cancer Res*, 1992. 58: 177-210.
 36. Boon, T., Gajewski, T.F., and Coulie, P.G., *From defined human tumor antigens to effective immunization?* *Immunol Today*, 1995. 16(7): 334-6.
 37. Rauch, J. and Gires, O., *SEREX, Proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification*. *Proteomics Clin Appl*, 2008. 2(3): 355-71.
 38. Boon, T. and Old, L.J., *Cancer Tumor antigens*. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(5): 681-3.
 39. Nussbaum, A.K., Kuttler, C., Haderer, K.P., Rammensee, H.G., and Schild, H., *PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW*. *Immunogenetics*, 2001. 53(2): 87-94.
 40. Boon, T. and van der Bruggen, P., *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. 183(3): 725-9.
 41. Lucas, S., De Plaen, E., and Boon, T., *MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression*. *Int J Cancer*, 2000. 87(1): 55-60.
 42. Aarnoudse, C.A., van den Doel, P.B., Heemskerk, B., and Schrier, P.I., *Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1*. *Int J Cancer*, 1999. 82(3): 442-8.

43. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. 254(5038): 1643-7.
44. Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., and Boon, T., *A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *J Exp Med*, 1995. 182(3): 689-98.
45. Castelli, C., Rivoltini, L., Andreola, G., Carrabba, M., Renkvist, N., and Parmiani, G., *T-cell recognition of melanoma-associated antigens*. *J Cell Physiol*, 2000. 182(3): 323-31.
46. Coulie, P.G. and Van Pel, A., *Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors*. *Curr Opin Oncol*, 1993. 5(6): 1043-8.
47. Coulie, P.G., *Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines?* *Mol Med Today*, 1997. 3(6): 261-8.
48. Stevenson, B.J., Iseli, C., Panji, S., Zahn-Zabal, M., Hide, W., Old, L.J., Simpson, A.J., and Jongeneel, C.V., *Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome*. *BMC Genomics*, 2007. 8: 129.
49. Kawakami, Y., *Immunotherapy using T cell defined tumor antigens for melanoma*. *Microbiol Immunol*, 1998. 42(12): 801-13.
50. Robbins, P.F. and Kawakami, Y., *Human tumor antigens recognized by T cells*. *Curr Opin Immunol*, 1996. 8(5): 628-36.
51. Boon, T., Coulie, P.G., and Van den Eynde, B., *Tumor antigens recognized by T cells*. *Immunol Today*, 1997. 18(6): 267-8.
52. Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P., *T cell defined tumor antigens*. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(5): 684-93.
53. Lamerz, R., *AFP isoforms and their clinical significance (overview)*. *Anticancer Res*, 1997. 17(4B): 2927-30.
54. Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B., and et al., *Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer*. *Cancer Res*, 1994. 54(1): 16-20.
55. Keilholz, U., Menssen, H.D., Gaiger, A., Menke, A., Oji, Y., Oka, Y., Scheibenbogen, C., Stauss, H., Thiel, E., and Sugiyama, H., *Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia*. *Leukemia*, 2005. 19(8): 1318-23.
56. Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L., and Pawlita, M., *Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 1998. 36(2): 475-80.
57. Murray, R.J., Kurilla, M.G., Brooks, J.M., Thomas, W.A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A.B., *Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies*. *J Exp Med*, 1992. 176(1): 157-68.
58. Depil, S., Roche, C., Dussart, P., and Prin, L., *Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients*. *Leukemia*, 2002. 16(2): 254-9.
59. Gentilini, P., Laffi, G., La Villa, G., Romanelli, R.G., Buzzelli, G., Casini-Raggi, V., Melani, L., Mazzanti, R., Riccardi, D., Pinzani, M., and Zignego, A.L., *Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver*. *Am J Gastroenterol*, 1997. 92(1): 66-72.
60. Hogdall, E.V., Hogdall, C.K., Blaakaer, J., Heegaard, N.H., Glud, E., Christensen, L., Bock, J.E., Norgaard-Pedersen, B., Wiik, A., and Kjaer, S.K., *P53 autoantibodies in sera from Danish ovarian cancer patients and their correlation with clinical data and prognosis*. *APMIS*, 2002. 110(7-8): 545-53.
61. Ramirez, J.L., Sarries, C., de Castro, P.L., Roig, B., Queralt, C., Escuin, D., de Aguirre, I., Sanchez, J.M., Manzano, J.L., Margeli, M., Sanchez, J.J., Astudillo, J., Taron, M., and Rosell, R., *Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients*. *Cancer Lett*, 2003. 193(2): 207-16.
62. Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renaud, J.C., Van Cangh, P.J., Boon, T., and Van den Eynde, B.J., *An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma*. *J Immunol*, 1998. 160(12): 6188-94.

63. Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., De Plaen, E., Szikora, J.P., Janssens, C., Reddehase, M.J., Lejeune, J., and Boon, T., *Structure of the gene of tum-transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells*. Cell, 1989. 58(2): 293-303.
64. Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S.Y., Sette, A., and Scheinberg, D.A., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides*. Blood, 1996. 87(9): 3587-92.
65. Berke, Z., Andersen, M.H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., and Haurum, J.S., *Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules*. Leukemia, 2000. 14(3): 419-26.
66. Van Eynde, A., Perez-Callejon, E., Schoenmakers, E., Jacquemin, M., Stalmans, W., and Bollen, M., *Organization and alternate splice products of the gene encoding nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1)*. Eur J Biochem, 1999. 261(1): 291-300.
67. Moreau-Aubry, A., Le Guiner, S., Labarriere, N., Gesnel, M.C., Jotereau, F., and Breathnach, R., *A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma*. J Exp Med, 2000. 191(9): 1617-24.
68. Greiner, J., Schmitt, A., Giannopoulos, K., Rojewski, M.T., Gotz, M., Funk, I., Ringhoffer, M., Bunjes, D., Hofmann, S., Ritter, G., Dohner, H., and Schmitt, M., *High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma*. Haematologica, 2010. 95(7): 1191-7.
69. Greiner, J., Bullinger, L., Guinn, B.A., Dohner, H., and Schmitt, M., *Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells*. Clin Cancer Res, 2008. 14(22): 7161-6.
70. Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., and Sugiyama, H., *Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia*. Blood, 1997. 89(4): 1405-12.
71. Grimwade, D., Vyas, P., and Freeman, S., *Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. Curr Opin Oncol, 2010. 22(6): 656-63.
72. Lange, T., Hubmann, M., Burkhardt, R., Franke, G.N., Cross, M., Scholz, M., Leiblein, S., Al-Ali, H.K., Edelmann, J., Thiery, J., and Niederwieser, D., *Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning*. Leukemia, 2010 (Epub ahead of printing).
73. Cilloni, D. and Saglio, G., *WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome*. Acta Haematol, 2004. 112(1-2): 79-84.
74. Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., and Matrisian, L.M., *The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research*. Clin Cancer Res, 2009. 15(17): 5323-37.
75. Yannelli, J.R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M., and Rosenberg, S.A., *Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience*. Int J Cancer, 1996. 65(4): 413-21.
76. Hom, S.S., Topalian, S.L., Simonis, T., Mancini, M., and Rosenberg, S.A., *Common expression of melanoma tumor-associated antigens recognized by human tumor infiltrating lymphocytes: analysis by human lymphocyte antigen restriction*. J Immunother (1991), 1991. 10(3): 153-64.
77. Hom, S.S., Schwartzentruber, D.J., Rosenberg, S.A., and Topalian, S.L., *Specific release of cytokines by lymphocytes infiltrating human melanomas in response to shared melanoma antigens*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1993. 13(1): 18-30.
78. Kawakami, Y., Dang, N., Wang, X., Tupesis, J., Robbins, P.F., Wang, R.F., Wunderlich, J.R., Yannelli, J.R., and Rosenberg, S.A., *Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma*. J Immunother, 2000. 23(1): 17-27.
79. Mazzocchi, A., Belli, F., Mascheroni, L., Vegetti, C., Parmiani, G., and Anichini, A., *Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous*

- tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients.* Int J Cancer, 1994. 58(3): 330-9.
80. Parmiani, G., Anichini, A., and Fossati, G., *Cellular immune response against autologous human malignant melanoma: are in vitro studies providing a framework for a more effective immunotherapy?* J Natl Cancer Inst, 1990. 82(5): 361-70.
 81. Pittet, M.J., Valmori, D., Dunbar, P.R., Speiser, D.E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J.C., and Romero, P., *High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals.* J Exp Med, 1999. 190(5): 705-15.
 82. Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D., Roederer, M., and Davis, M.M., *Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.* Nat Med, 1999. 5(6): 677-85.
 83. Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Letsch, A., Germer, C.T., Buhr, H.J., Hegewisch-Becker, S., Rivoltini, L., Thiel, E., and Keilholz, U., *T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients.* J Transl Med, 2005. 3(1): 3.
 84. Karanikas, V., Colau, D., Baurain, J.F., Chiari, R., Thonnard, J., Gutierrez-Roelens, I., Goffinet, C., Van Schaftingen, E.V., Weynants, P., Boon, T., and Coulie, P.G., *High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival.* Cancer Res, 2001. 61(9): 3718-24.
 85. Feuerer, M., Rocha, M., Bai, L., Umansky, V., Solomayer, E.F., Bastert, G., Diel, I.J., and Schirmacher, V., *Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients.* Int J Cancer, 2001. 92(1): 96-105.
 86. Rodolfo, M., Luksch, R., Stockert, E., Chen, Y.T., Collini, P., Ranzani, T., Lombardo, C., Dalerba, P., Rivoltini, L., Arienti, F., Fossati-Bellani, F., Old, L.J., Parmiani, G., and Castelli, C., *Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen.* Cancer Res, 2003. 63(20): 6948-55.
 87. 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., and 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, 2002. 62(6): 1743-50.
 88. Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Schaller, G., Leigh, B., Schmittel, A., Letsch, A., Thiel, E., and Keilholz, U., *Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients.* Int J Cancer, 2003. 105(2): 221-5.
 89. Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemissen, A.M., Berger, G., Buhr, H.J., Thiel, E., and Scheibenbogen, C., *Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer.* Cancer Res, 2000. 60(17): 4850-4.
 90. Jager, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L.J., and Knuth, A., *Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(22): 12198-203.
 91. Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J., and Knuth, A., *Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(9): 4760-5.
 92. Griffioen, M., Borghi, M., Schrier, P.I., and Osanto, S., *Detection and quantification of CD8(+) T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN-gamma-ELISPOT assay.* Int J Cancer, 2001. 93(4): 549-55.

93. Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C., Henry, E., Vigneron, N., Brasseur, F., Lethe, B., De Plaen, E., Velu, T., Boon, T., and Coulie, P.G., *High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens*. J Exp Med, 2005. 201(2): 241-8.
94. Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P., *Human T cell responses against melanoma*. Annu Rev Immunol, 2006. 24: 175-208.
95. Gaiger, A., Carter, L., Greinix, H., Carter, D., McNeill, P.D., Houghton, R.L., Cornelson, C.D., Vedvick, T.S., Skeiky, Y.A., and Cheever, M.A., *WT1-specific serum antibodies in patients with leukemia*. Clin Cancer Res, 2001. 7(3 Suppl): 761s-765s.
96. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M.L., and Cheever, M.A., *Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2000. 96(4): 1480-9.
97. Greiner, J., Li, L., Ringhoffer, M., Barth, T.F., Giannopoulos, K., Guillaume, P., Ritter, G., Wiesneth, M., Dohner, H., and Schmitt, M., *Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. 106(3): 938-45.
98. Rezvani, K., Yong, A.S., Tawab, A., Jafarpour, B., Eniafe, R., Mielke, S., Savani, B.N., Keyvanfar, K., Li, Y., Kurlander, R., and Barrett, A.J., *Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia*. Blood, 2009. 113(10): 2245-55.
99. Barrett, A.J. and Rezvani, K., *Translational mini-review series on vaccines: Peptide vaccines for myeloid leukaemias*. Clin Exp Immunol, 2007. 148(2): 189-98.
100. Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Stevanovic, S., Witzens, M., Willhauck, M., Waldmann, V., Naeher, H., Rammensee, H.G., and Keilholz, U., *Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFNgamma-ELISPOT assay*. Int J Cancer, 1997. 71(6): 932-6.
101. Dhodapkar, M.V., Young, J.W., Chapman, P.B., Cox, W.I., Fonteneau, J.F., Amigorena, S., Houghton, A.N., Steinman, R.M., and Bhardwaj, N., *Paucity of functional T-cell memory to melanoma antigens in healthy donors and melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2000. 6(12): 4831-8.
102. Pittet, M.J., Zippelius, A., Valmori, D., Speiser, D.E., Cerottini, J.C., and Romero, P., *Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor*. Trends Immunol, 2002. 23(7): 325-8.
103. Loftus, D.J., Squarcina, P., Nielsen, M.B., Geisler, C., Castelli, C., Odum, N., Appella, E., Parmiani, G., and 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, 1998. 58(11): 2433-9.
104. Mouldrem, J.J., Lee, P.P., Wang, C., Champlin, R.E., and Davis, M.M., *A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia*. Cancer Res, 1999. 59(11): 2675-81.
105. Weber, G., Karbach, J., Kuci, S., Kreyenberg, H., Willasch, A., Koscielniak, E., Tonn, T., Klingebiel, T., Wels, W.S., Jager, E., and Bader, P., *WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation*. Leukemia, 2009. 23(9): 1634-42.
106. Domschke, C., Schuetz, F., Ge, Y., Seibel, T., Falk, C., Brors, B., Vlodavsky, I., Sommerfeldt, N., Sinn, H.P., Kuhnle, M.C., Schneeweiss, A., Scharf, A., Sohn, C., Schirmacher, V., Moldenhauer, G., Momburg, F., and Beckhove, P., *Intratatumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis*. Cancer Res, 2009. 69(21): 8420-8.
107. Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Lienard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J.C., Romero, P., and Pittet, M.J., *Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance*. Cancer Res, 2004. 64(8): 2865-73.

108. Yannelli, J.R., McConnell, S., Parker, L., Nishimura, M., Robbins, P., Yang, J., el Gamil, M., and Kawakami, Y., *Melanoma tumor-infiltrating lymphocytes derived from four distinct anatomic sites obtained from a single patient: comparison of functional reactivity and melanoma antigen recognition*. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1995. 18(4): 263-71.
109. Muller-Berghaus, J., Ehler, K., Ugurel, S., Umansky, V., Bucur, M., Schirmacher, V., Beckhove, P., and Schadendorf, D., *Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration*. *Cancer Res*, 2006. 66(12): 5997-6001.
110. Feuerer, M., Beckhove, P., Garbi, N., Mahnke, Y., Limmer, A., Hommel, M., Hammerling, G.J., Kyewski, B., Hamann, A., Umansky, V., and Schirmacher, V., *Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen*. *Nat Med*, 2003. 9(9): 1151-7.
111. Schirmacher, V., Feuerer, M., Fournier, P., Ahlert, T., Umansky, V., and Beckhove, P., *T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity*. *Trends Mol Med*, 2003. 9(12): 526-34.
112. Schadendorf, D., Dorn-Beineke, A., Borelli, S., Riethmuller, G., and Pantel, K., *Limitations of the immunocytochemical detection of isolated tumor cells in frozen samples of bone marrow obtained from melanoma patients*. *Exp Dermatol*, 2003. 12(2): 165-71.
113. Schirmacher, V., Feuerer, M., Beckhove, P., Ahlert, T., and Umansky, V., *T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. 7(2): 201-8.
114. Ghossein, R.A., Coit, D., Brennan, M., Zhang, Z.F., Wang, Y., Bhattacharya, S., Houghton, A., and Rosai, J., *Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma*. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(2): 419-28.
115. Ozbas, S., Dafydd, H., and Purushotham, A.D., *Bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *Br J Surg*, 2003. 90(3): 290-301.
116. Feuerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E.F., Bastert, G., Diel, I.J., Pedain, C., Oberniedermayr, M., Schirmacher, V., and Umansky, V., *Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow*. *Nat Med*, 2001. 7(4): 452-8.
117. Domschke, C., Schuetz, F., Sommerfeldt, N., Rom, J., Scharf, A., Sohn, C., Schneeweiss, A., and Beckhove, P., *Effects of distant metastasis and peripheral CA 15-3 on the induction of spontaneous T cell responses in breast cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(3): 479-86.
118. Becker, T.C., Coley, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R., *Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells*. *J Immunol*, 2005. 174(3): 1269-73.
119. Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., Silberstein, L.E., and von Andrian, U.H., *Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells*. *Immunity*, 2005. 22(2): 259-70.
120. Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H., *On immunological memory*. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: 333-67.
121. Sallusto, F., Langenkamp, A., Geginat, J., and Lanzavecchia, A., *Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 251: 167-71.
122. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., *From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation*. *Curr Opin Immunol*, 2000. 12(1): 92-8.
123. Kaech, S.M. and Wherry, E.J., *Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection*. *Immunity*, 2007. 27(3): 393-405.
124. Sallusto, F. and Reiner, S.L., *Sliding doors in the immune response*. *Nat Immunol*, 2005. 6(1): 10-2.
125. Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M.A., Hieshima, K., Springer, T.A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U.H., *Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2001. 108(6): 871-8.

126. Masopust, D., Vezys, V., Usherwood, E.J., Cauley, L.S., Olson, S., Marzo, A.L., Ward, R.L., Woodland, D.L., and Lefrancois, L., *Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin*. J Immunol, 2004. 172(8): 4875-82.
127. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. 401(6754): 708-12.
128. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. 290(5489): 92-7.
129. Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A., *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells*. J Exp Med, 1997. 186(9): 1407-18.
130. Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A., *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: 745-63.
131. Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R., *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(4): 251-62.
132. Geginat, J., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F., *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. Blood, 2003. 101(11): 4260-6.
133. Almeida, J.R., Price, D.A., Papagno, L., Arkoub, Z.A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T.E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Marcelin, A.G., Douek, D., Autran, B., and Appay, V., *Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover*. J Exp Med, 2007. 204(10): 2473-85.
134. Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M., and Seder, R.A., *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major*. Nat Med, 2007. 13(7): 843-50.
135. Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. 4(3): 225-34.
136. Ault, K.A., *Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials*. Lancet, 2007. 369(9576): 1861-8.
137. Schiller, J.T., Castellsague, X., Villa, L.L., and Hildesheim, A., *An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results*. Vaccine, 2008. 26 Suppl 10: K53-61.
138. Chang, M.H., Chen, C.J., Lai, M.S., Hsu, H.M., Wu, T.C., Kong, M.S., Liang, D.C., Shau, W.Y., and Chen, D.S., *Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children*. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. N Engl J Med, 1997. 336(26): 1855-9.
139. Higano, C.S., Schellhammer, P.F., Small, E.J., Burch, P.A., Nemunaitis, J., Yuh, L., Provost, N., and Frohlich, M.W., *Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer*. Cancer, 2009. 115(16): 3670-9.
140. Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., and Schellhammer, P.F., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. N Engl J Med, 2010. 363(5): 411-22.
141. Small, E.J., Schellhammer, P.F., Higano, C.S., Redfern, C.H., Nemunaitis, J.J., Valone, F.H., Verjee, S.S., Jones, L.A., and Hershberg, R.M., *Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer*. J Clin Oncol, 2006. 24(19): 3089-94.
142. Schuster, S.J., *Idiotype Vaccine Therapy in Follicular Lymphoma in First Complete Remission: Phase III Clinical Trial Results*. ASCO 2009, 2009. Abstract P2.
143. Sampson, J.H., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimerger, A.B., Herndon, J.E., 2nd, Lally-Goss, D., McGehee-Norman, S., Paolino, A., Reardon, D.A., Friedman, A.H.,

- Friedman, H.S., and Bigner, D.D., *An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme*. *Mol Cancer Ther*, 2009. 8(10): 2773-9.
144. Kanaly, C.W., Ding, D., Heimberger, A.B., and Sampson, J.H., *Clinical applications of a peptide-based vaccine for glioblastoma*. *Neurosurg Clin N Am*, 2010. 21(1): 95-109.
 145. Reuschenbach, M., Kloor, M., Morak, M., Wentzensen, N., Germann, A., Garbe, Y., Tariverdian, M., Findeisen, P., Neumaier, M., Holinski-Feder, E., and von Knebel Doeberitz, M., *Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome*. *Fam Cancer*, 2010. 9(2): 173-9.
 146. Cheever, M.A., Schlom, J., Weiner, L.M., Lyerly, H.K., Disis, M.L., Greenwood, A., Grad, O., and Nelson, W.G., *Translational Research Working Group developmental pathway for immune response modifiers*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(18): 5692-9.
 147. Cheever, M.A., *Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers*. *Immunol Rev*, 2008. 222: 357-68.
 148. Slingluff, C.L., Jr., Petroni, G.R., Yamshchikov, G.V., Hibbitts, S., Grosh, W.W., Chianese-Bullock, K.A., Bissonette, E.A., Barnd, D.L., Deacon, D.H., Patterson, J.W., Parekh, J., Neese, P.Y., Woodson, E.M., Wiernasz, C.J., and Merrill, P., *Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule*. *J Clin Oncol*, 2004. 22(22): 4474-85.
 149. Mocellin, S., Rossi, C.R., Nitti, D., Lise, M., and Marincola, F.M., *Dissecting tumor responsiveness to immunotherapy: the experience of peptide-based melanoma vaccines*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. 1653(2): 61-71.
 150. Restifo, N.P. and Rosenberg, S.A., *Use of standard criteria for assessment of cancer vaccines*. *Lancet Oncol*, 2005. 6(1): 3-4.
 151. Weber, J., *Peptide vaccines for cancer*. *Cancer Invest*, 2002. 20(2): 208-21.
 152. Hu, H.M., Chu, Y., and Urba, W.J., *Undefined-antigen vaccines*. *Cancer Treat Res*, 2005. 123: 207-25.
 153. Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H., Elisseeva, O.A., Oji, Y., Kawakami, M., Ikegame, K., Hosen, N., Yoshihara, S., Wu, F., Fujiki, F., Murakami, M., Masuda, T., Nishida, S., Shirakata, T., Nakatsuka, S., Sasaki, A., Udaka, K., Dohy, H., Aozasa, K., Noguchi, S., Kawase, I., and Sugiyama, H., *Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(38): 13885-90.
 154. Schlom, J., Arlen, P.M., and Gulley, J.L., *Cancer vaccines: moving beyond current paradigms*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(13): 3776-82.
 155. Finke, L.H., Wentworth, K., Blumenstein, B., Rudolph, N.S., Levitsky, H., and Hoos, A., *Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies--outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC)*. *Vaccine*, 2007. 25 Suppl 2: B97-B109.
 156. Tsao, H., Atkins, M.B., and Sober, A.J., *Management of cutaneous melanoma*. *N Engl J Med*, 2004. 351(10): 998-1012.
 157. Agarwala, S.S., *Current systemic therapy for metastatic melanoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009. 9(5): 587-95.
 158. Wolchok, J.D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J.S., Hamid, O., Lebbe, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R., and Hodi, F.S., *Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(23): 7412-20.
 159. Slingluff, C.L., Jr., Petroni, G.R., Chianese-Bullock, K.A., Smolkin, M.E., Hibbitts, S., Murphy, C., Johansen, N., Grosh, W.W., Yamshchikov, G.V., Neese, P.Y., Patterson, J.W., Fink, R., and Rehm, P.K., *Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipeptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(21): 6386-95.
 160. Hodi, F.S., *Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4*. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2010. 6 Suppl 1: S16-23.
 161. Sarnaik, A.A., Yu, B., Yu, D., Morelli, D.R., Hall, M.S., Bogle, D., Yan, L., Targan, S.R., Snively, J., Nichol, G., Yellin, M., and Weber, J.S., *Extended dose ipilimumab with a peptide vaccine: immune correlates associated with clinical benefit in patients with resected high-risk stage IIIc/IV melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2010.

162. Schwartzentruber D., *A Phase III Multi-institutional Randomised Study of Immunization with the gp100: 209–217 (210M) Peptide Followed by High-dose IL2 Compared with High-Dose IL-2 alone in Patients with Metastatic Melanoma*. Journal of Clinical Oncology, 2009. 27(no 18S): abstract CRA 9011.
163. Testori, A., Richards, J., Whitman, E., Mann, G.B., Lutzky, J., Camacho, L., Parmiani, G., Tosti, G., Kirkwood, J.M., Hoos, A., Yuh, L., Gupta, R., and Srivastava, P.K., *Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group*. J Clin Oncol, 2008. 26(6): 955-62.
164. Sosman, J.A., Unger, J.M., Liu, P.Y., Flaherty, L.E., Park, M.S., Kempf, R.A., Thompson, J.A., Terasaki, P.I., and Sondak, V.K., *Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: impact of HLA class I antigen expression on outcome*. J Clin Oncol, 2002. 20(8): 2067-75.
165. Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., Nestle, F.O., Enk, A., Brocker, E.B., Grabbe, S., Rittgen, W., Edler, L., Sucker, A., Zimpfer-Rechner, C., Berger, T., Kamarashev, J., Burg, G., Jonuleit, H., Tutenberg, A., Becker, J.C., Keikavoussi, P., Kampgen, E., and Schuler, G., *Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG*. Ann Oncol, 2006. 17(4): 563-70.
166. Kirkwood, J.M., Ibrahim, J.G., Sosman, J.A., Sondak, V.K., Agarwala, S.S., Ernstoff, M.S., and Rao, U., *High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801*. J Clin Oncol, 2001. 19(9): 2370-80.
167. Eggermont A.M.M., Ruka W., Marsden J., Testori A., Corrie P., Aamdal S., Ascierto P.A., Patel P., Spatz A., EORTC Melanoma Group., *EORTC 18961: Post-operative adjuvant ganglioside GM2-KLH21 vaccination treatment vs observation in stage II (T3-T4N0M0) melanoma: 2nd interim analysis led to an early disclosure of the results*. J Clin Oncol, 2008. 26(484S): abs. 9004.
168. Morton DL, M.N., Thompson JF, et al.: *An international randomized, phase III trial of bacillus Calmette-Guerin (BCG) plus allogeneic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic to regional or distant sites*. J Clin Oncol, 2007. 25(474s): abstr 8508.
169. Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N.Y., Schlom, J., and Tsang, K.Y., *Strategies for cancer vaccine development*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010.
170. Hoos, A., Eggermont, A.M., Janetzki, S., Hodi, F.S., Ibrahim, R., Anderson, A., Humphrey, R., Blumenstein, B., Old, L., and Wolchok, J., *Improved endpoints for cancer immunotherapy trials*. J Natl Cancer Inst, 2010. 102(18): 1388-97.
171. Weber, J., *Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade*. Semin Oncol, 2010. 37(5): 430-9.
172. Andersen, M.H., Junker, N., Ellebaek, E., Svane, I.M., and Thor Straten, P., *Therapeutic cancer vaccines in combination with conventional therapy*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010: 237623.
173. Mackiewicz, J. and Mackiewicz, A., *Design of clinical trials for therapeutic cancer vaccines development*. Eur J Pharmacol, 2009. 625(1-3): 84-9.
174. Siegmund-Schultze, N., *Immuntherapien gegen Krebs: Die klinische Anwendung rückt näher*. Dtsch Arztebl 2009. 106(48): A-2403 / B-2069 / C-2009.
175. Powles, R.L., Russell, J., Lister, T.A., Oliver, T., Whitehouse, J.M., Malpas, J., Chapuis, B., Crowther, D., and Alexander, P., *Immunotherapy for acute myelogenous leukaemia: a controlled clinical study 2 1/2 years after entry of the last patient*. Br J Cancer, 1977. 35(3): 265-72.
176. Whiteway, A., Corbett, T., Anderson, R., Macdonald, I., and Prentice, H.G., *Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission*. Br J Haematol, 2003. 120(3): 442-51.
177. Berke, G., *The CTL's kiss of death*. Cell, 1995. 81(1): 9-12.

178. Zhong, R.K., Lane, T.A., and Ball, E.D., *Generation of T-cell lines to autologous acute myeloid leukemia cells by competitive limiting dilution culture of acute myeloid leukemia mononuclear cells*. *Exp Hematol*, 2008. 36(4): 486-94.
179. Draube, A., Beyer, M., and Wolf, J., *Activation of autologous leukemia-specific T cells in acute myeloid leukemia: monocyte-derived dendritic cells cocultured with leukemic blasts compared with leukemia-derived dendritic cells*. *Eur J Haematol*, 2008. 81(4): 281-8.
180. Scheibenbogen, C., Letsch, A., Thiel, E., Schmittl, A., Mailaender, V., Baerwolf, S., Nagorsen, D., and Keilholz, U., *CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2002. 100(6): 2132-7.
181. Barrett, J. and Rezvani, K., *Neutrophil granule proteins as targets of leukemia-specific immune responses*. *Curr Opin Hematol*, 2006. 13(1): 15-20.
182. De Angulo, G., Yuen, C., Palla, S.L., Anderson, P.M., and Zweidler-McKay, P.A., *Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies*. *Cancer*, 2008. 112(2): 407-15.
183. Barrett, A.J. and Savani, B.N., *Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents*. *Leukemia*, 2006. 20(10): 1661-72.
184. Ohnishi, K., Yamanishi, H., Naito, K., Utsumi, M., Yokomaku, S., Hirabayashi, N., and Ohno, R., *Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia*. *Leukemia*, 1998. 12(1): 52-8.
185. Barrett, A.J. and Le Blanc, K., *Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia*. *Clin Exp Immunol*, 2010. 161(2): 223-32.
186. Perez-Garcia, A., Brunet, S., Berlanga, J.J., Tormo, M., Nomdedeu, J., Guardia, R., Ribera, J.M., Heras, I., Llorente, A., Hoyos, M., Esteve, J., Besalduch, J., Bueno, J., Sierra, J., and Gallardo, D., *CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy*. *Leukemia*, 2009. 23(3): 486-91.
187. Scholl, N., Loibl, J., Kremser, A., Liepert, A., Grabrucker, C., Salih, H.R., Kolb, H.J., and Schmetzer, H.M., *The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BB ligand in patients with malignant hemopoietic disorders*. *Leuk Lymphoma*, 2009. 50(3): 427-36.
188. Verheyden, S., Bernier, M., and Demanet, C., *Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia*. *Leukemia*, 2004. 18(12): 2002-7.
189. Orleans-Lindsay, J.K., Deru, A., Craig, J.I., Prentice, H.G., and Lowdell, M.W., *In vitro co-stimulation with anti-CD28 synergizes with IL-12 in the generation of T cell immune responses to leukaemic cells; a strategy for ex-vivo generation of CTL for immunotherapy*. *Clin Exp Immunol*, 2003. 133(3): 467-75.
190. Panoskaltzis, N., Reid, C.D., and Knight, S.C., *Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia*. *Leukemia*, 2003. 17(4): 716-30.
191. Tong, X.M., Yao, H.P., Qian, W.B., Zhu, L.F., Fu, Z.H., Huang, Z.L., and Jin, J., *The biological characteristics of dendritic cells derived in vitro from myelogenous leukemia cells and healthy donor cells*. *Int J Lab Hematol*, 2008. 30(5): 372-81.
192. Schui, D.K., Singh, L., Schneider, B., Knau, A., Hoelzer, D., and Weidmann, E., *Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts*. *Leuk Res*, 2002. 26(4): 383-9.
193. Mohty, M., Jarrossay, D., Lafage-Pochitaloff, M., Zandotti, C., Briere, F., de Lamballeri, X.N., Isnardon, D., Sainty, D., Olive, D., and Gaugler, B., *Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment*. *Blood*, 2001. 98(13): 3750-6.
194. Narita, M., Takahashi, M., Liu, A., Ayres, F., Satoh, N., Abe, T., Nikkuni, K., Furukawa, T., Toba, K., and Aizawa, Y., *Generation of dendritic cells from leukaemia cells of a patient with acute promyelocytic leukaemia by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF-alpha*. *Acta Haematol*, 2001. 106(3): 89-94.
195. Li, Y., Yin, Q., Yang, L., Chen, S., Geng, S., Wu, X., Zhong, L., Schmidt, C.A., and Przybylski, G.K., *Reduced levels of recent thymic emigrants in acute myeloid leukemia patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. 58(7): 1047-55.

196. Greiner, J., Dohner, H., and Schmitt, M., *Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens*. *Haematologica*, 2006. 91(12): 1653-61.
197. Schmitt, M., Casalegno-Garduno, R., Xu, X., and Schmitt, A., *Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia*. *Expert Rev Vaccines*, 2009. 8(10): 1415-25.
198. Mailander, V., Scheibenbogen, C., Thiel, E., Letsch, A., Blau, I.W., and Keilholz, U., *Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity*. *Leukemia*, 2004. 18(1): 165-6.
199. Rezvani, K., Yong, A.S., Mielke, S., Savani, B.N., Musse, L., Superata, J., Jafarpour, B., Boss, C., and Barrett, A.J., *Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies*. *Blood*, 2008. 111(1): 236-42.
200. Maslak, P.G., Dao, T., Krug, L.M., Chanel, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., Zhang, R., Wolchok, J.D., Yuan, J., Pinilla-Ibarz, J., Berman, E., Weiss, M., Jurcic, J., Frattini, M.G., and Scheinberg, D.A., *Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2010. 116(2): 171-9.
201. Van Tendeloo, V.F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., Gostick, E., Vermeulen, K., Pieters, K., Nijs, G., Stein, B., Smits, E.L., Schroyens, W.A., Gadisseur, A.P., Vrelust, I., Jorens, P.G., Goossens, H., de Vries, I.J., Price, D.A., Oji, Y., Oka, Y., Sugiyama, H., and Berneman, Z.N., *Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(31): 13824-9.
202. Qazilbash M.H., W.E.D., Thall P.F., Wang X., Rios R.L., Lu S., Kant S., Giralt S., Estey E.H., Cortes J., Komanduri K., Champlin R.E., and Molldrem J.J., *PR1 Peptide Vaccine-Induced Immune Response Is Associated with Better Event-Free Survival in Patients with Myeloid Leukemia*. *Blood* 2007. 110(ASH Annual Meeting Abstracts, Nov 2007;): abstract 283.
203. Keilholz, U., Weber, J., Finke, J.H., Gabilovich, D.I., Kast, W.M., Disis, M.L., Kirkwood, J.M., Scheibenbogen, C., Schlom, J., Maino, V.C., Lyster, H.K., Lee, P.P., Storkus, W., Marincola, F., Worobec, A., and Atkins, M.B., *Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy*. *J Immunother*, 2002. 25(2): 97-138.
204. Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes*. *Science*, 1996. 274(5284): 94-6.
205. Schmittel, A., Keilholz, U., and Scheibenbogen, C., *Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood*. *J Immunol Methods*, 1997. 210(2): 167-74.
206. Letsch, A. and Scheibenbogen, C., *Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining*. *Methods*, 2003. 31(2): 143-9.
207. Scheibenbogen, C., Romero, P., Rivoltini, L., Herr, W., Schmittel, A., Cerottini, J.C., Woelfel, T., Eggermont, A.M., and Keilholz, U., *Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial*. *J Immunol Methods*, 2000. 244(1-2): 81-9.
208. Janetzki, S., Panageas, K.S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C.M., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H.T., Romero, P., Yuan, J., Kast, W.M., and Hoos, A., *Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI)*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(3): 303-15.
209. Janetzki, S., Price, L., Britten, C.M., van der Burg, S.H., Caterini, J., Currier, J.R., Ferrari, G., Gouttefangeas, C., Hayes, P., Kaempgen, E., Lennerz, V., Nihlmark, K., Souza, V., and Hoos, A., *Performance of serum-supplemented and serum-free media in IFNgamma Elispot Assays for human T cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(4): 609-18.

210. Britten, C.M., Janetzki, S., van der Burg, S.H., Gouttefangeas, C., and Hoos, A., *Toward the harmonization of immune monitoring in clinical trials: quo vadis?* *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(3): 285-8.
211. Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Lower, M., Welters, M.J., Ottensmeier, C., van der Burg, S.H., and Britten, C.M., *Response definition criteria for ELISPOT assays revisited.* *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(10): 1489-501.
212. Boulet, S., Ndongala, M.L., and Bernard, N.F., *Dual-color ELISPOT assay for the simultaneous detection of IL-2 and/or IFN-gamma secreting T cells.* *Cold Spring Harb Protoc*, 2010. 2010(1): pdb prot5369.
213. Hernandez-Fuentes, M.P., Warrens, A.N., and Lechler, R.I., *Immunologic monitoring.* *Immunol Rev*, 2003. 196: 247-64.
214. Chattopadhyay, P.K. and Roederer, M., *Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease.* *Cytometry A*, 2010. 77(7): 614-22.
215. Quah, B.J. and Parish, C.R., *The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation.* *J Vis Exp*, 2010(44).
216. Zaritskaya, L., Shafer-Weaver, K.A., Gregory, M.K., Strobl, S.L., Baseler, M., and Malyguine, A., *Application of a flow cytometric cytotoxicity assay for monitoring cancer vaccine trials.* *J Immunother*, 2009. 32(2): 186-94.
217. Stanke, J., Hoffmann, C., Erben, U., von Keyserling, H., Stevanovic, S., Cichon, G., Schneider, A., and Kaufmann, A.M., *A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function.* *J Immunol Methods*, 2010. 360(1-2): 56-65.
218. Petrausch, U., Haley, D., Miller, W., Floyd, K., Urba, W.J., and Walker, E., *Polychromatic flow cytometry: a rapid method for the reduction and analysis of complex multiparameter data.* *Cytometry A*, 2006. 69(12): 1162-73.
219. Siebert, J.C., Wang, L., Haley, D.P., Romer, A., Zheng, B., Munsil, W., Gregory, K.W., and Walker, E.B., *Exhaustive expansion: A novel technique for analyzing complex data generated by higher-order polychromatic flow cytometry experiments.* *J Transl Med*, 2010. 8: 106.
220. Frelinger, J., Ottinger, J., Gouttefangeas, C., and Chan, C., *Modeling flow cytometry data for cancer vaccine immune monitoring.* *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(9): 1435-41.
221. Nomura, L., Maino, V.C., and Maecker, H.T., *Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining.* *Cytometry A*, 2008. 73(11): 984-91.
222. Nagorsen, D. and Marincola, F.M., *How to analyze ex vivo T-cell responses in cancer patients.* *In Vivo*, 2002. 16(6): 519-25.
223. Kammula, U.S., Lee, K.H., Riker, A.I., Wang, E., Ohnmacht, G.A., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M., *Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens.* *J Immunol*, 1999. 163(12): 6867-75.
224. Marrack, P., Mitchell, T., Hildeman, D., Kiedl, R., Teague, T.K., Bender, J., Rees, W., Schaefer, B.C., and Kappler, J., *Genomic-scale analysis of gene expression in resting and activated T cells.* *Curr Opin Immunol*, 2000. 12(2): 206-9.
225. Bedognetti, D., Wang, E., Sertoli, M.R., and Marincola, F.M., *Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer.* *Expert Rev Vaccines*, 2010. 9(6): 555-65.
226. Mandruzzato, S., Callegaro, A., Turcatel, G., Francescato, S., Montesco, M.C., Chiarion-Sileni, V., Mocellin, S., Rossi, C.R., Biciato, S., Wang, E., Marincola, F.M., and Zanovello, P., *A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma.* *J Transl Med*, 2006. 4: 50.
227. Bogunovic, D., O'Neill, D.W., Belitskaya-Levy, I., Vacic, V., Yu, Y.L., Adams, S., Darvishian, F., Berman, R., Shapiro, R., Pavlick, A.C., Lonardi, S., Zavadil, J., Osman, I., and Bhardwaj, N., *Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(48): 20429-34.
228. Roepman, P., Jassem, J., Smit, E.F., Muley, T., Niklinski, J., van de Velde, T., Witteveen, A.T., Rzyman, W., Floore, A., Burgers, S., Giaccone, G., Meister, M., Dienemann, H., Skrzypski, M., Kozlowski, M., Mooi, W.J., and van Zandwijk, N., *An*

- immune response enriched 72-gene prognostic profile for early-stage non-small-cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2009. 15(1): 284-90.
229. Reyat, F., van Vliet, M.H., Armstrong, N.J., Horlings, H.M., de Visser, K.E., Kok, M., Teschendorff, A.E., Mook, S., van 't Veer, L., Caldas, C., Salmon, R.J., van de Vijver, M.J., and Wessels, L.F., *A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer.* Breast Cancer Res, 2008. 10(6): R93.
230. Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O., and Caldas, C., *An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer.* Genome Biol, 2007. 8(8): R157.
231. Disis, M.L., *Immunologic biomarkers as correlates of clinical response to cancer immunotherapy.* Cancer Immunol Immunother, 2011.
232. Kirkwood, J.M., Lee, S., Moschos, S.J., Albertini, M.R., Michalak, J.C., Sander, C., Whiteside, T., Butterfield, L.H., and Weiner, L., *Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine+/-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696.* Clin Cancer Res, 2009. 15(4): 1443-51.
233. Gulley, J.L., Arlen, P.M., Madan, R.A., Tsang, K.Y., Pazdur, M.P., Skarupa, L., Jones, J.L., Poole, D.J., Higgins, J.P., Hodge, J.W., Cereda, V., Vergati, M., Steinberg, S.M., Halabi, S., Jones, E., Chen, C., Parnes, H., Wright, J.J., Dahut, W.L., and Schlom, J., *Immunologic and prognostic factors associated with overall survival employing a poxviral-based PSA vaccine in metastatic castrate-resistant prostate cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(5): 663-74.
234. Britten, C.M., Janetzki, S., Ben-Porat, L., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H., Odunsi, K., Pride, M., Old, L., Hoos, A., and Romero, P., *Harmonization guidelines for HLA-peptide multimer assays derived from results of a large scale international proficiency panel of the Cancer Vaccine Consortium.* Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(10): 1701-13.
235. Jaimes, M.C., Maecker, H.T., Yan, M., Maino, V.C., Hanley, M.B., Greer, A., Darden, J.M., and D'Souza, M.P., *Quality assurance of intracellular cytokine staining assays: analysis of multiple rounds of proficiency testing.* J Immunol Methods, 2011. 363(2): 143-57.
236. Janetzki, S., Britten, C.M., Kalos, M., Levitsky, H.I., Maecker, H.T., Melief, C.J., Old, L.J., Romero, P., Hoos, A., and Davis, M.M., *"MIATA"-minimal information about T cell assays.* Immunity, 2009. 31(4): 527-8.
237. Elisseeva, O.A., Oka, Y., Tsuboi, A., Ogata, K., Wu, F., Kim, E.H., Soma, T., Tamaki, H., Kawakami, M., Oji, Y., Hosen, N., Kubota, T., Nakagawa, M., Yamagami, T., Hiraoka, A., Tsukaguchi, M., Udaka, K., Ogawa, H., Kishimoto, T., Nomura, T., and Sugiyama, H., *Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies.* Blood, 2002. 99(9): 3272-9.
238. Mouldrem, J.J., Lee, P.P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H.M., Champlin, R.E., and Davis, M.M., *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia.* Nat Med, 2000. 6(9): 1018-23.
239. Asemisen, A.M., Nagorsen, D., Keilholz, U., Letsch, A., Schmittel, A., Thiel, E., and Scheibenbogen, C., *Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN-gamma for the quantification of antigen reactive T cells.* J Immunol Methods, 2001. 251(1-2): 101-8.
240. Yasukawa, M., Fujiwara, H., Ochi, T., Suemori, K., Narumi, H., Azuma, T., and Kuzushima, K., *Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome.* Am J Hematol, 2009. 84(5): 314-5.
241. Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Thiel, E., and Keilholz, U., *Immunological monitoring of cancer vaccine therapy.* Expert Opin Biol Ther, 2004. 4(10): 1677-84.
242. Sloand, E.M., Melenhorst, J.J., Tucker, Z.C., Pfannes, L., Brenchley, J.M., Yong, A., Visconte, V., Wu, C., Gostick, E., Scheinberg, P., Olnes, M.J., Douek, D.C., Price, D.A., Barrett, A.J., and Young, N.S., *T cell immune responses to Wilms tumor 1 protein in myelodysplasia responsive to immunosuppressive therapy.* Blood, 2010. (Epub ahead of printing).

243. Wang, X., Schmitt, A., Chen, B., Xu, X., Mani, J., Linnebacher, M., Freund, M., and Schmitt, M., *Streptamer-based selection of WT1-specific CD8+ T cells for specific donor lymphocyte infusions*. *Exp Hematol*, 2010. 38(11): 1066-73.
244. Gillmore, R., Xue, S.A., Holler, A., Kaeda, J., Hadjiminias, D., Healy, V., Dina, R., Parry, S.C., Bellantuono, I., Ghani, Y., Coombes, R.C., Waxman, J., and Stauss, H.J., *Detection of Wilms' tumor antigen-specific CTL in tumor-draining lymph nodes of patients with early breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(1): 34-42.
245. Makita, M., Hiraki, A., Azuma, T., Tsuboi, A., Oka, Y., Sugiyama, H., Fujita, S., Tanimoto, M., Harada, M., and Yasukawa, M., *Antitumor effect of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(8): 2626-31.
246. Koesters, R., Linnebacher, M., Coy, J.F., Germann, A., Schwitalle, Y., Findeisen, P., and von Knebel Doeberitz, M., *WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells*. *Int J Cancer*, 2004. 109(3): 385-92.
247. Chaise, C., Buchan, S.L., Rice, J., Marquet, J., Rouard, H., Kuentz, M., Vittes, G.E., Molinier-Frenkel, V., Farcet, J.P., Stauss, H.J., Delfau-Larue, M.H., and Stevenson, F.K., *DNA vaccination induces WT1-specific T-cell responses with potential clinical relevance*. *Blood*, 2008. 112(7): 2956-64.
248. Ho, W.Y., Nguyen, H.N., Wolf, M., Kuball, J., and Greenberg, P.D., *In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire*. *J Immunol Methods*, 2006. 310(1-2): 40-52.
249. Bellantuono, I., Gao, L., Parry, S., Marley, S., Dazzi, F., Apperley, J., Goldman, J.M., and Stauss, H.J., *Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL*. *Blood*, 2002. 100(10): 3835-7.
250. Arlen, P., Tsang, K.Y., Marshall, J.L., Chen, A., Steinberg, S.M., Poole, D., Hand, P.H., Schlom, J., and Hamilton, J.M., *The use of a rapid ELISPOT assay to analyze peptide-specific immune responses in carcinoma patients to peptide vs. recombinant poxvirus vaccines*. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. 49(10): 517-29.
251. Mine, T., Gouhara, R., Hida, N., Imai, N., Azuma, K., Rikimaru, T., Katagiri, K., Nishikori, M., Sukehiro, A., Nakagawa, M., Yamada, A., Aizawa, H., Shirouzu, K., Itoh, K., and Yamana, H., *Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients*. *Cancer Sci*, 2003. 94(6): 548-56.
252. Mine, T., Sato, Y., Noguchi, M., Sasatomi, T., Gouhara, R., Tsuda, N., Tanaka, S., Shomura, H., Katagiri, K., Rikimaru, T., Shichijo, S., Kamura, T., Hashimoto, T., Shirouzu, K., Yamada, A., Todo, S., Itoh, K., and Yamana, H., *Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(3): 929-37.
253. Parmiani, G., Sensi, M., Castelli, C., Rivoltini, L., and Anichini, A., *T-cell response to unique and shared antigens and vaccination of cancer patients*. *Cancer Immun*, 2002. 2: 6.
254. Letsch A., Scheibenbogen C., Fluck M., Asemissen A., Nagorsen D., Thiel E., Keilholz U. , *Adjuvant tyrosinase peptide vaccination in patients with resected stage III/IV melanoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I., 2006. 24(18S): abstract 2570.
255. Nishizuka, Y. and Sakakura, T., *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. *Science*, 1969. 166(906): 753-5.
256. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. *J Immunol*, 1995. 155(3): 1151-64.
257. Nizar, S., Meyer, B., Galustian, C., Kumar, D., and Dalgleish, A., *T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1806(1): 7-17.
258. Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., and Dirnhofer, S., *Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma*. *Haematologica*, 2008. 93(2): 193-200.

259. Nizar, S., Copier, J., Meyer, B., Bodman-Smith, M., Galustian, C., Kumar, D., and Dalglish, A., *T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy?* Br J Cancer, 2009. 100(11): 1697-703.
260. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I., Huizinga, T.W., and Toes, R.E., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells.* Eur J Immunol, 2007. 37(1): 129-38.
261. Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J., and Ochoa, A.C., *Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion.* Cancer Res, 2005. 65(8): 3044-8.
262. Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N., *A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens.* Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(10): 1535-44.
263. Tamura, H., Dan, K., Yokose, N., Iwakiri, R., Ohta, M., Sakamaki, H., Tohyama, K., Kondo, A., Hyodo, H., Nakamura, K., Yamashita, T., Elisseeva, O.A., Oka, Y., Oji, Y., Sugiyama, H., and Ogata, K., *Prognostic significance of WT1 mRNA and anti-WT1 antibody levels in peripheral blood in patients with myelodysplastic syndromes.* Leuk Res, 2010. 34(8): 986-90.
264. Letsch A., Elisseeva.O., Scheibenbogen C., Asemissen A., Stather D., Busse A., Oka Y. , Keilholz U., Sugiyama H.,Thiel E., *Effect of vaccination of leukemia patients with a MHC class I peptide of Wilms tumor gene 1 (WT1) peptide with unspecific T helper stimulation on WT1-specific IgM responses and on IgG responses.* J Clin Oncol 2008. 26(May 20 suppl): abstract 3054.
265. Walker, E.B., Haley, D., Miller, W., Floyd, K., Wisner, K.P., Sanjuan, N., Maecker, H., Romero, P., Hu, H.M., Alvord, W.G., Smith, J.W., 2nd, Fox, B.A., and Urba, W.J., *gp100(209-2M) peptide immunization of human lymphocyte antigen-A2+ stage I-III melanoma patients induces significant increase in antigen-specific effector and long-term memory CD8+ T cells.* Clin Cancer Res, 2004. 10(2): 668-80.
266. Monsurro, V., Nagorsen, D., Wang, E., Provenzano, M., Dudley, M.E., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M., *Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells.* J Immunol, 2002. 168(11): 5933-42.
267. Letsch, A., Knoedler, M., Na, I.K., Kern, F., Asemissen, A.M., Keilholz, U., Loesch, M., Thiel, E., Volk, H.D., and Scheibenbogen, C., *CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow.* Eur J Immunol, 2007. 37(11): 3063-8.
268. Melenhorst, J.J., Scheinberg, P., Chattopadhyay, P.K., Gostick, E., Ladell, K., Roederer, M., Hensel, N.F., Douek, D.C., Barrett, A.J., and Price, D.A., *High avidity myeloid leukemia-associated antigen-specific CD8+ T cells preferentially reside in the bone marrow.* Blood, 2009. 113(10): 2238-44.
269. Na, I.K., Letsch, A., Guerreiro, M., Bauer, S., Noack, I., Geginat, J., Reinke, P., Loesch, M., Kienapfel, H., Thiel, E., Volk, H.D., and Scheibenbogen, C., *Human bone marrow as a source to generate CMV-specific CD4+ T cells with multifunctional capacity.* J Immunother, 2009. 32(9): 907-13.
270. Kawakami, M., Oka, Y., Tsuboi, A., Harada, Y., Elisseeva, O.A., Furukawa, Y., Tsukaguchi, M., Shirakata, T., Nishida, S., Nakajima, H., Morita, S., Sakamoto, J., Kawase, I., Oji, Y., and Sugiyama, H., *Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia.* Int J Hematol, 2007. 85(5): 426-9.
271. Pedicord, V.A., Montalvo, W., Leiner, I.M., and Allison, J.P., *Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(1): 266-71.
272. Rezvani, K., Yong, A., Mielke, S., Jafarpour, B., Savani, B., Le, R.Q., Eniafe, R., Musse, L., Boss, C., Kurlander, R., and Barrett, J.A., *Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8+ T-cells in myeloid malignancies.* Haematologica, 2010.
273. Melief, C.J. and van der Burg, S.H., *Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines.* Nat Rev Cancer, 2008. 8(5): 351-60.
274. Bijker, M.S., van den Eeden, S.J., Franken, K.L., Melief, C.J., Offringa, R., and van der Burg, S.H., *CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity.* J Immunol, 2007. 179(8): 5033-40.

275. Bevan, M.J., *Helping the CD8(+) T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(8): 595-602.
276. Homann, D., *Immunocytotherapy*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. 263: 43-65.
277. Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P., *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes*. Nature, 2003. 421(6925): 852-6.
278. Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R., *Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes*. J Exp Med, 1998. 187(9): 1383-93.
279. Molldrem, J.J., Lee, P.P., Kant, S., Wieder, E., Jiang, W., Lu, S., Wang, C., and Davis, M.M., *Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells*. J Clin Invest, 2003. 111(5): 639-47.
280. Walker, E.B., Haley, D., Petrusch, U., Floyd, K., Miller, W., Sanjuan, N., Alvord, G., Fox, B.A., and Urba, W.J., *Phenotype and functional characterization of long-term gp100-specific memory CD8+ T cells in disease-free melanoma patients before and after boosting immunization*. Clin Cancer Res, 2008. 14(16): 5270-83.
281. Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Smolkin, M.E., Chianese-Bullock, K.A., Smith, K., Murphy, C., Galeassi, N., Neese, P.Y., Grosh, W.W., Nail, C.J., Ross, M., von Mehren, M., Haas, N., Boisvert, M.E., and Kirkwood, J.M., *Immunogenicity for CD8+ and CD4+ T cells of 2 formulations of an incomplete freund's adjuvant for multipeptide melanoma vaccines*. J Immunother, 2010. 33(6): 630-8.
282. Kuball, J., de Boer, K., Wagner, E., Wattad, M., Antunes, E., Weeratna, R.D., Vicari, A.P., Lotz, C., van Dorp, S., Hol, S., Greenberg, P.D., Heit, W., Davis, H.L., and Theobald, M., *Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909*. Cancer Immunol Immunother, 2011. 60(2): 161-71.
283. Scheibenbogen, C., Schadendorf, D., Bechrakis, N.E., Nagorsen, D., Hofmann, U., Servetopoulou, F., Letsch, A., Philipp, A., Foerster, M.H., Schmittel, A., Thiel, E., and Keilholz, U., *Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides*. Int J Cancer, 2003. 104(2): 188-94.
284. Waller, E.K., *The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy*. Oncologist, 2007. 12 Suppl 2: 22-6.
285. de la Cruz-Merino, L., Grande-Pulido, E., Albero-Tamarit, A., and Codes-Manuel de Villena, M.E., *Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges*. Oncologist, 2008. 13(12): 1246-54.
286. Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M.P., and Rivoltini, L., *Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients*. Ann Oncol, 2007. 18(2): 226-32.
287. Somani, J., Lonial, S., Rosenthal, H., Resnick, S., Kakhniashvili, I., and Waller, E.K., *A randomized, placebo-controlled trial of subcutaneous administration of GM-CSF as a vaccine adjuvant: effect on cellular and humoral immune responses*. Vaccine, 2002. 21(3-4): 221-30.
288. Bijker, M.S., Melief, C.J., Offringa, R., and van der Burg, S.H., *Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future*. Expert Rev Vaccines, 2007. 6(4): 591-603.
289. Izumoto, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Suzuki, T., Hashiba, T., Kagawa, N., Hashimoto, N., Maruno, M., Elisseeva, O.A., Shirakata, T., Kawakami, M., Oji, Y., Nishida, S., Ohno, S., Kawase, I., Hatazawa, J., Nakatsuka, S., Aozasa, K., Morita, S., Sakamoto, J., Sugiyama, H., and Yoshimine, T., *Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme*. J Neurosurg, 2008. 108(5): 963-71.
290. Morita, S., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Maruno, M., Izumoto, S., Osaki, T., Taguchi, T., Ueda, T., Myoui, A., Nishida, S., Shirakata, T., Ohno, S., Oji, Y., Aozasa, K., Hatazawa, J., Udaka, K., Yoshikawa, H., Yoshimine, T., Noguchi, S., Kawase, I., Nakatsuka, S., Sugiyama, H., and Sakamoto, J., *A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data*. Jpn J Clin Oncol, 2006. 36(4): 231-6.

291. Iiyama, T., Udaka, K., Takeda, S., Takeuchi, T., Adachi, Y.C., Ohtsuki, Y., Tsuboi, A., Nakatsuka, S., Elisseeva, O.A., Oji, Y., Kawakami, M., Nakajima, H., Nishida, S., Shirakata, T., Oka, Y., Shuin, T., and Sugiyama, H., *WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma*. *Microbiol Immunol*, 2007. 51(5): 519-30.
292. Vujanovic, L. and Butterfield, L.H., *Melanoma cancer vaccines and anti-tumor T cell responses*. *J Cell Biochem*, 2007. 102(2): 301-10.
293. Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., and Urban, W.J., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. 363(8): 711-23.
294. Apostolopoulos, V. and Marincola, F.M., *Methods to measure vaccine immunity*. *Expert Rev Vaccines*, 2010. 9(6): 545-6.
295. Wu, S., Jin, L., Vence, L., and Radvanyi, L.G., *Development and application of 'phosphoflow' as a tool for immunomonitoring*. *Expert Rev Vaccines*, 2010. 9(6): 631-43.
296. Butterfield, L.H., Disis, M.L., Khleif, S.N., Balwit, J.M., and Marincola, F.M., *Immuno-Oncology biomarkers 2010 and beyond: perspectives from the iSBTC/SITC biomarker task force*. *J Transl Med*, 2010. 8: 130.
297. Corbiere, V., Chapiro, J., Stroobant, V., Ma, W., Lurquin, C., Lethe, B., Van Baren, N., Van Den Eynde, B., Boon, T., and Coulie, P.G., *Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases*. *Cancer Res*, 2011.
298. Scheibenbogen, C., Letsch, A., Schmittel, A., Asemissen, A.M., Thiel, E., and Keilholz, U., *Rational peptide-based tumour vaccine development and T cell monitoring*. *Semin Cancer Biol*, 2003. 13(6): 423-9.
299. Rosenberg, S.A., *Shedding light on immunotherapy for cancer*. *N Engl J Med*, 2004. 350(14): 1461-3.
300. Schreiber, T.H., Raez, L., Rosenblatt, J.D., and Podack, E.R., *Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art*. *Semin Immunol*, 2010. 22(3): 105-12.
301. Brichard, V.G. and Lejeune, D., *Cancer immunotherapy targeting tumour-specific antigens: towards a new therapy for minimal residual disease*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. 8(7): 951-68.
302. Hoos, A., Ibrahim, R., Korman, A., Abdallah, K., Berman, D., Shahabi, V., Chin, K., Canetta, R., and Humphrey, R., *Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy*. *Semin Oncol*, 2010. 37(5): 533-46.
303. Weber, J., *Immunotherapy for melanoma*. *Curr Opin Oncol*, 2010. (Epub ahead of printing).
304. Cilloni, D., Renneville, A., Hermitte, F., Hills, R.K., Daly, S., Jovanovic, J.V., Gottardi, E., Fava, M., Schnittger, S., Weiss, T., Izzo, B., Nomdedeu, J., van der Heijden, A., van der Reijden, B.A., Jansen, J.H., van der Velden, V.H., Ommen, H., Preudhomme, C., Saglio, G., and Grimwade, D., *Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(31): 5195-201.
305. Hoos, A., Parmiani, G., Hege, K., Sznol, M., Loibner, H., Eggermont, A., Urban, W., Blumenstein, B., Sacks, N., Keilholz, U., and Nichol, G., *A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics*. *J Immunother*, 2007. 30(1): 1-15.
306. Copier, J., Ward, S., and Dalglish, A., *Cell based cancer vaccines: regulatory and commercial development*. *Vaccine*, 2007. 25 Suppl 2: B35-46.
307. Quaglino, P., Marenco, F., Osella-Abate, S., Cappello, N., Ortoncelli, M., Salomone, B., Fierro, M.T., Savoia, P., and Bernengo, M.G., *Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study*. *Ann Oncol*, 2010. 21(2): 409-14.
308. Phan, G.Q., Attia, P., Steinberg, S.M., White, D.E., and Rosenberg, S.A., *Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2001. 19(15): 3477-82.

309. Bouwhuis, M.G., Ten Hagen, T.L., Suci, S., and Eggermont, A.M., *Autoimmunity and treatment outcome in melanoma*. *Curr Opin Oncol*, 2010. (Epub ahead of printing).
310. Beck, K.E., Blansfield, J.A., Tran, K.Q., Feldman, A.L., Hughes, M.S., Royal, R.E., Kammula, U.S., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Kleiner, D., Quezado, M., Lowy, I., Yellin, M., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C., *Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*. *J Clin Oncol*, 2006. 24(15): 2283-9.
311. Rezvani, K., Grube, M., Brenchley, J.M., Sconocchia, G., Fujiwara, H., Price, D.A., Gostick, E., Yamada, K., Melenhorst, J., Childs, R., Hensel, N., Douek, D.C., and Barrett, A.J., *Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation*. *Blood*, 2003. 102(8): 2892-900.
312. Gao, L., Bellantuono, I., Elsasser, A., Marley, S.B., Gordon, M.Y., Goldman, J.M., and Stauss, H.J., *Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1*. *Blood*, 2000. 95(7): 2198-203.
313. Lesterhuis, W.J., Schreiber, G., Scharenborg, N.M., Brouwer, H.M., Gerritsen, M.J., Croockewit, S., Coulie, P.G., Torensma, R., Adema, G.J., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Punt, C.J., *Wild-type and modified gp100 peptide-pulsed dendritic cell vaccination of advanced melanoma patients can lead to long-term clinical responses independent of the peptide used*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. 60(2): 249-60.
314. Cebon, J., *Cancer vaccines: Where are we going?* *Asia Pac J Clin Oncol*, 2010. 6 Suppl 1: S9-15.
315. Nowak, A.K., Lake, R.A., Marzo, A.L., Scott, B., Heath, W.R., Collins, E.J., Frelinger, J.A., and Robinson, B.W., *Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells*. *J Immunol*, 2003. 170(10): 4905-13.
316. Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., Coutant, F., Metivier, D., Pichard, E., Aucouturier, P., Pierron, G., Garrido, C., Zitvogel, L., and Kroemer, G., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *J Exp Med*, 2005. 202(12): 1691-701.
317. Wallen, H., Thompson, J.A., Reilly, J.Z., Rodmyre, R.M., Cao, J., and Yee, C., *Fludarabine modulates immune response and extends in vivo survival of adoptively transferred CD8 T cells in patients with metastatic melanoma*. *PLoS One*, 2009. 4(3): e4749.
318. Finn, O.J., *Cancer immunology*. *N Engl J Med*, 2008. 358(25): 2704-15.
319. Alpdogan, O., Eng, J.M., Muriglan, S.J., Willis, L.M., Hubbard, V.M., Tjoe, K.H., Terwey, T.H., Kochman, A., and van den Brink, M.R., *Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation*. *Blood*, 2005. 105(2): 865-73.
320. Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., Lichtman, M.K., Gattinoni, L., Theoret, M.R., Grewal, N., Spiess, P.J., Antony, P.A., Palmer, D.C., Tagaya, Y., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., and Restifo, N.P., *IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(7): 1969-74.
321. Reddy, V., Meier-Kriesche, H.U., Greene, S., Schold, J.D., and Wingard, J.R., *Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. 11(9): 698-705.
322. Rapoport, A.P., Stadtmauer, E.A., Aqui, N., Badros, A., Cotte, J., Chrisley, L., Veloso, E., Zheng, Z., Westphal, S., Mair, R., Chi, N., Ratterree, B., Pochran, M.F., Natt, S., Hinkle, J., Sickles, C., Sohal, A., Ruehle, K., Lynch, C., Zhang, L., Porter, D.L., Luger, S., Guo, C., Fang, H.B., Blackwelder, W., Hankey, K., Mann, D., Edelman, R., Frasch, C., Levine, B.L., Cross, A., and June, C.H., *Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer*. *Nat Med*, 2005. 11(11): 1230-7.
323. Natsume, A., Wakabayashi, T., Tsujimura, K., Shimato, S., Ito, M., Kuzushima, K., Kondo, Y., Sekido, Y., Kawatsura, H., Narita, Y., and Yoshida, J., *The DNA*

- demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma.* Int J Cancer, 2008. 122(11): 2542-53.
324. Comin-Anduix, B., Chodon, T., Sazegar, H., Matsunaga, D., Mock, S., Jalil, J., Escuin-Ordinas, H., Chmielowski, B., Koya, R.C., and Ribas, A., *The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations.* Clin Cancer Res, 2010. 16(24): 6040-8.
325. Busse, A., Letsch, A., Scheibenbogen, C., Nonnenmacher, A., Ochsenreither, S., Thiel, E., and Keilholz, U., *Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination.* J Transl Med, 2010. 8: 5.

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel, der meine wissenschaftliche und klinische Arbeit großzügig unterstützt und gefördert hat, wertvolle wissenschaftliche Impulse gab und die Voraussetzung und Freiräume für die Entstehung dieser Arbeit geschaffen hat.

Frau Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen hat mich mit ihrem großen immunologischen Wissen sehr beeindruckt und mich mit außergewöhnlichem Engagement und ihrer unbegrenzten und freundschaftlichen Unterstützung enorm gefördert. Diese Habilitationsschrift steht daher auch für eine langjährige gemeinsame Faszination für die Tumormunologie und eine hervorragende Zusammenarbeit, für die ich außerordentlich dankbar bin.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Keilholz für seine kontinuierliche Förderung, seine sehr wertvollen Anregungen, kritischen Impulse, strategischen Hilfestellungen und seine enorme wissenschaftliche und klinische Expertise, die mich in meinem Werdegang sehr geprägt haben.

Ohne die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit mit vielen, sehr geschätzten Kollegen und Kooperationspartnern wären die hier vorliegenden Arbeiten nicht möglich gewesen. Herzlich danke ich daher: Dr. Geraldine Assfalg, PD Dr. Igor Wolfgang Blau, Dr. Antonia Busse, Dr. Michael Fluck, Dr. Alberto Fusi, Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann, PD Dr. Gero Hütter, Prof. Dr. Florian Kern, Robert Kudernatsch, Prof. Dr. Andreas Mackensen, Dr. Volker Mailänder, Dr. Il-Kang Na, PD Dr. Dirk Nagorsen, Anika Nonnenmacher, Dr. Sebastian Ochsenreither, Madlen Rother, Prof. Dr. Dirk Schadendorf, Dr. Gregor Schäfer-Hesterberg, Prof. Dr. Lutz Uharek, PD Dr. Christiane Voit und Prof. Dr. Hans-Dieter Volk, als sehr hilfreichen Mentor im Rahmen des Charité-Mentoringprogramms.

Ein besonderer Dank für die freundschaftliche, bereichernde und produktive Arbeit im Labor und unzählige Unterstützungen gilt Sandra Bauer, den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Susanne Döring, David Stather und Dr. Marcel Völker-Call sowie Dr. Anne Marie Asemissen und Dr. Maren Knödler, mit denen mich eine besondere Freundschaft verbindet.

Am Ende, aber genauso am Anfang, steht die große Liebe meiner Familie, die mich wachsen ließ, mich in einzigartiger Weise getragen, motiviert und geprägt hat und mir viel Rückhalt gab. Eure unermüdliche, großzügige und liebevolle Unterstützung und die dadurch geschaffenen Freiräume sind der wesentliche Grundstein dieser Arbeit.

ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin, 17.01.2011

Dr. Anne Letsch