

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Patienten und Kontrollpersonen**

#### **3.1.1 Kontrollgruppe**

Als freiwillige gesunde Spender (GS) stellten sich freundlicherweise Blutspender der Blutbank unserer Klinik des Uniklinikums Benjamin Franklin, Berlin, zur Verfügung. Es lagen Kontrollproben von 10 Frauen und 2 Männern im Alter von 23-46 Jahren vor (Mittelwert  $31,4 \pm 7,7$  Jahre).

#### **3.1.2 Kolorektales-Karzinom-Patienten**

Es wurden 54 KRK-Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei der Analyse des HLA-Typs zeigten 27 Patienten den HLA-A\*0201-Typ und konnten für die vorliegende Studie untersucht werden. Die Gruppe der untersuchten KRK-Patienten bestand aus 15 Frauen und 12 Männern. Das Alter der Patienten lag zwischen 38 und 85 Jahren (Mittelwert  $64,8 \pm 10,6$  Jahre). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme lagen Lymphknoten- oder Fernmetastasen bei 16 (59%) dieser Patienten vor (n = 4 Patienten im UICC-Stadium III; n = 12 Patienten im UICC-Stadium IV). Die weiteren 11 Patienten hatten eine nicht-metastasierte Erkrankung (UICC-Stadium II). Vierzehn der 27 KRK-Patienten hatten vor der Blutentnahme eine Chemotherapie erhalten. Die mediane Zeit seit letzter Chemotherapie-Administration dieser Population lag bei 11 Monaten (Intervall 1-111). Das eingesetzte Chemotherapeutikum war - als Standardtherapie beim KRK - in der Regel 5-FU. Die medianen Zeiten seit primärer Tumorresektion und Strahlentherapie lagen bei 24 Monaten (primäre Tumorresektion, Intervall 5-120), bzw. bei 17 Monaten (Radiatio, Intervall 1-119). Nähere Angaben sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Von einer Patientin war es möglich, Blut vor und nach Gabe vom monoklonalen Anti-Ep-CAM-Antikörper Panorex® (Edrecolomab) zu gewinnen. (siehe Tabelle 3.4)

### 3.1.3 Mammakarzinom-Patienten

Es konnten 46 Patienten mit MK für die vorliegende Untersuchung gewonnen werden. Hiervon wiesen 20 Patienten (19 Frauen und ein Mann (M18)) den HLA-A\*0201-Typ auf. Das Alter dieser Patienten lag zwischen 32 bis 73 Jahren (Mittelwert  $56,3 \pm 12,3$  Jahre). Lymphknoten- oder Fernmetastasen lagen bei 16 der 20 Patienten vor (80%).

Die medianen Zeiten seit primärer Tumorresektion und Strahlentherapie lagen bei 4 bzw. 6,5 Monaten (primäre Tumorresektion, Intervall 1-99 Monate; Radiatio, Intervall 2-42 Monate). Die mediane Zeit seit der letzten Chemotherapie-Administration der MK-Patienten lag bei 4 Monaten (Intervall: 1-94 Monate). Die Chemotherapie bestand, soweit nicht anders in Tabelle 3.2 vermerkt, aus einem Alkylanz (meist Cyclophosphamid, seltener Iphosphamid) in Kombination mit anthrazyklinhaltigen Medikamenten (Epirubicin, Doxorubicin, Adriamycin; Farmorubicin).

Bei drei Patientinnen (M4, M13, M17) wurden die Taxane Taxotere oder Paclitaxel als Chemotherapeutika eingesetzt, die bei Versagen der Anthracyclin-Therapie oder in Kombination mit Trastuzumab (Herceptin®) indiziert sind.

Die Patientin M4 erhielt zusätzlich zur Standard-Therapie Metotrexat und 5-FU.

Vier der Patientinnen hatten vor der Blutentnahme außerdem Tamoxifen erhalten (M3, M8, M9, M15). Eine weitere Patientin erhielt eine 10-monatige Tamoxifen-Therapie, die vier Wochen vor der ersten Blutentnahme beendet wurde (M4).

Eine Patientin, M6, wies zusätzlich zum MK (ED 1999) ein Endometriumkarzinom mit rezidivierender kranieller Metastasierung auf (ED 1995). Das Endometriumkarzinom war zum Zeitpunkt der Blutentnahmen nicht nachweisbar. Keine andere MK-Patientin litt an einer zweiten malignen Erkrankung.

Außerdem war es möglich, zusätzliche Blutproben von vier Patientinnen vor und nach Therapie mit dem monoklonalen anti-her-2/neu-Antikörper Herceptin® (Trastuzumab) zu gewinnen (M4, M5, M6, M10). Weitere eingesetzte Medikamente waren bei je zwei Patientinnen Hormonantagonisten und Pamidronat. Die nähere Patientencharakterisierung ist den Tabellen 3.2 und 3.4 zu entnehmen. Ein Vergleich beider Patientengruppen in Bezug auf Alter und die relevanten Prognosefaktoren: Tumorstadien und Vortherapien zeigt, daß beide Gruppen ähnlich distribuiert und daher gut vergleichbar sind. (Siehe Tabelle 3.3)

**Tabelle 3.1**

KRK-Patienten-Charakteristika, Tumorstatus und Vortherapien zum Zeitpunkt der Analyse

Patient	Alter	Stadium	LK- / Fern- metastasen	Vortherapien				Zeit seit letzter Therapie in Monaten
				OP	Radiatio	Chemo	andere	
K 1	68	II	n	j	j	j	n	OP 19 R 13 C 13
K 2	62	II	n	j	n	n	n	OP 21
K 3	58	IV	j	j	j	j	n	OP 5 R 1 C 1
K 4	72	II	n	j	n	n	n	OP 84
K 5	81	II	n	j	n	j	n	OP 23 C 17
K 6	81	II	n	j	j	j	n	OP 111 R 106 C 111
K 7	54	IV	j	n	n	j	n	C Irino 1
K 8	55	IV	j	n	n	j	n	C Irino 1
K 9	38	II	n	n	n	n	n	keine
K 10	61	II	n	n	n	n	n	keine
K 11	73	II	n	n	n	n	n	keine
K 12	65	IV	j	j	j	j	n	OP 40 R 60 C 35
K 13	64	II	n	j	n	n	n	OP 89
K 14	55	IV	j	j	n	j	n	OP 95 C 7
K 15	54	III	j	j	j	n	n	OP 18 R 17
K 16	71	III	j	n	n	n	n	keine
K 17	71	IV	j	j	n	j	n	OP 26 C 18
K 18	75	II	n	j	n	n	n	OP 24
K 19	85	IV	j	j	n	n	n	OP 19
K 20	75	IV	j	j	j	j	n	OP 8 R 9 C 9
K 21	62	IV	j	n	j	j	n	R 2 C 2
K 22	64	IV	j	j	n	j	n	OP 24 C 18
K 23	54	III	j	j	j	j	n	OP 48 R 40 C 40
K 24	49	II	n	n	n	n	n	keine
K 25	63	IV	j	j	n	n	n	OP 9
K 26	66	IV	j	j	n	j Irinotecan	n	OP 26 C 1
K 27	74	III	j	j	j	n	n	OP 120 R 119

Fortsetzung Tabelle 3.1

			<b>LK- metastasen</b>	<b>Fern- metastasen</b>	<b>OP</b>	<b>Radiatio</b>	<b>Chemo</b>	<b>andere</b>
		<b>Summe</b>	5/27	11/27	19/27	9/27	14/27	0
	<b>Alter</b>							
<b>Intervall</b>	38-85	<b>Mediane Zeit seit Therapie</b>			24	17	11	0
<b>Mittelwert</b>	64,8	<b>Mittelwert</b>			42,6	40,8	19,6	0
<b>Standard- abweichung</b>	± 10,6	<b>Intervall</b>			5-120	1-119	1-111	0

Legende zu Tabelle 3.1

soweit nicht anders angegeben: Chemotherapie = 5 FU + Folinsäure

IriNo = Irinotecan (Topoisomerase-Inhibitor)

j = ja

K = KRK-Patienten 1-27

LITT = Laser-induzierte Thermotherapie

LK = Lymphknoten

n = nein

**Tabelle 3.2**

MK-Patienten-Charakteristika, Tumorstatus und Vortherapien zum Zeitpunkt der Analyse

Patient	Alter	her-2- neu- Score	LK- / Fern- metastasen	Vortherapien				Zeit seit letzter Therapie in Monaten
				OP	Radiatio	Chemo	andere	
M 1	43	n.b.	j	j	n	j	n	OP 5 C 4
M 2	57	positiv	j	j	n	n	n	OP 1
M 3	69	n.b.	j	j	n	n	Tamoxifen	OP 87
M 4 *	53	positiv	j	j	j	j 4x Standard 3x CMF 3x6 Taxol	Tamoxifen  Pamidronat	OP5 C 16 R 5
M 5 *	51	positiv	j	j	n	n	n	OP 3
M 6 *	69	positiv	j	j	j	j	n	OP 3 R 2 C 18
M 7	60	negativ	j	n	n	n	Hormon- antagonist	
M 8	66	negativ	n	j	j	n	Tamoxifen	OP + R 8
M 9	56	n.b.	j	j	n	j	Tamoxifen Pamidronat	OP 99 C 94
M 10 * <sup>2</sup>	67	positiv	j	j	n	j	Hormon- antagonist	OP 25 C 16
M 11	33	n.b.	j	j	n	j	n	OP 2 C 1
M 12	73	n.b.	n	n	n	n	n	keine
M 13	69	negativ	j	n	n	j neoadj. C 2x Docetaxel	n	neoadj. C 4 Docetaxel 1
M 14	44	n.b.	j	j	n	j	n	OP 6 C 1
M 15	65	negativ	j	j	n	j	Tamoxifen	OP 1 C 1
M 16	32	n.b.	j	j	n	n	n	OP 1
M 17	60	positiv	n	n	n	j neoadj. C 2x Docetaxel	n	neoadj. C 3 Docetaxel 1
M 18	55	n.b.	j	j	n	n	n	OP 2
M 19	38	n.b.	j	j	n	j	n	OP 2 C 3
M 20	66	n.b.	n	j	n	n	n	OP 45 R 42
			LK- / Fern- metastasen	OP	Radiatio	Chemo	andere	
	Alter	Summe	16/20	16/20	4/20	11/20	7/20	
<b>Intervall</b>	32-73	<b>Mediane Zeit seit Therapie</b>		4	6,5	4		
<b>Mittelwert</b>	56,3	<b>Mittelwert</b>		18,4	14,3	14,6		
<b>Standard- abweichung</b>	± 12,3	<b>Intervall</b>		1-99	2-42	1-94		

Legende zu Tabelle 3.2

soweit nicht anders angegeben: Standard-Chemotherapie = Cyclophosphamid (oder Iphosphamid) + anthracyklinhaltige Chemotherapeutika

\*Zeit seit Therapie bei Patienten, die mehrmals getestet wurden, bezogen auf 1. Blutentnahme (M4; M5; M6; M10)

CMF = Cyclophosphamid-Metotrexat-5FU

j = ja

LK = Lymphknoten

M = MK-Patienten 1-20

n = nein

n.b. = nicht bekannt

neoadj. = neoadjuvant

**Tabelle 3.3**

Patientenstatus von KRK- und MK-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme

<b>Charakteristika</b>	<b>Patientengruppe</b>	
	<b>KRK</b>	<b>MK</b>
<b>durchschnittliches Alter (MW)</b>	64,8	56,3
<b>Geschlecht Frauen/Männer</b>	15/12	19/1
<b>LK-/ Fernmetastasen</b>	16/27 59%	16/20 80%
<b>primäre Tumorresektion</b>	19/27 70%	16/20 80%
<b>Radiatio</b>	9/27 33%	4/20 20%
<b>Chemotherapie</b>	14/27 52%	11/20 51%

**Tabelle 3.4**

Patienten-Charakteristika, Tumorstatus und Vortherapien bei KRK- und MK-Patienten mit mehrmaligen Analysen bei Antikörpertherapie

Patient	Alter	her-2-neu Score	LK- / Fern-metastasen	Vortherapien				Zeit seit letzter Therapie in Monaten
				OP	Radiatio	Chemo	andere	
M 4	53	positiv	j	j	j	j 4x Standard 3x CMF	Tamoxifen Pamidronat	OP 5 R 5 C 16
						3x6 Taxol	Herceptin®	OP+R 6 C 17
							Herceptin®	OP+R 9 C 19
M 5	51	positiv	j	j	n	n	n	OP 3
							Herceptin®	OP 4
							Herceptin®	OP 6,5
M 6	69	positiv	j	j	j	j	n	OP 3 R 2 C 18
							Herceptin®	OP 3,5 R 2,5 C 18,5
							Herceptin®	OP 6,5 R 5,5 C 21,5
M 10	67	positiv	j	j	n	j	Tamoxifen	OP 25 C 16
							Herceptin®	OP 25,5 C 16,5
							Herceptin®	OP 26 C 17
							4. Zyklus Herceptin®	OP 27 C 18
K 15	54	n.b.	j	j	j	n	n	OP 18 R 17
							j 1. Zyklus Panorex®	Panorex® 1 OP 19 R 18
							j 4. Zyklus Panorex®	Panorex® 2 Wochen OP 21 R 20

Legende zu Tabelle 3.4

soweit nicht anders angegeben: Standard-Chemotherapie = Cyclophosphamid (oder Iphosphamid) + anthracyklinhaltige Chemotherapeutika

CMF = Cyclophosphamid-Metotrexat-5FU

j = ja

K = KRK-Patient

LK = Lymphknoten

M = MK-Patient

n = nein

n.b. = nicht bekannt

neoadj. = neoadjuvant

## **3.2 T-Zell-Antworten**

### **3.2.1 T-Zell-Antworten gesunder HLA-A\*0201-positiver Kontrollpersonen gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza**

Um das mögliche Auftreten von Autoreaktivität gegen die auch in normalem Gewebe niedrig exprimierten tumorassoziierten Antigene EpCAM, her-2/neu und CEA zu analysieren, wurde zunächst die Frequenz TAA-reaktiver T-Zellen bei gesunden Individuen bestimmt. Hierzu wurde die Anzahl an IFN- $\gamma$ -sezernierenden T-Zellen nach Antigenkontakt im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay ermittelt. Um einen Vergleichswert der T-Zell-Antworten in einer gesunden Population zu erheben, wurden darüber hinaus T-Zell-Antworten gegen das HLA-A\*0201-restringierte Epitop des Influenza-Matrix-Proteins getestet. Keine der Kontrollpersonen war reaktiv gegen die drei getesteten Tumorantigene. Bei 6 der 12 Kontrollpersonen (50%) wurden signifikante T-Zell-Antworten gegen das Influenza-Peptid gemessen. Diese reichten von 18 bis 115 (Median 28; Mittelwert 42,8) spezifischen T-Zellen pro  $1 \times 10^6$  PBMC.

Als Positiv-Kontrolle für die Funktionsfähigkeit der T-Zellen diente PWM, gegen das 110 bis 511 spezifische T-Zellen pro  $1.67 \times 10^5$  PBMC vorlagen (Median 313,5; Mittelwert 312,33).

Die Tabelle 3.5 und die Abbildung 3.1 zeigen die Ergebnisse der T-Zell-Antworten der 12 gesunden Kontrollpersonen gegen die im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay getesteten Epitope.

### **3.2.2 Spontane T-Zell-Antworten HLA-A\*0201-positiver Kolorektales-Karzinom-Patienten gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza**

Es wurden die T-Zell-Antworten von 27 HLA-A\*0201-positiven KRK-Patienten mit unterschiedlichen Tumor-Stadien gegen HLA-A\*0201-restringierte Peptide der TAA EpCAM, her-2/neu und CEA, sowie gegen Influenza im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay getestet. Fünf dieser Patienten (18,5%) wiesen eine signifikante T-Zell-Antwort gegen mindestens eines der Peptide auf. Im Einzelnen wurden Antworten gegen Ep-CAM (n = 3; K6, K7, K19), gegen her-2/neu (n = 2; K5, K19) und gegen CEA (n = 2; K4, K19) verzeichnet.

Drei der reaktiven Patienten befanden sich in Stadium II (K4, K5, K6), die beiden anderen Patienten (K7, K19) in Stadium IV der KRK-Erkrankung.

Ausschließlich Patient K19 wies T-Zell-Antworten gegen alle drei getesteten Peptide auf, während sich die T-Zell-Antworten der anderen vier Patienten gegen jeweils nur ein Peptid richteten.

Bei Patienten, bei denen ausreichend PBMC für weitere Untersuchungen gewonnen werden konnten, wurde eine Analyse der T-Zell-Antworten gegen Influenza durchgeführt.

Dies ergab bei 9 der 16 (56,3%) auf Influenza getesteten KRK-Patienten signifikante Werte. Die Anzahl an IFN- $\gamma$ -sezernierenden T-Zellen reichte von 10 bis 80 pro  $1 \times 10^6$  PBMC (Median 13; Mittelwert 25,7). Die Antwort gegen PWM als Positiv-Kontrolle lag im Intervall von 107 bis 703 reaktiven T-Zellen pro  $1,67 \times 10^5$  PBMC (Median 307; Mittelwert 363).

Alle T-Zell-Antworten der KRK-Patienten sind in Tabelle 3.6 und der Abbildung 3.1 aufgelistet.

### **3.2.3 Spontane T-Zell-Antworten HLA-A\*0201-positiver Mammakarzinom-Patienten gegen tumorassoziierte Antigene und Influenza**

Die T-Zell-Reaktivität von 20 HLA-A\*0201-positiven MK-Patientinnen gegen Peptid-Epitope der drei TAA und Influenza wurde analysiert. Keiner der MK-Patienten zeigte signifikante Frequenzen an IFN- $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen als Reaktion auf die getesteten TAA-Peptide. Zehn MK-Patientinnen wurden auf das Vorhandensein influenzagerichteter T-Zell-Antworten getestet. Bei 7 Patientinnen ergaben sich signifikante T-Zell-Antworten (70%). Diese lagen im Intervall von 12 bis 199 spezifischen T-Zellen pro  $1 \times 10^6$  Zellen (Median 25; Mittelwert 51). Die Antwort gegen PWM lag zwischen 104 bis 563 IFN- $\gamma$ -sezernierenden T-Zellen pro  $1,67 \times 10^5$  PBMC (Median 345; Mittelwert 362,3).

Die einzelnen T-Zell-Antworten aller MK-Patienten sind der Tabelle 3.7 und der Abbildung 3.1 zu entnehmen.

### **3.2.4 Statistische Analyse**

Die Daten beider Patienten-Gruppen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test analysiert.

Der statistische Vergleich positiver T-Zell-Antworten von KRK-Patienten (5/27) und MK-Patientinnen (0/20) zeigt, daß dieser Unterschied signifikant ist ( $p=0,042$ ). Dieser Vergleich ist als deskriptiv zu werten.

**Tabelle 3.5**T-Zell-Antworten gesunder HLA-A2+ Kontrollpersonen gegen TAA im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay

Spender	Alter	T-Zell-Antworten in Spots pro $1 \times 10^6$ PBMC							
		Hintergrund	EpCAM p 263-271	her-2/neu p 654-662	her-2/neu p 369-377	her-2/neu p 883-899	CEA p 571-579	Influenza p 58-66	PWM*
		Hintergrund subtrahiert							
GS 1	26	0	5	3	1	2	3	<b>18</b> p=0.0004	286
GS 2	44	2	0	0	0	0	1	7	326
GS 3	24	4	0	1	3	0	1	<b>22</b> p=0.00005	387
GS 4	36	2	3	1	1	0	0	4	420
GS 5	23	15	6	0	3	2	0	<b>34</b> p=0.003	301
GS 6	25	3	0	0	0	0	0	7	152
GS 7	36	6	0	0	0	0	0	11	366
GS 8	24	2	0	0	0	0	0	0	110
GS 9	26	4	0	0	0	0	0	<b>47</b> p=0.000003	270
GS 10	33	1	6	3	2	0	0	<b>115</b> p=0.00004	361
GS 11	46	1	7	1	0	3	4	<b>21</b> p=0.001	511
GS 12	34	3	0	0	0	0	0	0	258
Intervall	23-46	<b>positive Antworten</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>	<b>6/12</b>	<b>12/12</b>
Mittelwert	31,4	Intervall	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	18-115	110-511
Standardabw.	7,7	Median	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	28	313,5
		Mittelwert	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt	42,8	312,33

Legende zu Tabelle 3.5\* PWM bezogen auf  $1.67 \times 10^5$  PBMC

GS = gesunde Spender

**Tabelle 3.6**T-Zell-Antworten HLA-A2+ KRK-Patienten gegen TAA und Influenza im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay

Patient	Stadium	T-Zell-Antworten in Spots pro $1 \times 10^6$ PBMC					
		Hintergrund	EpCAM p 263-271	her-2/neu p 654-662	CEA p 571-579	Influenza	PWM* <sup>1)</sup>
		Hintergrund subtrahiert					
K 1	II	12	0	0	0	11	439
K 2	II	2	5	6	7	<b>23</b> p=0.0008	533
K 3	IV	28	6	4	2	n.d.	374
K 4	II	13	8	0	<b>10</b> p=0.016	<b>10</b> p=0.0508	187
K 5	II	12	0	<b>11</b> p=0.013	8	<b>13</b> p=0.04	211
K 6	II	5	<b>15</b> p=0.008	0	2	n.d.	227
K 7	IV	93	<b>77</b> p=0.015	0	16	<b>80</b> p=0.01	310
K 8	IV	13	1	6	7	8	308
K 9	II	8	0	6	0	<b>12</b> p=0.02	272
K 10	II	10	0	0	0	18	491
K 11	II	22	0	0	0	n.d.	630
K 12	IV	0	3	0	1	n.d.	210
K 13	II	0	1	1	4	<b>13</b> p=0.002	585
K 14	IV	8	10	0	3	n.d.	295
K 15* <sup>2)</sup>	III	6	0	6	0	n.d.	306
K 16	III	1	1	5	4	6	107
K 17	IV	5	0	0	0	n.d.	180
K 18	II	1	6	1	0	<b>12</b> p=0.007	286
K 19	IV	24	<b>20</b> p=0.037	<b>27</b> p=0.0069	<b>23</b> p=0.009	n.d.	592
K 20	IV	48	0	0	0	0	132
K 21	IV	15	3	0	0	n.d.	533
K 22	IV	18	0	0	0	n.d.	514
K 23	III	6	7	0	0	2	703
K 24	II	10	0	0	0	<b>39</b> p=0.0001	303
K 25	IV	12	0	0	9	n.d.	298
K 26	IV	20	0	0	0	0	307
K 27	III	32	4	9	0	<b>29</b> p=0.003	467
	<b>positive Antworten</b>		<b>3/27</b>	<b>2/27</b>	<b>2/27</b>	<b>9/16</b>	<b>27/27</b>
	Intervall		15-77	11-27	10-23	10-80	107-703
	Median		20	19	16,5	13	307
	Mittelwert		37,3	19	16,5	25,7	362,96

Legende zu Tabelle 3.6\*<sup>1)</sup> PWM bezogen auf  $1.67 \times 10^5$  PBMC\*<sup>2)</sup> Hier nur 1. Blutentnahme aufgeführt

K= KRK-Patienten 1-27; n.d. = nicht durchgeführt

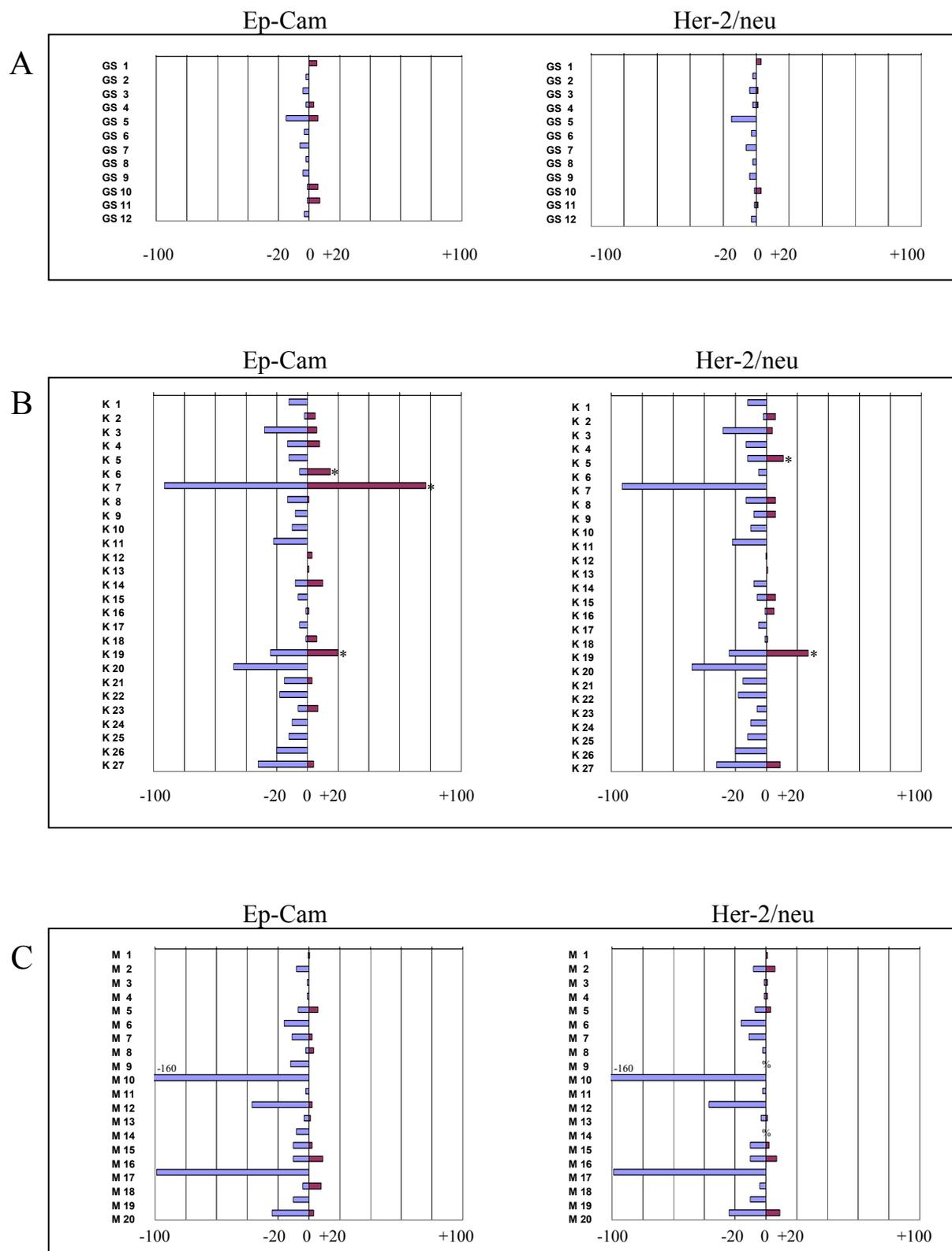
**Tabelle 3.7**T-Zell-Antworten HLA-A2+ MK-Patienten gegen TAA und Influenza im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay

Patient	her-2-neu-Score	T-Zell-Antworten in Spots pro $1 \times 10^6$ PBMC					
		Hintergrund	EpCAM p 263-271	her-2/neu p 654-662	CEA p 571-579	Influenza	PWM* <sup>1)</sup>
		Hintergrund subtrahiert					
M 1	n.b.	0	0	1	0	n.d.	362
M 2	positiv	8	0	6	2	<b>15</b> p=0.008	466
M 3	n.b.	1	0	1	1	<b>12</b> p=0.024	437
M 4 * <sup>2)</sup>	positiv	1	0	1	0	7	218
M 5 * <sup>2)</sup>	positiv	7	6	3	2	<b>25</b> p=0.009	258
M 6 * <sup>2)</sup>	positiv	16	0	0	12	<b>26</b> p=0.01	240
M 7	negativ	11	2	0	n.d.	n.d.	119
M 8	negativ	2	3	0	n.d.	n.d.	516
M 9	n.b.	12	0	n.d.	0	n.d.	487
M 10 * <sup>2)</sup>	positiv	160	0	0	0	26	104
M 11	n.b.	2	0	0	0	<b>57</b> p=0.05x10 <sup>-6</sup>	328
M 12	n.b.	37	2	0	n.d.	n.d.	210
M 13	negativ	3	1	1	3	n.d.	466
M 14	n.b.	8	0	n.d.	6	n.d.	321
M 15	negativ	10	2	2	5	4	542
M 16	n.b.	10	9	8	9	<b>199</b> p=6,68x10 <sup>-8</sup>	328
M 17	positiv	99	0	0	0	n.d.	429
M 18	n.b.	4	8	0	1	n.d.	539
M 19	n.b.	10	0	0	0	<b>23</b> p=0.022	563
M 20	n.b.	24	3	9	0	n.d.	313
	<b>positive Antworten</b>		<b>0/20</b>	<b>0/18</b>	<b>0/17</b>	<b>7/10</b>	<b>20/20</b>
	Intervall		entfällt	entfällt	entfällt	12-199	104-563
	Median		entfällt	entfällt	entfällt	25	345
	Mittelwert		entfällt	entfällt	entfällt	51	362,3

Legende zu Tabelle 3.7\*<sup>1)</sup> PWM bezogen auf  $1.67 \times 10^5$  PBMC\*<sup>2)</sup> Hier nur 1. Blutentnahme aufgeführt (M4; M5; M6; M10)

M= MK-Patienten 1-20

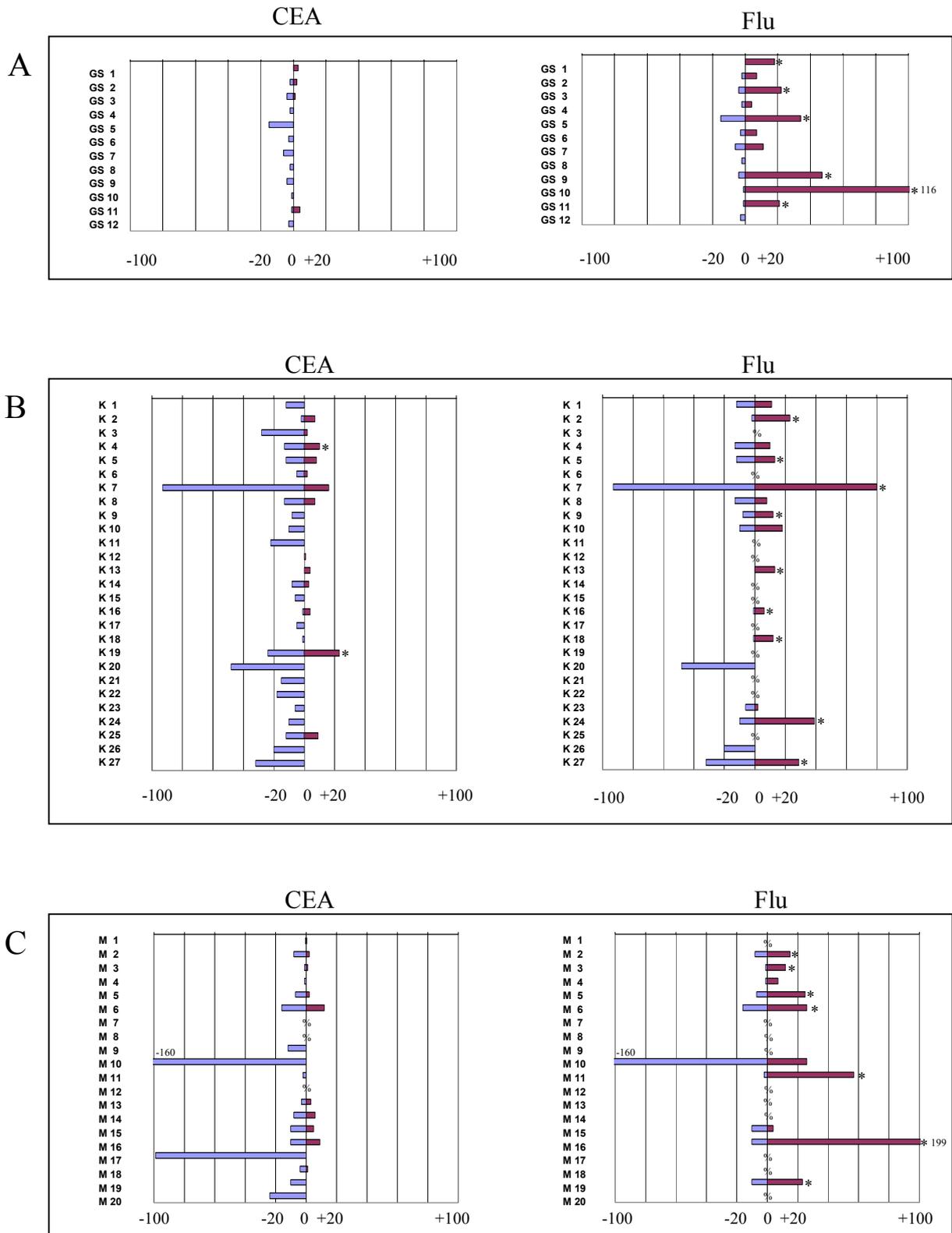
n.d. = nicht durchgeführt



**Abb. 3.1a)** IFN $\gamma$ -sezernierende T-Zellen pro 10<sup>6</sup> PBMC

Legende zu Abb. 3.1

A= Gruppe der gesunden Spender; B= Gruppe der KHK-Patienten; C= Gruppe der MK-Patienten  
 GS= gesunder Spender; K= KHK-Patient; M= MK-Patient; \* = signifikant; % = nicht durchgeführt



**Abb. 3.1b)** IFN $\gamma$ -sezernierende T-Zellen pro 10<sup>6</sup> PBMC

Legende zu Abb. 3.1

A= Gruppe der gesunden Spender; B= Gruppe der KRK-Patienten; C= Gruppe der MK-Patienten

GS= gesunder Spender; K= KRK-Patient; M= MK-Patient; \* = signifikant; % = nicht durchgeführt

### **3.3 T-Zell-Antworten unter spezifischer Antikörper-Therapie**

#### **3.3.1 T-Zell-Antworten unter Herceptin®-Therapie**

Es wurden bei vier MK-Patientinnen (M4, M5, M6, M10), die im Anschluß an die erste Blutentnahme erstmalig Herceptin® erhielten, im Abstand von zwei bis elf Wochen weitere Blutproben entnommen, um die Induktion einer tumorgerichteten T-Zell-Antwort durch den verabreichten monoklonalen Anti-her-2/neu-Antikörper (Herceptin®) zu überprüfen.

Um bei dieser Fragestellung ein erweitertes Spektrum an Peptid-Epitopen zu untersuchen, testeten wir neben dem her-2/neu-Epitop p654-662 (IISAVVGIL) zusätzlich die beiden her-2/neu-Epitope her-2/neu 9-mer p369-377 (KIFGSLAFL) und her-2/neu 17-mer p883-899 (KVPIKWMALESILRRRF). Bei der Patientin M10 konnten wir nach zweimonatiger Therapie mit Herceptin® (4 Zyklen) eine T-Zell-Reaktivität gegen zwei her-2/neu-Peptide (p 369-377; p 883-899) und ein Ep-CAM-Epitop detektieren. (Siehe Tabelle 3.8 und Abb 3.2) Die anderen drei Patientinnen zeigten unter der Herceptin®-Therapie keine signifikanten T-Zell-Antworten, weder gegen her-2/neu, noch gegen Ep-CAM oder CEA. (siehe Tabelle 3.8)

#### **3.3.2. T-Zell-Antworten unter Panorex®-Therapie**

Bei der KRK-Patientin K15, die den monoklonalen anti-Ep-CAM-Antikörper Panorex® erhielt, wurde die Analyse einer Tumor-gerichteten T-Zell-Antwort an insgesamt drei Zeitpunkten durchgeführt, mit der Fragestellung, ob eine Induktion der T-Zell-Antwort gegen TAA durch Panorex® möglich ist. Die Blutentnahmen erfolgten vor Panorex®-Therapie, nach dem ersten Zyklus und nach dem vierten Zyklus. Weder vor noch unter Panorex®-Therapie waren signifikante T-Zell-Antworten gegen Ep-CAM, her-2/neu oder CEA nachweisbar. (Siehe hierzu auch Tabelle 3.8)

**Tabelle 3.8**

T-Zell-Antworten gegen TAA im IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Assay von HLA-A2+ KRK-Patienten und MK-Patienten unter spezifischer Antikörper-Therapie

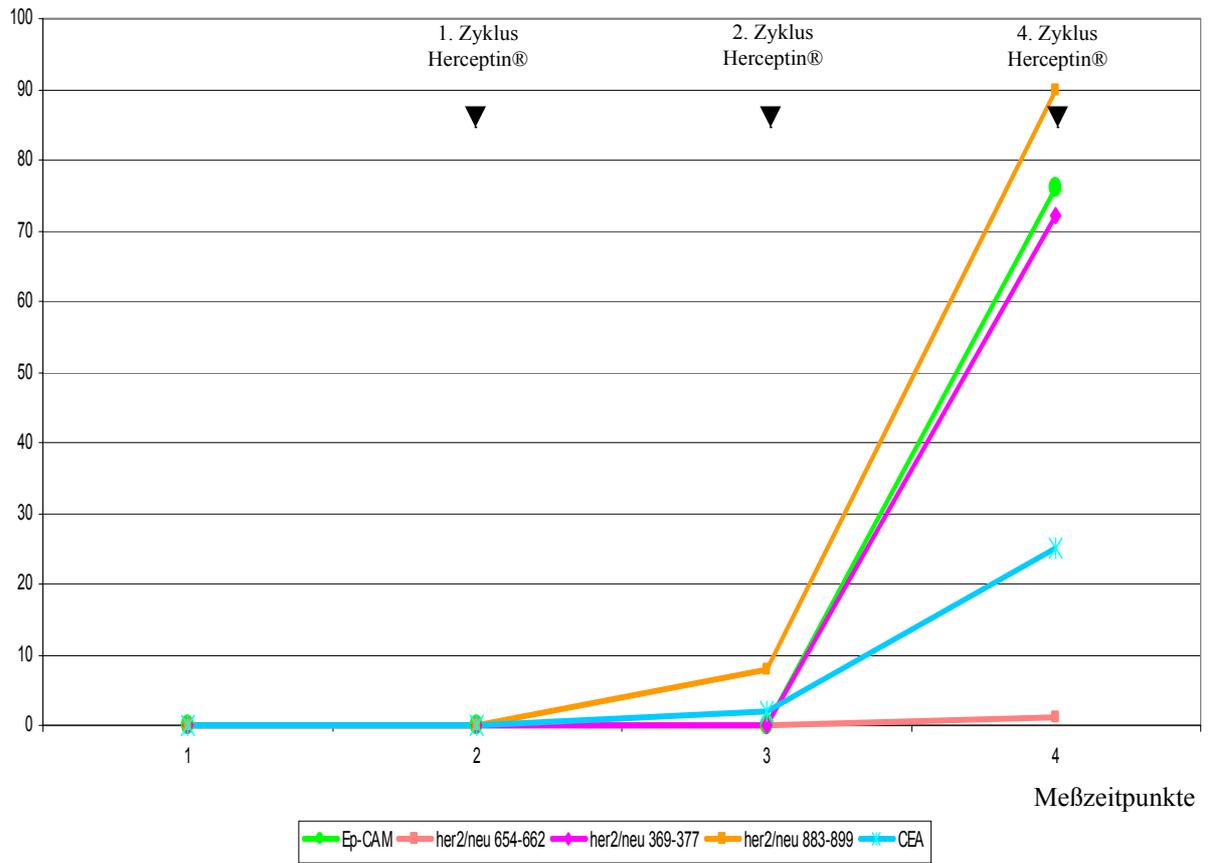
Patient	BE	T-Zell-Antworten in Spots pro $1 \times 10^6$ PBMC								
		Hintergrund	EpCAM p 263-271	her-2/neu p 654-662	her-2/neu p 369-377	her-2/neu p 883-899	CEA p 571-579	Influenza	PWM*	
			Hintergrund subtrahiert							
<b>M 4</b>	1	1	0	1	4	3	0	7	218	
Herceptin®	2	0	n.d.	0	0	2	n.d.	n.d.	58	
Herceptin®	3	5	0	0	0	0	0	n.d.	67	
<b>M 5</b>	1	7	6	3	4	6	2	<b>25</b> p=0.009	258	
Herceptin®	2	4	0	0	1	0	0	n.d.	695	
Herceptin®	3	4	5	1	0	0	4	n.d.	630	
<b>M 6</b>	1	16	0	0	3	0	12	<b>26</b> p=0.01	240	
Herceptin®	2	12	0	0	2	0	n.d.	n.d.	313	
Herceptin®	3	6	n.d.	0	1	3	n.d.	n.d.	371	
<b>M 10</b>	1	160	0	0	0	0	0	26	104	
Herceptin®	2	94	0	0	0	0	0	n.d.	185	
Herceptin®	3	21	0	0	0	8	2	n.d.	171	
Herceptin® (2 Zyklen)	4	71	<b>76</b> p=0.0005	1	<b>72</b> p=0.0025	<b>90</b> p=0.0009	25 p=0.08	n.d.	101	
<b>K 15</b>	1	6	0	6	n.d.	n.d.	0	n.d.	306	
Panorex®	2	3	0	0	n.d.	n.d.	2	n.d.	375	
Panorex®	3	3	0	3	n.d.	n.d.	0	n.d.	633	

Legende zu Tabelle 3.8

\* PWM bezogen auf  $1.67 \times 10^5$  PBMC

BE = Blutentnahme; K= KRK-Patient; M= MK-Patient; n.d. = nicht durchgeführt

IFN $\gamma$ -sezernierende T-Zellen pro 10<sup>6</sup> PBMC



**Abb. 3.2** Patientin M10: T-Zell-Antworten zu vier verschiedenen Meßzeitpunkten, vor und unter Herceptin®-Therapie