

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Universität zu Köln
Klinik I für Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek**

**Diagnose und experimentelle Therapie minimaler Resterkrankung
bei malignen Tumoren**

Diagnosis and experimental therapy of minimal residual disease in malignant tumors

**Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Innere Medizin
an der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von
Dr. med. Martin Robert Weihrauch
aus Phoenix / AZ, USA**

Köln 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Summary	4
3	Einleitung	5
3.1	Diagnose der minimalen Resterkrankung	5
3.1.1	Detektion minimaler Resterkrankung mittels „molecular imaging“.....	6
3.1.2	Detektion minimaler Resterkrankung durch Bestimmung von Zytokinprofilen.....	8
3.1.3	Detektion minimaler Resterkrankung mittels Einzelzellnachweis.....	9
3.2	Experimentelle Therapie der minimalen Resterkrankung	10
3.2.1	Das Tumorantigen CAP-1 / CAP1-6D.....	12
3.2.2	CpG-ODN als Adjuvans.....	13
4	Eigene Forschungsarbeiten	14
4.1	Detektion minimaler Resterkrankung mittels molecular Imaging	14
4.1.1	FDG-PET detektiert aktive Hodgkin Tumoren.....	14
4.1.2	FDG-PET detektiert minimale Resterkrankung bei mediastinalen HL-Tumoren und zeigt einen hohen negativ prädiktiven Wert.....	16
4.2	Identifikation von Zytokinen und Chemokinen beim Hodgkin Lymphom	18
4.3	Das Chemokin TARC eignet sich zur Detektion minimaler Resterkrankung beim Hodgkin Lymphom	20
4.4	Immunmagnetische Anreicherung und Detektion von minimaler Resterkrankung ist der Immunzytologie überlegen	23
4.5	Detektion minimaler Resterkrankung und Korrelation mit klinischen Parametern beim kolorektalen Karzinom	25
4.6	Detektion und prognostische Bedeutung minimaler Resterkrankung beim Mammakarzinom	28
4.7	Experimentelle Immuntherapie der minimalen Resterkrankung beim kolorektalen Karzinom	30
4.7.1	Behandlung, Toxizität und klinisches Ansprechen.....	32
4.7.2	Immunologisches Ansprechen auf die Vakzinationstherapie.....	33
4.7.3	Erhöhte Frequenz von regulatorischen CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ T _{reg} Zellen vor Therapie.....	36
4.7.4	Einfluss der Chemotherapie auf die spezifische T-Zellantwort.....	36
4.7.5	Eine CAP-1 spezifische T-Zelllinie kann durch wiederholte CAP1-6D-Stimulation generiert werden.....	38
5	Ausblick	40
6	Danksagung	41
7	Literatur	42

1 Zusammenfassung

Das Verbleiben von malignen Tumorzellen im Körper nach erfolgter Therapie wird als „minimale Resterkrankung“ (MRD) bezeichnet und entscheidet bei einer Vielzahl von Patienten über die Prognose. Die MRD bildet Lokalrezidive oder Fernmetastasen, welche eine kurative Therapie häufig unmöglich machen. Die Diagnose und Therapie der MRD waren Ziele der eigenen Forschungsarbeiten.

Zunächst wurde die Detektion der MRD mittels drei verschiedener Methoden erarbeitet, der immunmagnetischen Anreicherung aus Knochenmark und Blut, der FDG-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) und der Chemokinbestimmung. Für jedes Verfahren wurden bestimmte Malignome als Modellerkrankungen gewählt.

Bei Patienten mit soliden, epithelialen Tumoren konnte gezeigt werden, dass einzelne Tumorzellen (Mikrometastasen) mittels immunmagnetischer Markierung aus Knochenmark und Blut detektiert werden können. Beim Mammakarzinom und kolorektalem Karzinom korrelierte das Vorhandensein von MRD mit der Prognose und Stadien der Patienten. Das Hodgkin Lymphom diente als hämatologische Modellerkrankung für die Detektionsverfahren mittels FDG-PET und Chemokinanalyse. Es konnte gezeigt werden, dass FDG-PET zur Detektion von Hodgkin MRD geeignet ist und einen hohen negativen Prädiktionwert nach abgeschlossener Therapie aufweist. Das Chemokin TARC korreliert mit der Tumoraktivität beim Hodgkin und ist Prädiktor für ein schlechteres krankheitsfreies Überleben nach Therapie.

Nachdem die hochsensitive Detektion der MRD durch diese Arbeiten mithilfe der genannten Verfahren ermöglicht worden war, fokussierten sich die weiteren Forschungsarbeiten auf die Entwicklung einer experimentellen Therapie der MRD. In einer Phase I/II Studie wurde eine Vakzinationstherapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom durchgeführt. Als Immuntherapeutikum wurden mit dem Nonamer-Peptid CAP-1 gepulste dendritische Zellen sowie verschiedene Adjuvantien eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Vakzinationsstrategie bei ca. 50% der Patienten zu einer Erhöhung der CAP-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen und bei einigen Patienten zu einer Stabilisierung der Tumormarkerverläufe führte.

Aufgrund dieser Vorarbeiten wird derzeit eine klinische Vakzinationsstudie mit CpG-Oligonukleotiden an der Klinik I für Innere Medizin vorbereitet, in der Patienten mit MRD nach Resektion von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms behandelt werden können.

2 Summary

The remaining of tumor cells in the body often decides the prognostic fate of patients with malignancies after completed therapy. These cells, also termed as “minimal residual disease” (MRD) give rise to local relapses or metastatic spread, which are incurable in most of the cases. Thus, diagnosis and therapy of MRD were the primary aims of the presented research.

The detection of MRD was performed with three different methods: Immunomagnetic enrichment from bone marrow and blood, FDG-positron emission tomography (FDG-PET), and chemokine analysis. Certain malignancies were chosen for each strategy as a disease model.

In patients with epithelial tumors, it could be shown that single tumor cells (micrometastases) can be detected by magnetic labeling in bone marrow and blood. The presence of MRD correlated with the prognosis and stage of patients in colorectal and breast cancer. Hodgkin lymphoma (HL) was chosen as a hematologic disease model for the detection of MRD with FDG-PET and chemokine analysis. It could be shown that FDG-PET can detect HL and has a high negative predictive value after therapy. The chemokine TARC correlates with tumor activity in HL and was an indicator for worse disease free survival after therapy.

After the highly sensitive detection of minimal residual disease had been established by these studies, the following research focused on the development of an experimental therapy of MRD. In a phase I/II trial, patients with metastatic colorectal cancer were immunized with CAP-1 pulsed dendritic cells and different adjuvants. It could be shown that the vaccination strategies led to an increase of CAP-1 specific cytotoxic T-cells in approximately 50% of the patients and to a stabilization of the tumor marker in some patients.

Due to this research a clinical vaccination study with CpG-oligonucleotides will be initiated at the Department I for Internal Medicine to treat patients with resected colorectal cancer liver metastases and MRD.

3 Einleitung

3.1 Diagnose der minimalen Resterkrankung

Die Prognose maligner Tumorerkrankungen ist abhängig von mannigfaltigen Faktoren wie Histologie, Stadium, Expression von bestimmten Antigenen und/oder Genen, Alter und Begleiterkrankungen des Patienten.

Es gibt jedoch nur einen Faktor, der allein ursächlich für ein Fortbestehen der Tumorerkrankung ist, nämlich die Resterkrankung nach Behandlung, also das Vorliegen von entweder einzelnen Tumorzellen oder Metastasen. Liegt eine Resterkrankung vor, bedeutet dies eine Chronifizierung der Tumorerkrankung und damit in der Mehrzahl der Fälle den Tod des Patienten.

Die Resterkrankung ist bei allen Tumorerkrankungen von großer Bedeutung, sowohl bei den Hämoblastosen als auch bei den soliden Tumoren. Bei den Hämoblastosen (Non-Hodgkin Lymphome, Hodgkin Lymphom, akute und chronische Leukämien) handelt es sich in der Regel um Systemerkrankungen, die bei Diagnosestellung das gesamte lymphatische oder hämatologische System betreffen. Daher ist die Diagnose einer Resterkrankung erst nach der – oft kurativ angelegten – Primärtherapie von Bedeutung. Bei den soliden Tumoren hingegen entscheidet die Resterkrankung bereits bei Erstdiagnose des Tumors über die Prognose. Die Resterkrankung kann, soweit die Zellverbände bei soliden Tumoren und bei Lymphomen eine Größe von 5 mm überschreitet, heute sicher mittels radiologischer Verfahren, v. a. durch die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie diagnostiziert werden. Ebenso können Tumormarker laborchemisch Anhalt auf das Vorliegen von Resterkrankung geben.

Wenn eine Resterkrankung bei soliden Tumoren vorliegt, die nicht mehr operativ saniert werden kann, ist dies bei den meisten Tumorerkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose vergesellschaftet. Die 5-Jahres-Überlebensraten einer metastasierten Erkrankung sind bei Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Bronchialkarzinom jeweils 15%, 5% und 1%. Bei vielen Tumoren ist die Resterkrankung durch konventionelle diagnostische Methoden nicht detektierbar. Sie ist aber vorhanden und wird daher „minimale Resterkrankung“ (MRD) genannt. Das erste Ziel muss also sein, die Resterkrankung zu detektieren, wenn sie noch gering ist, um die Prognose des Patienten individuell voraussagen zu können. Das zweite Ziel besteht in der Entwicklung einer Therapie, mit der diese minimale Resterkrankung eliminiert werden kann.

Es gibt drei hauptsächlich experimentelle Ansätze, MRD zu detektieren:

1. Nuklearmedizinische Verfahren (sog. „molecular imaging“),
2. Messung der Stoffwechselprodukte einzelner Tumorzellen, z. B. Zytokine, Chemokine, Tumormarker bzw. Messung von DNA/RNA-Resten der Tumorzellen.
3. Detektion einzelner Tumorzellen in Blut („zirkulierende Tumorzellen“) oder im Gewebe („Mikrometastasen“),

Jedes dieser Verfahren ist bei bestimmten Tumorerkrankungen besser geeignet als bei anderen. Daher wurden für die geprüften Verfahren unterschiedliche Malignome als Modellerkrankungen gewählt.

Die nächsten Abschnitte werden den derzeitigen Stand der Forschung dieser drei Ansätze beleuchten.

3.1.1 Detektion minimaler Resterkrankung mittels „molecular imaging“

Die klassischen radiologischen Verfahren wie Röntgen, Computertomographie oder Ultraschall können die Maße, Volumina und Beschaffenheit von Tumoren darstellen. Sie haben bei Tumorerkrankungen einen hohen Stellenwert, insbesondere beim Staging, also der Stadieneinteilung sowie bei der Abschlussuntersuchung nach erfolgter Therapie, um das Ansprechen auf die Behandlung zu beurteilen. Die genannten Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass sie nicht zwischen aktivem und inaktivem Tumorgewebe unterscheiden können. Weiterhin werden kleine Tumorkläsionen ev. überhaupt nicht erfasst, so dass nach einer Operation möglicherweise noch Resttumorgewebe im Körper verbleibt. In einer Studie hatten bis zu 50% der Patienten mit kolorektalem Karzinom, die einer kurativen Tumorsektion unterzogen werden, bereits Fernmetastasen, die durch die radiologischen Standardverfahren nicht erfasst wurden^{1,2}. Bei der Computertomographie bleibt es nach abgeschlossener Therapie häufig unklar, ob Resttumoren inaktiv (fibrotisch oder nekrotisch) sind oder noch aktives Tumorgewebe enthalten.

Um die Aktivität eines Tumors zu messen, stehen derzeit nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) oder single photon emission computed tomography (SPECT) zur Verfügung. Die Strahler, die verabreicht werden, können in drei Kategorien eingeteilt werden. Zur Gruppe „Typ A“ zählen die Strahler, die direkt am Zielmolekül binden, zu „Typ B“ jene, die durch molekulare oder zelluläre Aktivität inkorporiert werden und zu „Typ C“ die Marker, die nur detektiert werden, wenn sie in der

Zielzelle verstoffwechselt werden. Zu diesen radioaktiv markierten Substanzen zählen unter anderem ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (FDG) zur Darstellung stoffwechselaktiver Tumoren, ⁶⁴Cu-MSH-Analog zur Markierung von Melanomzellen¹, ⁶⁴Cu-markiertes Cetuximab zur Detektion EGFR-exprimierender Tumoren², ¹¹C-Methionine zum Nachweis von multiplen Myelom Herden³, ⁶⁸G-DOTA-Tyr3-Octreotid zur Detektion von neuroendokrinen Tumoren⁴ und ¹⁸F-Estradiol für rezeptorpositive Mammakarziome⁵.

Die meisten dieser Marker befinden sich noch in klinischen Studien. Die höchste klinische Relevanz dieser Untersuchungen weist die Positronenemissionstomographie mit ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (FDG-PET) auf. Die klinischen Indikationen für FDG-PET umfassen in Deutschland das Hodgkin Lymphom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Ösophaguskarzinom und die HNO-Karzinome.

Die FDG-PET ist bei Lymphomen ein hochsensitives Verfahren. Vor allem beim Hodgkin Lymphom (HL) wie auch bei den hochmalignen Non-Hodgkin Lymphomen verursacht der gesteigerte Stoffwechsel der Tumoren eine starke Anreicherung der radioaktiven Glukose^{6,7,8}. Während das PET bei den aufgeführten Karzinomen einen bedeutenden Stellenplatz beim Staging einnimmt, zeigten frühe Studien beim HL jedoch, dass eine ergänzende FDG-PET nur in ca. 10% der Fälle zu einer Veränderung des durch radiologische Methoden ermittelte Stadium bewirkt^{9,10}. Zu einer Therapieänderung kam es in weit unter 10% der Fälle, so dass der Stellenwert der PET im primären Staging des HL umstritten ist.

Noch in den 70er Jahren war die Heilungsrate des HL gering. Dank moderner Kombinationen von Polychemotherapie und Radiotherapie können heutzutage über 90% der Patienten geheilt werden¹¹. Daher ist das aktuelle Ziel der Deutschen Hodgkin Studiengesellschaft, die Toxizität der Therapie zu reduzieren statt zu intensivieren, da eine Verbesserung der Heilungsrate kaum möglich scheint, wohl aber eine Reduktion der Toxizitäten und Sekundärneoplasien. Häufigstes klinisches Problem sind Resttumoren nach erfolgter Therapie, welche oft im für bioptische Verfahren schwer zugänglichen Mediastinum verbleiben. In den meisten Fällen handelt es sich um fibrotisches Gewebe, also „Narbengewebe“ nach erfolgter Radio-/Chemotherapie.

Aus diesem Grund sind Marker zur Bestimmung der Krankheitsaktivität und MRD von großer Bedeutung. Die Zukunft liegt in einer individuell angepassten Therapie, die sich nach Risikofaktoren und MRD richten wird, wie es heute schon bei Leukämien der Standard ist. Da die CT nach erfolgter Therapie nicht zwischen vitalem Gewebe und Narbe unterscheiden kann, könnte FDG-PET die MRD detektieren und eine frühzeitige Salvage-Therapie

ermöglichen. Um den Wert der FDG-PET bei residueller Hodgkin-Erkrankung zu bestimmen, wurde eine prospektive, klinische Studie durchgeführt.

3.1.2 Detektion minimaler Resterkrankung durch Bestimmung von Zytokinprofilen

Die im vorausgegangenen Abschnitt dargestellte nuklearmedizinische Methode zum Nachweis von MRD hat den Nachteil, dass sie nicht bei nur wenigen verbleibenden Tumorzellen funktioniert, da eine gewisse „kritische Masse“ überschritten werden muss, um als Signal von den Detektoren wahrgenommen zu werden. Ein weiterer Ansatz ist daher, die residuellen Tumorzellen (s. 3.1.3) bzw. ihre Stoffwechselprodukte zu bestimmen. In der klinischen Praxis verwendet man bei einigen Entitäten die von den Tumorzellen sezernierten Tumormarker, um ein Wiederauftreten der Erkrankung vorhersehen zu können. Der Nachteil ist jedoch, dass erhebliche Mengen von Tumorzellen proliferiert sein müssen, um einen erhöhten Tumormarker nachzuweisen. Bei den soliden Tumoren ist daher zur Bestimmung der MRD der Einzelzellnachweis die Methode der Wahl (s. 3.1.3).

Das Hodgkin Lymphom (HL) nimmt auch hier eine Sonderstellung unter den Tumorerkrankungen ein. In den Lymphomen finden sich nur sporadisch Tumorzellen. Das Hauptgewebe besteht aus CD4+ T-Helferzellen und inflammatorischen Zellen, die die Lymphknoten infiltrieren^{12,13}. Der Einzelzellnachweis gelingt zwar aus befallenen Lymphknoten, jedoch nicht aus leichter zugänglichen Geweben wie Knochenmark oder peripherem Blut. Wie im letzten Abschnitt beschrieben, stellt die Frage, ob noch vitale Tumorzellen nach Therapie vorhanden sind, ein häufiges klinisches Problem dar. Ein Marker, mit dem MRD beim HL nach Radio-/Chemotherapie nachgewiesen werden kann, wäre daher von großer klinischer Bedeutung. Mit diesem könnten Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko identifiziert und frühzeitig einer erneuten Diagnostik und Therapie zugeführt werden. Ebenso wäre es möglich, die sehr toxische Therapie um einige Zyklen zu kürzen, wenn in Zwischenuntersuchungen sicher keine Tumorzellen mehr vorhanden wären.

Bisher untersuchte Marker haben sich als wenig hilfreich erwiesen. Insbesondere die mit einer schlechteren Prognose einhergehende Erhöhung von Blutsenkungsgeschwindigkeit und alkalische Phosphatase haben keinen Wert in der Bestimmung von MRD¹⁴.

Das „CC thymus and activation related chemokine“ (TARC, CCL17) ist ein Protein, welches durch Klonen des D3A Gens von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) nach Stimulation mit PHA erstmalig beschrieben wurde¹⁵. Es wird von antigenpräsentierenden Zellen, v. a. von den dendritischen Zellen produziert¹⁶. TARC zieht aktivierte TH2 T-Zellen durch Stimulation des CC Chemokinrezeptors 4 (CCR4) an^{17,18}. Es ist möglich, dass die

Ursache für die ungewöhnliche Tumorarchitektur des Hodgkin Lymphoms (wenige Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen und hochgradige CD4+ T-Zellinfiltration) in der hohen TARC Expression und Sekretion der Reed-Sternberg Zellen liegt. TARC kann im Serum mittels ELISA nachgewiesen werden. In einer prospektiven Studie wurde daher der prognostische Wert der MRD beim HL untersucht.

3.1.3 Detektion minimaler Resterkrankung mittels Einzelzellnachweis

In den frühen 80er Jahren gab es erste Versuche, den Nachweis einer minimalen Resterkrankung bei soliden Tumoren zu führen^{19,20}. Es wurde eine Methode gesucht, die eine „Mikrometastasierung“ nach kurativer lokoregionärer Therapie des Primärtumors detektieren und ev. frühzeitig ein Rezidiv vorhersagen konnte. Das klassische TNM-Stagingsystem versagt bei der Rezidivvorhersage. Viele der Risikopatienten könnten jedoch von einer adjuvanten Therapie profitieren, die man ihnen nach klassischem Staging nicht verabreicht²¹. Zum anderen könnte Patienten eine adjuvante Therapie erspart bleiben, die nach der Definition der TNM-Klassifikation eine adjuvante Therapie empfohlen bekommen.

Die meisten soliden Tumoren sind epithelialen Ursprungs und zeichnen sich durch die starke Expression von Proteinen des Zytoskeletts, sogenannter Zytokeratine aus²². Mittels Immunzytologie, also durch Einsatz von Antikörpern gegen diese Zytokeratine, z. B. CK8/18 und entsprechenden Färbeschritten, konnten erstmals einzelne Karzinomzellen („Mikrometastasen“, „isolierte Tumorzellen“) als Zeichen der MRD unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Frühzeitig wurde das Knochenmark als repräsentativer Ort der Mikrometastasierung identifiziert, selbst bei Karzinomen, die nicht klassischerweise in das Knochenmark metastasieren, wie z. B. beim Kolonkarzinom. Die prognostische Bedeutung von Mikrometastasen konnte in vielen Studien bei den häufigen Tumorentitäten wie Mammakarzinom^{23,24,25}, Bronchialkarzinom^{26,27}, kolorektalem Karzinom^{28,29} etabliert werden. Der Nachweis von Mikrometastasen könnte in Zukunft die Entwicklung einer individuell auf den Patienten angepassten Therapie unterstützen^{30,31}. Da eine Knochenmarkpunktion relativ aufwändig und schmerzhaft ist, versuchte man, bisherige Methoden zu verbessern, um auch im Blut zirkulierende Tumorzellen (CTC) nachweisen zu können. Dies gelang kürzlich, und es konnte beim Mammakarzinom nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit CTC eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen als Patientinnen ohne CTC^{32,33}.

In den meisten Studien wurden die Zellen aus Knochenmark oder Blut über Dichtezentrifugation aufgereinigt und mittels der alkalischen Phosphatase anti-alkalische

Phosphatase (APAAP) Reaktion auf Objektträgern gefärbt. Durch diese Methode können jedoch nur fünfhunderttausend bis zwei Millionen Zellen pro Objektträger gefärbt und gesichtet werden. Eine Knochenmarkaspiration mit einem Volumen von zehn Milliliter enthält jedoch ca. zweihundert Millionen Zellen, so dass viele okkulte Tumorzellen dem Verfahren entgehen. Zusätzlich ist das Sichten mehrerer Objektträger sehr zeitintensiv und lässt sich nur schwer als Routineverfahren umsetzen.

Eine Verbesserung bietet die sogenannte MACS-Methode. Mit diesem Verfahren können Tumorzellen über paramagnetische Antikörper markiert und danach über ein magnetisches Feld angereichert werden. *In vitro* Studien zeigten, dass Tumorzellen um bis zu zehntausendfach über MACS angereichert werden können^{34,35}.

Um die Detektionsrate von Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren zu untersuchen, wurde eine Studie bei 20 Patienten durchgeführt. Nachfolgend wurden zwei Studien zur Korrelation von Mikrometastasen bzw. zirkulierender Tumorzellen mit Prognose und klinischen Parametern beim kolorektalen und beim Mammakarziom durchgeführt. Um die Detektion von MRD im Knochenmark zu bestimmen, wurde das kolorektale Karzinom als Modellerkrankung gewählt. Hier war bereits bekannt, dass eine Detektion aus dem Knochenmark mittels APAAP möglich war, nicht jedoch aus dem Blut. Als Modellerkrankung zur Verfeinerung der Methode, um MRD im Blut zu detektieren, wurde das Mammakarzinom gewählt, da hier zirkulierende Tumorzellen recht häufig vorkommen.

3.2 Experimentelle Therapie der minimalen Resterkrankung

Ohne dass es als solche definiert worden wäre, ist die adjuvante Chemo- bzw. Strahlentherapie eine Behandlung der MRD. Sie dient also der Elimination von singulären Tumorzellen, die zu einem Rezidiv führen könnten. Durch die adjuvanten Therapien können jedoch keine 100%igen Heilungsraten erreicht werden. In der Regel ist die Steigerung des Gesamtüberlebens nach 5 Jahren Beobachtungszeit (5-JÜR) relativ gering. So ist die 5-JÜR bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom in den Stadien Ib und II nach alleiniger Operation 54%. Nach einer adjuvanten Chemotherapie mit Cisplatin und Vinorelbin steigt sie auf lediglich 69%³⁶. Beim kolorektalen Karzinom (Stadien II und III) steigt die 5-JÜR von 64% auf 71% mit einer 5-Fluorouracil/Leukovorin Chemotherapie³⁷, bzw. auf ca. 78% mit dem moderneren FOLFOX-Schema³⁸. Das krankheitsfreie Überleben 5 Jahre nach kurativer Resektion eines Pankreaskarzinoms beträgt 6% ohne adjuvante Therapie mit Gemcitabin und 15% mit Gemcitabin³⁹.

Um die Heilungsraten zu verbessern, wurde die Chemotherapiedosis innerhalb klinischer Studien gesteigert. In einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse mit über 5000 Patientinnen mit Mammakarzinom konnte jedoch keine Steigerung der 5-JÜR durch Hochdosischemotherapie gegenüber normal dosierter Chemotherapie verzeichnet werden⁴⁰.

Obwohl der Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom korreliert, ist eine adjuvante Chemotherapie ineffektiv, um diese Mikrometastasen zu eliminieren⁴¹. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass Mikrometastasen eine niedrige Proliferationsrate aufweisen und sich in einem chemotherapieresistenten „Cell-Arrest“ befinden⁴².

Aus diesem Grund sind andere Therapiestrategien erforderlich, um MRD behandeln zu können. Die größte Bedeutung kommt derzeit der Immuntherapie zu, die unabhängig vom Zellzyklus der Tumorzellen wirken kann. Heutzutage befinden sich bereits mehrere monoklonale Antikörper beim kolorektalen Karzinom, Non-Hodgkin Lymphomen und HER2/neu überexprimierenden Mammakarzinomen in der klinischen Anwendung, die den Ansatz der „passiven Immuntherapie“ verfolgen.

Kürzlich konnte in einer großen Studie gezeigt werden, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK), die eine hohe Anzahl tumorinfiltrierender CD3+/CD45RO+ T-Zellen aufwiesen, ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben aufwiesen als Patienten ohne diese T-Zellen⁴³. Sogar Patienten mit den sehr günstigen UICC I und II Stadien zeigten eine hohe Rezidivrate, wenn wenige tumorinfiltrierende T-Zellen vorhanden waren. Diese Studie unterstreicht die Bedeutung einer „aktiven Immuntherapie“, die die zellulären Kompartimente des Immunsystems stimuliert. Generell wird bei der aktiven Immuntherapie gegen ein Zielantigen vakziniert (z. B. gegen CEA beim KRK), welches den zytotoxischen T-Zellen *in vivo* mittels zellulären oder azellulären Adjuvantien präsentiert werden muss. Als zelluläres „Adjuvans“ wurden bereits in frühen klinischen Studien dendritische Zellen verwendet, die stärksten antigenpräsentierenden Zellen. Als azelluläre Adjuvantien werden meistens Chemokine und Zytokine wie z. B. GM-CSF oder IL-2 verwendet, welche die zellulären Kompartimente stimulieren und eine Immunantwort verstärken können.

Laut einem Review sind bereits über 2000 Patienten mit KRK mit verschiedenen Vakzinationsstrategien behandelt worden⁴⁴. Es gibt 4 Hauptstrategien: 1. Vakzination mit dem Antigen (z. B. Peptid oder Protein) in Kombination mit einem Adjuvans (GM-CSF, Montanide), 2. Vakzination mit peptidbeladenen antigenpräsentierenden Zellen (meistens dendritische Zellen), 3. Vakzination mit autologen Tumorzellen oder Tumorzellysat und 4.

Immunisierung mit DNA-Vakzinen, die mittels modifizierter Viren appliziert werden. Die meisten Studien wurden bei Patienten mit metastasiertem KRK durchgeführt und konnten auch nur ein transientes Ansprechen gegen den Tumor zeigen^{45,46,47,48}. Der Zeitpunkt für eine aktive Immuntherapie ist daher wahrscheinlich günstiger für Patienten mit niedriger Tumorlast. Dies wird durch die vielversprechenden Daten von drei Studien unterstützt, in denen insgesamt 1300 KRK Patienten mit minimaler Resterkrankung behandelt wurden^{49,50,51}. Autologe, inaktivierte Tumorzellen wurden hierbei entweder mit „Bacille de Calmette et Guérin“ (BCG) oder dem Newcastle-Virus kombiniert und als Vakzine verwendet. In allen drei Studien konnte ein Überlebensvorteil für die vakzinierte Gruppe gegenüber der unvakzinierten Gruppe nachgewiesen werden.

3.2.1 Das Tumorantigen CAP-1 / CAP1-6D

Beim KRK ist es naheliegend, das carcinoembryonale Antigen (CEA), ein Protein mit 180kD, als Zielantigen einer Vakzinetherapie zu verwenden, da es bei über 90% der KRK Tumoren überexprimiert wird. Für Immuntherapiestudien, in denen die Immunogenität der Vakzine bestimmt werden sollte, empfiehlt es sich jedoch, zur Vakzination Peptide und nicht das gesamte Protein zu verwenden, da es somit leichter ist, eine definierte T-Zell Immunantwort zu messen. Beim CEA wird üblicherweise CAP-1 (Sequenz YLSGANLNL) verwendet, ein HLA-A2 restringiertes Nonamer-Peptid oder das heteroklitische CAP1-6D (Sequenz YLSGADLNL), bei dem eine Aminosäure zur optimierten Bindung am T-Zellrezeptor ausgetauscht wurde^{52,53}. Eine *in vitro* Studie konnte zeigen, dass mit CAP-1 beladene dendritische Zellen (DC-CAP) CD8+ T-Zellen stimulieren können, welche wiederum CEA+ Tumorzellen lysieren⁵⁴. Morse et al.⁵⁵ führten die erste klinische Studie mit DC-CAP bei 21 HLA-A2+ Patienten mit metastasierten Tumoren (darunter 11 KRK) durch. Die Patienten wurden intravenös mit dendritischen Zellen vakziniert. Es traten lediglich lokale Reaktionen auf. Bei 14 Patienten konnte eine Immunantwort gemessen werden, jedoch kein klinisches Ansprechen. In einer weiteren Studie⁵⁶ hat die gleiche Studiengruppe 14 Patienten (11 mit KRK, 3 mit NSCLC) mit einem rekombinanten Fowlpox-Vektor, der CAP1-6D kodiert, vakziniert. ELISPOT Assays konnten einen Anstieg der CEA-spezifischen T-Zellen bei 10 Patienten nachweisen. Ein Patient hatte ein abfallendes CEA. Derzeit werden international mehrere Studien durchgeführt, die CAP1-6D bzw. CAP-1 als Zielantigen verwenden.

3.2.2 CpG-ODN als Adjuvans

Die alleinige Verwendung eines Peptids reicht nicht aus, um eine starke T-Zell Immunantwort hervorzurufen. Daher benötigt man zusätzlich Adjuvantien, wie z. B. GM-CSF, Aluminiumhydroxid oder Montanide. CpG-ODN (Cytosin-poly-Guanin Oligodeoxynukleotide) sind bakterielle DNA-Motive, die bei Säugetieren und Menschen stark immunstimulierend wirken. Die Immuneffekte werden durch Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen über den TLR9 Rezeptor erreicht, welche wiederum Cytokine produzieren und T-Zellen zur Proliferation anregen^{57,58,59}. Sie stellen somit potente Adjuvantien für Vakzinationen dar und wurden bereits erfolgreich in Kombination mit der Hepatitis-B-Vakzine eingesetzt^{60,61}.

Als Adjuvantien bei der Tumorstoffe gibt es bereits einige *in vitro* Studien. Es konnte gezeigt werden, dass der Überstand von mit CpG-ODN stimulierten PBMC signifikant toxischer gegenüber Tumorzellen ist als der von unstimulierten PMBC. Bei Mäusen konnte eine frühzeitige Behandlung mit einer CpG-ODN Vakzine die Metastasierung von inokulierten Tumorzellen verringern bzw. verzögern⁶².

4 Eigene Forschungsarbeiten

Die eigenen Forschungsarbeiten umfassen zwei Bereiche. Im ersten wird die Forschungsarbeit zur Detektion und zur prognostischen Wertung minimaler Resterkrankung mittels drei verschiedener Methoden (Molecular Imaging, Zytokinassays und immunmagnetische Anreicherung von Mikrometastasen) dargelegt. Der zweite Bereich umfasst die Ergebnisse der Forschungsarbeit zur experimentellen Behandlung minimaler Resterkrankung. Der Ausblick gibt eine Übersicht zum aktuellen Forschungsvorhaben zur experimentellen Immuntherapie mit „Immune Assessment“.

4.1 Detektion minimaler Resterkrankung mittels molecular Imaging

4.1.1 FDG-PET detektiert aktive Hodgkin Tumoren

Die Detektion von minimaler Resterkrankung mittels FDG-PET wurde bei beim Hodgkin-Lymphom (HL) als Modellerkrankung durchgeführt. Beim HL gibt es keine „einfache“ Methode, die selten vorkommenden Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen nachzuweisen. Um zunächst die Hypothese zu überprüfen, dass Hodgkin-Tumoren FDG anreichern und mittels PET detektierbar werden, wurden 22 konsekutive Patienten mit neu diagnostiziertem HL sämtlicher Stadien zwischen 1996 und 2000 an der Uniklinik Köln in eine prospektive Studie eingeschlossen. Ziel der Studie war der Nachweis von FDG-positiven Lymphknoten sowie der Vergleich der FDG-PET zum konventionellen Staging. Alle Patienten erhielten daher eine Ganzkörper FDG-PET, eine CT von Thorax und Abdomen, Knochenszintigraphie und eine Knochenmarkpunktion. Das mittlere Intervall zwischen PET und CT betrug 17 Tage mit einem Maximum von 30 Tagen. Die Ergebnisse der Untersuchung führten zur Stadieneinteilung nach Ann Arbor I – IV und zur Einteilung in frühe, intermediäre und fortgeschrittene Stadien nach den Protokollen der Deutschen Hodgkin Studiengesellschaft. Es wurde unterschieden zwischen dem Stagingergebnis ohne PET-Information und dem Ergebnis in Kenntnis der PET-Untersuchung. Insgesamt wurden 77 Tumoren (Lymphknoten und Extranodalbefall) bei 22 Patienten detektiert, entweder in der PET, in der CT oder in beiden Verfahren. Insgesamt wurden bei allen Patienten mindestens eine FDG anreichernde Läsion nachgewiesen, so dass FDG-PET bei allen Patienten die aktive Erkrankung detektieren konnte. 62% der Tumoren (22 Patienten) waren sowohl in der PET also auch in der CT positiv, 26% der Tumoren bei 11 Patienten waren in der PET positiv und in der CT negativ, 11% der Tumoren waren bei 6 Patienten in der PET negativ und in der CT positiv. Verglichen

zum Standard-Staging zeigte die PET 68 richtig positive, keine falsch-positiven und 9 falsch-negative Tumoren an (Tabelle 1). Somit hatte die PET eine Sensitivität von 88% (95% Konfidenzintervall, 79-95%) und eine Spezifität von 100% (KI: 63-83%), um Tumoren beim HL zu detektieren. Die Sensitivität der CT betrug 74%, die Spezifität 100%. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse mussten 18% der Patienten einem höheren Krankheitsstadium zugeordnet werden. Somit konnte nicht nur gezeigt werden, dass die FDG-PET beim primären HL Tumoren mit einer hohen Sensitivität und exzellenten Spezifität detektieren kann, sondern auch stadienrelevante Zusatzinformationen beim Staging liefert (→ **Weihrauch et al., Ann. Hematol. 2002**). Abbildung 1 zeigt ein Beispiel eines Patienten mit einem negativen CT und einem positiven PET-Befund.

Tabelle 1. CT und PET Ergebnisse, Anzahl der Tumoren und Patienten

	CT pos		CT neg	
	Tumoren	Patienten	Tumoren	Patienten
PET pos	48 (62%)	22 (100%)	20 (26%)	11 (50%)
PET neg	9 (12%)	6 (27%)	Keine	Keine

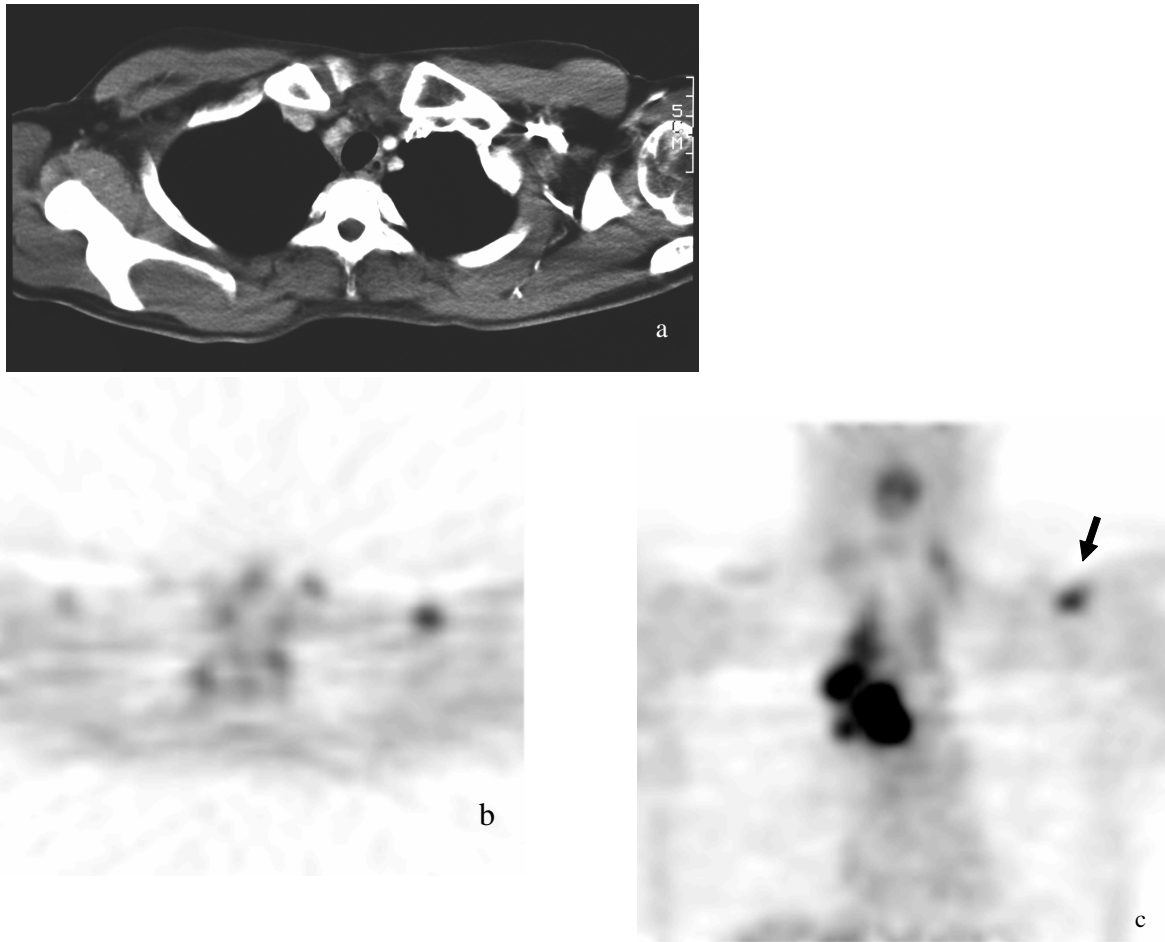


Abbildung 1. Patient mit negativem CT und positivem PET Ergebnis. Die CT konnte einen aktiven Tumorherd in der linken oberen Thoraxapertur nicht detektieren (a), während PET fokale FDG-Anreicherung in den transversalen (b) und koronaren (c) Schnitten zeigt. Der mediastinale Tumor konnte durch beide Verfahren detektiert werden.

4.1.2 FDG-PET detektiert minimale Resterkrankung bei mediastinalen HL-Tumoren und zeigt einen hohen negativ prädiktiven Wert

Beim Hodgkin Lymphom (HL) gibt es keine spezifischen Marker, mit denen man eine Resterkrankung nachweisen könnte. Ein häufiges Problem ist daher, dass nach einer Chemo- bzw. Radiotherapie Reste der Lymphommassen übrigbleiben, über deren Dignität keine Aussage getroffen werden kann ohne eine Biopsie durchzuführen. Biopsien sind jedoch insbesondere bei mediastinalen Resten (mittels Mediastinoskopie) sehr invasiv.

Daher wurde die Detektion von minimaler Resterkrankung mittels FDG-PET beim HL als Modellerkrankung durchgeführt. Das Ziel der Studie war, den prognostischen Wert von FDG-PET bei HL-Patienten hinsichtlich minimaler Resterkrankung zu überprüfen. Insgesamt wurden 28 HL-Patienten mit residuellem Mediastinaltumor von über 2 cm Größe nach

Chemotherapie in die Studie eingeschlossen. Kein Patient hatte irgendeine Therapie nach der Abschluß-PET erhalten, um den prognostischen Wert der PET valide untersuchen zu können. Im medianen Follow-up von 28 Monaten (16 bis 68 Monate) erlitten 31% der Patienten einen Progress bzw. Rezidiv. 34% der Patienten hatten ein positives PET und 66% ein negatives PET. Insgesamt blieben 95% der PET-negativen Patienten nach 1 Jahr in Remission verglichen mit nur 40% der PET-positiven. Somit hatten PET positive Patienten eine deutliche schlechtere Prognose als PET negative Patienten, was in einem Log-Rank-Test statistisch signifikant war (s. Abbildung 2). Der negativ prädiktive Wert des PET war somit 95% nach einem Jahr, der positiv prädiktive Wert lediglich 60%. Falsch negative PET-Untersuchungen waren somit selten, jedoch stellten falsch positive PET-Ergebnisse ein häufiges Problem dar (s. Tabelle 2). Nur bei einem von vier Patienten mit falsch positivem PET konnte die Ursache gefunden werden, nämlich eine postchemotherapeutische Thymushyperplasie. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie (→ **Weihrauch et al., Blood 2001**) und nachfolgender Studien werden nun häufig bei klinisch relevanten Fragestellungen FDG-PET Untersuchungen beim Hodgkin Lymphom zur Detektion von Resterkrankung eingesetzt.

Tabelle 2. Remissionsstatus in Abhängigkeit vom PET-Ergebnis (p=0,032).

	PD / Rezidiv	CRr	Präd. Wert
PET pos	6	4	(pos) 60%
PET neg	3	16	(neg) 84%

PD=Progress, CRr=Komplette Remission mit Rest

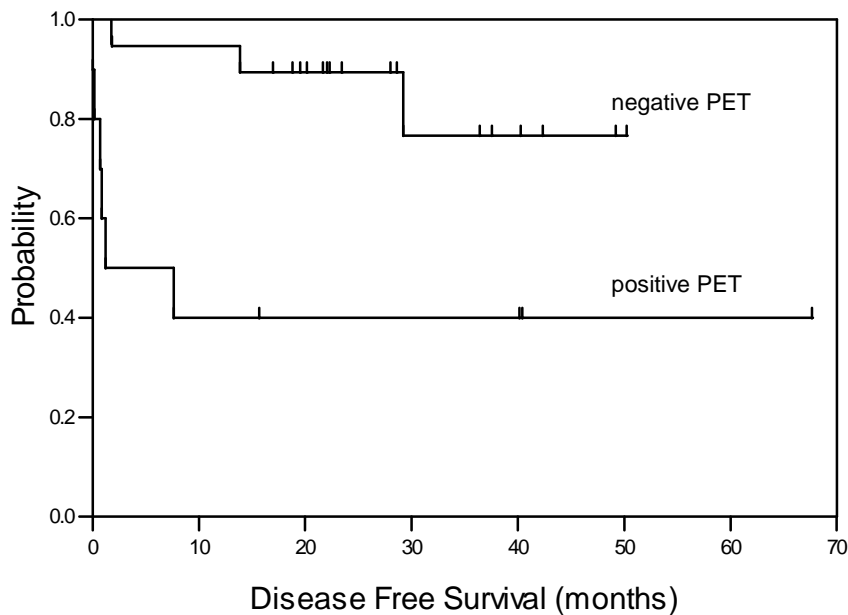


Abbildung 2. Kaplan-Meier Kurven des krankheitsfreien Überlebens aller Patienten mit negativem und positivem PET. Der log-rank Test ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von 0,004.

4.2 Identifikation von Zytokinen und Chemokinen beim Hodgkin Lymphom

Wie im letzten Abschnitt dargelegt, weist die FDG-PET als diagnostische Methode einen hohen negativ prädiktiven Wert beim HL auf. Somit gelingt es mit relativer Sicherheit nach abgeschlossener Chemo-/Radiotherapie und in der CT auffälligen Resttumoren zwischen aktiver Erkrankung und Fibrose zu unterscheiden. Derzeit wird eine Studie der German Hodgkin Study Group durchgeführt, um zu prüfen, ob die Chemotherapie bei den fortgeschrittenen Stadien des HL reduziert werden kann, wenn die Lymphomherde bereits nach 2 Zyklen keine FDG-Anreicherung mehr zeigen. Somit könnte in Zukunft erreicht werden, die Patienten dosisangepasst zu behandeln. Die FDG-PET hat jedoch Nachteile, nämlich dass sie nicht überall verfügbar, kostenintensiv und mit einer Strahlenbelastung vergesellschaftet ist. Zusätzlich kann sie nicht einzelne Tumorzellen detektieren.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von MRD bietet die Chemokin-, bzw. Zytokinanalyse. Als Modellerkrankung dieser Detektionsmethode von MRD diene auch hier das HL.

Wir überprüften die Daten von 967 prätherapeutische Serumproben von Patienten mit fortgeschrittenem Hodgkin Lymphom auf mögliche Fall-/Kontrollpaare hinsichtlich des FTF. Insgesamt konnten 47 Fall-/Kontrollpaare identifiziert werden, wobei es sich um Patienten mit frühem Therapieversagen (<12 Monaten) und Langzeitüberlebende handelte (Tabelle 3). Die Seren der Patienten wurden auf 30 Zytokine, Chemokine und lösliche Faktoren mittels Sandwich ELISA Technik bzw. mittels durchflusszytometrischen „Bead

Arrays“ (Becton Dickinson, Heidelberg) untersucht. Die Faktoren waren APRIL, soluble CD30, TARC, BAT3, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN- γ , LT-alpha, basic-FGF, TNF, Fas-Ligand, VEGF, Angiogenin, Eotaxin, IP10, MCP1, MIG, MIP1-alpha, MIP1-beta und Rantes.

Überraschenderweise wies nur ein Marker eine prognostische Signifikanz auf, nämlich bei Interleukin-10 (IL-10). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-10 Konzentrationen in den prätherapeutischen Proben höher bei den Patienten mit Therapieversagen war als bei den Patienten mit Langzeitüberleben und zwar 15 pg/ml gegenüber 10 pg/ml ($p=0,017$). Der paarweise Vergleich der 47 Paare zeigte einen p-Wert von 0,0008 (paired-sign test). Abbildung 3 zeigt, dass die Serumwerte für IL-10 bei allen Patienten mit Therapieversagen höher lagen. Insgesamt wurde IL-10 jedoch nur bei 40-50% der HL-Patienten als erhöhter Parameter gefunden. (\rightarrow **Rautert R, Franklin J, Weihrauch M et al. 2008**)

Tabelle 3. Charakteristika der 47 Patienten mit frühem Fortschreiten der Erkrankung nach Therapie („Fall“) und der 47 Patienten mit Langzeitüberleben („Kontrolle“).

Parameter	Fall (FFTF < 12 Monate)	Kontrolle (FFTF > 12 Monate)	p-Wert (Mann-Whitney-U)
N	47	47	
Geschlecht (w/m)	16/31	16/31	1,0
Alter (Jahre)	32 \pm 10	32 \pm 11	0,79
Leukozyten (*1000/ μ l)	12,5 \pm 5,1	11,7 \pm 5,2	0,39
Lymphozyten (*1000/ μ l)	13,5 \pm 7,2	14,8 \pm 8,7	0,37
Albumin (g/dl)	3,9 \pm 0,8	4,1 \pm 0,7	0,55
Gesamteiweiß (mg/ml)	7,7 \pm 0,8	7,6 \pm 0,7	0,63
Hb (g/dl)	12,5 \pm 1,4	12,7 \pm 2	0,78
Stadium (IIBE/III/IV)	3/31/13	7/30/10	0,13
B-Symptome (nein/ja)	32/15	29/18	0,29
Histologie (NS/MC)	42/5	42/5	1,0
FFTF (Monate)	2,6 \pm 3,6	73,3 \pm 40	0,0

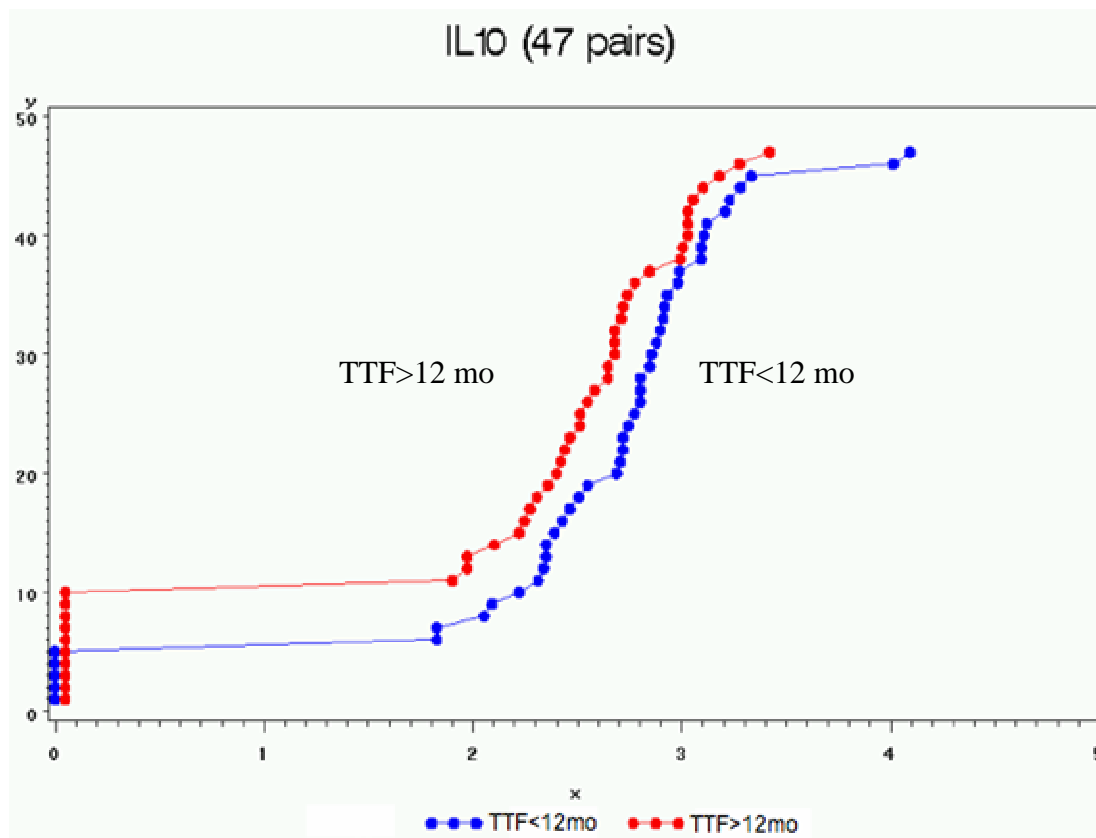


Abbildung 3. „Empirische Verteilungsfunktion: kumulative relative Häufigkeit“ bei 47 Patienten mit rezidivfreier Zeit unter 12 Monaten (TTF<12 mo) und 47 Patienten mit rezidivfreier Zeit über 12 Monaten (TTF>12 mo).

Dagegen konnte gezeigt werden, dass das Chemokin TARC bei fast allen Patienten (ca. 90%) bei Diagnosestellung erhöht war. Daher wurde TARC, wie im folgenden dargestellt, in einer weiteren Studie untersucht.

4.3 Das Chemokin TARC eignet sich zur Detektion minimaler Resterkrankung beim Hodgkin Lymphom

In einer retrospektiven, explorativen Studie wurde daher die prognostische Signifikanz von TARC vor und nach abgeschlossener Therapie beim primären Hodgkin Lymphom untersucht, wobei ein Zielpunkt der Studie die Klärung der Frage war, ob die Messung von TARC sich zur Bestimmung der MRD eignet. Es wurden alle Patienten eingeschlossen, die ein Rezidiv oder Progress nach Therapie erlitten haben und von denen kryokonserviertes Serum vor und nach Therapie, welches im Rahmen der GHSg Studien gesammelt worden war, vorlag. Zusätzlich wurden Patienten mit anhaltender kompletter Remission und ausreichender Nachbeobachtungszeit von mindestens 45 Monaten eingeschlossen. Insgesamt wurde das

Serum von 62 Patienten (39 Männer, 23 Frauen) analysiert. Die mittels ELISA bestimmten TARC-Werte von Patienten mit Rezidiv (n=20) oder Progress (n=9) wurden mit den Werten von 33 Patienten mit anhaltender kompletter Remission (CCR) verglichen. Zusätzlich wurde TARC bei 10 gesunden Probanden gemessen, die einen Durchschnittswert von 239 pg/ml aufwiesen (100 – 431 pg/ml). Ein Wert von über 500 pg/ml (Mittelwert + 2x Standardabweichung der TARC-Werte von gesunden Probanden) wurde als erhöht gewertet. Der mediane TARC-Wert aller HD Patienten betrug 5.803 pg/ml vor Therapie (116 – 73.074 pg/ml) und 663 pg/ml nach Therapie (50 – 24.709 pg/ml). Patienten, die eine CCR erreichten, wiesen geringere TARC-Werte vor Therapie auf (Median 5.180 pg/ml) als Patienten mit Rezidiv (6.734 pg/ml) oder späterem Progress (15.856 pg/ml). Die TARC-Werte vor und nach Therapie sind in Abbildung 4 aufgetragen. Die TARC-Werte vor Therapie korrelierten mit BSG ($p=0,004$), Leukozyten ($p<0,001$) und Lymphozytenwerte ($p=0,026$), aber nicht mit Alter, alkalischer Phosphatase oder Hämoglobin. Ann-Arbor Stadien zeigten ebenso wie die Risikogruppen der GHSG (frühe, intermediäre und fortgeschrittene Stadien) eine Korrelation zu TARC-Werten vor Therapie ($p=0,019$ und $p=0,028$).

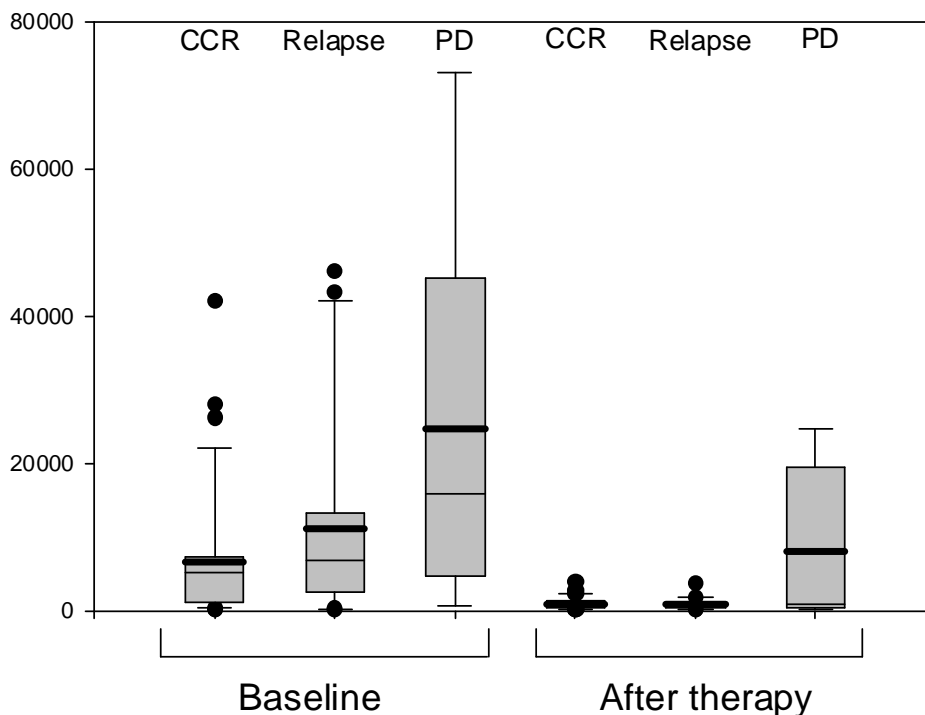


Abbildung 4. Box plot von TARC Werten (pg/ml) vor Therapie (“Baseline”) und nach Therapie (“After therapy”) bei den unterschiedlichen Gruppen von Therapieerfolgen. (CCR=kontinuierliche komplette Remission, PD=Fortgeschrittene Erkrankung, Relapse=Rückfall, die Querstriche zeigen die 10te und 90ste Perzentile an).

Nur 3 der 33 Patienten mit CCR (9%) zeigten TARC Werte über 2.000 pg/ml, jedoch 4 von 9 Patienten mit Progress (44%). In einer Kaplan-Meier Analyse konnte gezeigt werden, dass Patienten, die Werte von über 2.000 pg/ml *vor* Therapie hatten, eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit aufwiesen als solche mit Werten unter 2000 pg/ml. Dies war jedoch im Log-Rank Test nicht statistisch signifikant ($p=0,068$). Patienten mit TARC-Werten über 2.000 pg/ml *nach* Therapie hatten eine deutlich schlechtere Prognose, was sich als statistisch signifikant erwies ($p=0,023$). Abbildung 5 zeigt das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben dieser Patienten in Abhängigkeit von TARC-Werten über bzw. unter 2.000 pg/ml.

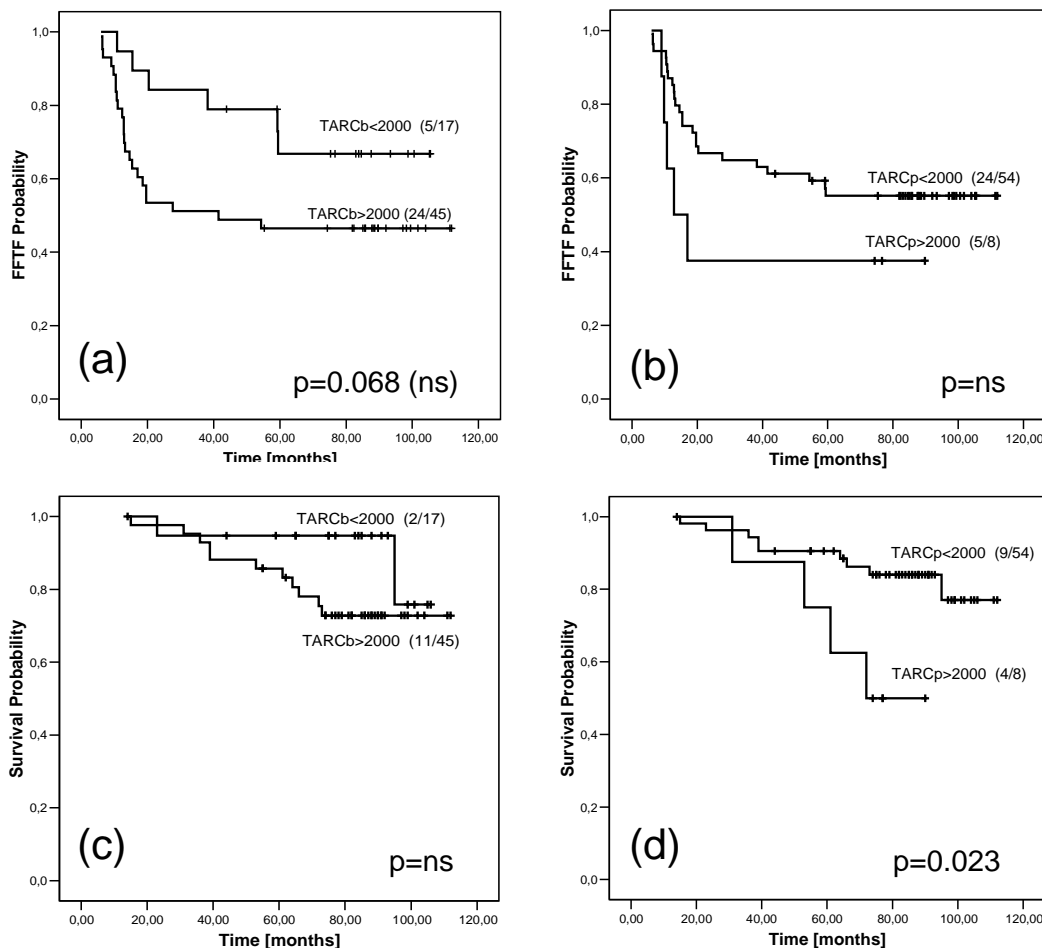


Abbildung 5. Kaplan-Meier Kurven mit krankheitsfreiem Überleben (FFTF, Grafiken a und b) und Gesamtüberleben (Grafiken c und d) von HL Patienten vor Therapie (Grafiken a und c) und nach Therapie (Grafiken b und d). Die Gruppenunterschiede zwischen Patienten mit stark erhöhtem TARC über 2000 pg/ml und unter 2000 pg/ml wurden mit log-rank Tests berechnet (s. jeweilige p-Werte).

Daraus lässt sich folgern, dass TARC ein vielversprechender prognostischer Marker beim HL ist, der aktuell weiteren Studien unterzogen wird. Er ist bei über 90% der HL Patienten erhöht

und zeigt eine enge Korrelation mit der biologischen Masse und Aktivität der Lymphome. In Zukunft wird es ev. möglich sein, Patienten, die auf konventionelle Therapie resistente Tumoren haben, frühzeitig zu identifizieren und einer Salvage-Therapie zuzuführen. Vermutlich ist TARC der sensitivste Parameter, um MRD beim HL zu diagnostizieren, da die Hodgkin- und Reed-Sternberg Zellen nur vereinzelt in den Lymphomen vorkommen und der Direktnachweis dieser Zellen ohne Biopsie selbst mittels molekularbiologischen Methoden kaum möglich ist (→ **Weihrauch et al., Cancer Res. 2005**).

4.4 Immunmagnetische Anreicherung und Detektion von minimaler Resterkrankung ist der Immunzytologie überlegen

Um zunächst die Effizienz der immunmagnetischen Anreicherung (MACS) von MRD, bzw. Mikrometastasen epithelialer Tumoren, zu untersuchen, wurden sogenannte „Recovery“-Experimente durchgeführt. Die MACS-Methode wurde direkt mit einer normalen Immunzytologie hinsichtlich der Anreicherung und Detektion verglichen.

Tumorzellen von Zelllinien wurden mit PBMC von gesunden Spendern gemischt und mittels der MACS-Methode analysiert. Hier zeigten sich sehr gute Wiederauffindraten von 60-80% der vereinzelt Tumorzellen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Effektivität der MACS Anreicherung von Tumorzellen, die in unterschiedlichen Mengen in Blut gesunder Spender gemischt wurden. Im ersten Experiment wurde nur eine Anreicherung, im zweiten Experiment zwei Anreicherungen durchgeführt.

Experiment 1: Einfache Zellanreicherung mit MACS und nachfolgende Auszählung

CK+ Zellen, die in $1,2 \times 10^8$ Leukozyten (Blut) eingebracht wurden

	10	100	1000	10.000
Frequenz der CK+ Zellen pro Leukozyten	$8,3 \cdot 10^{-8}$	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$
Wiedergefundene Zellen	8	60	588	4900
Frequenz von CK+ Zellen nach MACS	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$8,2 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-3}$
Anreicherungsfaktor	130	99	102	84
Wiederauffindrate	80	60	59	49

Experiment 2: Doppelte Zellanreicherung mit MACS und nachfolgende Auszählung

CK+ Zellen, die in $1,2 \times 10^8$ Leukozyten (Blut) eingebracht wurden

	10	100	1000	10.000
Frequenz der CK+ Zellen pro Leukozyten	$5,6 \cdot 10^{-8}$	$5,6 \cdot 10^{-7}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$
Wiedergefundene Zellen	7	40	450	3500
Frequenz von CK+ Zellen nach MACS	$7 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-2}$	0,28
Anreicherungsfaktor	12600	4114	10800	5040
Wiederauffindrate	70	40	45	35

Zur Etablierung des Systems der *in vivo* Detektion von Mikrometastasen mittels MACS wurden 20 Patienten mit Karzinomerkrankung epithelialen Ursprungs nach schriftlicher Einverständniserklärung in eine prospektive Studie eingeschlossen. Als Negativkontrolle diente Knochenmark von 7 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (ohne epitheliale Marker). Die immunmagnetische Anreicherung und Detektion von Mikrometastasen wurde mit einer normalen Immunzytologie, die von anderen Studiengruppen als Standard definiert wurde, verglichen. Bei beiden Methoden wurde ein Antikörper gegen epitheliale Oberflächenmoleküle (CK7/8) verwendet. Alle Patienten erhielten eine Knochenmarkpunktion, bei der ca. 10 ml Knochenmark gewonnen wurde, welches zu einer Hälfte immunmagnetisch angereichert, zur anderen Hälfte konventionell gefärbt wurde. Bei 16 von 20 Patienten (80%) konnten Mikrometastasen in der magnetisch angereicherten

Fraktion gefunden werden, wobei nur bei 7 der Patienten (35%) in der unangereicherten Fraktion Mikrometastasen aufwiesen. Die mittlere Anzahl von Mikrometastasen bei positiven Patienten betrug $10,3 \pm 9,9$ (1-42) bei einer mittleren Frequenz von $1,1 \pm 1,2$ pro 10^7 Knochenmarkzellen nach Anreicherung. Ohne Anreicherung konnten nur $1,4 \pm 0,7$ Mikrometastasen absolut bei einer Frequenz von $0,4 \pm 0,6$ pro 10^5 Knochenmarkzellen gefunden werden. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p=0,025$ und $p=0,002$). Mikrometastasen fanden sich bei 10 von 12 (83%) der metastasierten Patienten und bei 6 von 8 (75%) der Patienten ohne Metastasen. Keiner der 7 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen hatte Mikrometastasen im Knochenmark. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. Detektion von Zytokeratin-positiven Zellen, Vorhandensein von im CT oder MR diagnostizierten Metastasen und zusätzliche Knochenmetastasen (Szintigraphie). CK pos = Zytokeratin positiv, CK neg = Zytokeratin negativ.

	CT/MR Metastasen		Zusätzliche Knochenmetastasen	
	Ja	Nein	Ja	Nein
CK pos.	10	6	7	9
CK neg.	2	2	1	3

Diese Arbeit war grundlegend für die nachfolgenden Patientenstudien (→ **Weihrauch et al., Clin. Exp. Metastasis, 2002**)

4.5 Detektion minimaler Resterkrankung und Korrelation mit klinischen Parametern beim kolorektalen Karzinom

Um die MACS-Methode zur Detektion von MRD im Knochenmark (KM) bei einem homogenen Patientenkollektiv zu untersuchen, wurde das kolorektale Karzinom als Indikation gewählt, da in früheren Studien bereits über MRD im KM berichtet worden war.

Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurden 10 ml KM von 51 Patienten mit kolorektalem Karzinom unterschiedlicher Stadien während der primären Operation entnommen. Insgesamt wiesen 11 der Patienten ein UICC Stadium I, 14 ein Stadium II, 12 ein Stadium III und 14 ein Stadium IV auf. Bei 33 von 51 Patienten (65%) konnten Mikrometastasen/MRD im KM nachgewiesen werden. Die absolute Zahl von Mikrometastasen variierte von 1 bis 49, wobei der Mittelwert bei $8,1 \pm 10,8$ Zellen lag ($3,3 \pm 8,0$ Zellen pro 10^7 KM-Zellen). Die Zahlen sind graphisch in Abbildung 6 dargelegt.

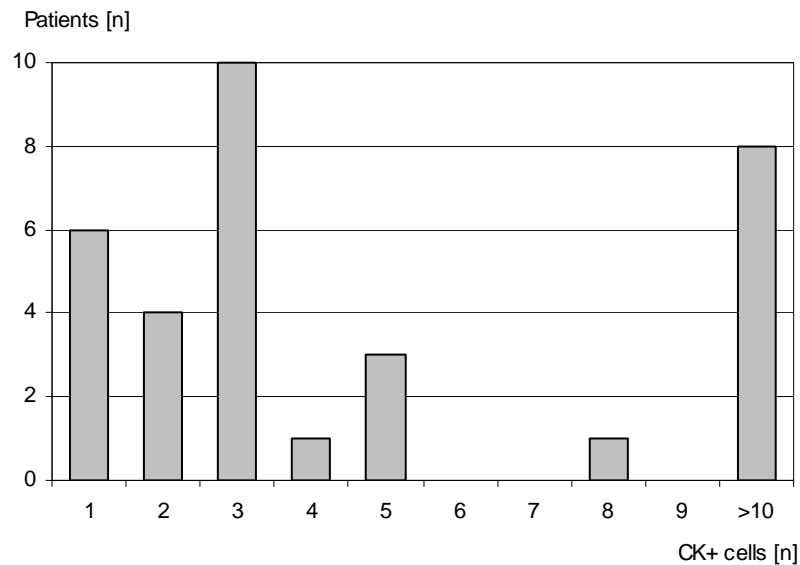


Abbildung 6. Frequenz von Zytokeratin positiven Zellen (CK+) im Knochenmark von Patienten mit Mikrometastasen.

Es gab keine Unterschiede hinsichtlich des Vorliegens von Mikrometastasen zwischen Männern und Frauen bzw. zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen. Auch gab es keinen signifikanten Altersunterschied zwischen Patienten mit MRD und den Patienten ohne. MRD wurde bei 4 von 11 (36%) der Patienten mit Stadium I, bei 9 von 14 (64%) mit Stadium II, bei 8 von 12 (67%) mit Stadium III und 12 von 14 (86%) mit Stadium IV detektiert (Abbildung 7).

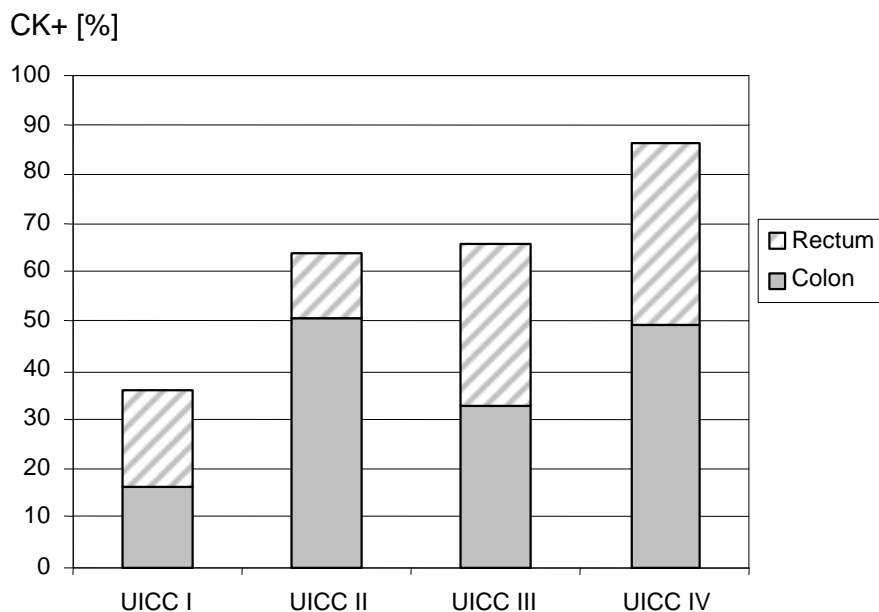


Abbildung 7. Prozentuales Vorkommen von Zytokeratin positiven (CK+) Zellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalem Karzinom in Abhängigkeit der UICC-Stadien. Die Unterschiede zwischen Kolon- und Rektumkarzinom waren nicht signifikant.

Die Unterschiede waren in einer Trendanalyse statistisch signifikant ($p=0,016$), obwohl es keine Unterschiede zwischen den UICC Stadien II und III gab. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass die Streuung der Mikrometastasen auf hämatogenem Wege stattfindet, was v. a. durch den Einbruch der Tumoren in das Gefäßsystem erfolgt. Die Stadien II und III unterscheiden sich jedoch lediglich hinsichtlich des Lymphknotenbefalls, welcher keinen Einfluss auf die Fernmetastasierung haben sollte. Es gab keine Korrelation zwischen Mikrometastasen und „tumor grading“ (G1-G3). Patienten mit MRD hatten häufiger erhöhte CEA- (85% gegenüber 15%, $p=0,051$) und CA19-9-Werte (92 gegenüber 8%, $p=0,019$) als Patienten ohne MRD (Abbildung 8). Keiner der Kontrollpatienten (11 Patienten, die einer kardiochirurgischen Operation mit Sternotomie unterzogen wurden) wiesen Mikrometastasen auf. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse nicht mit der Prognose korreliert, da es bei der relativ kleinen Fallzahl zu keinen statistisch signifikanten Ergebnissen gekommen wäre. Allerdings ist die stadienabhängige Prognose richtungsweisend für ein schlechteres Überleben der Patienten mit MRD (→ **Weihrauch et al., J. Clin. Oncol., 2002**).

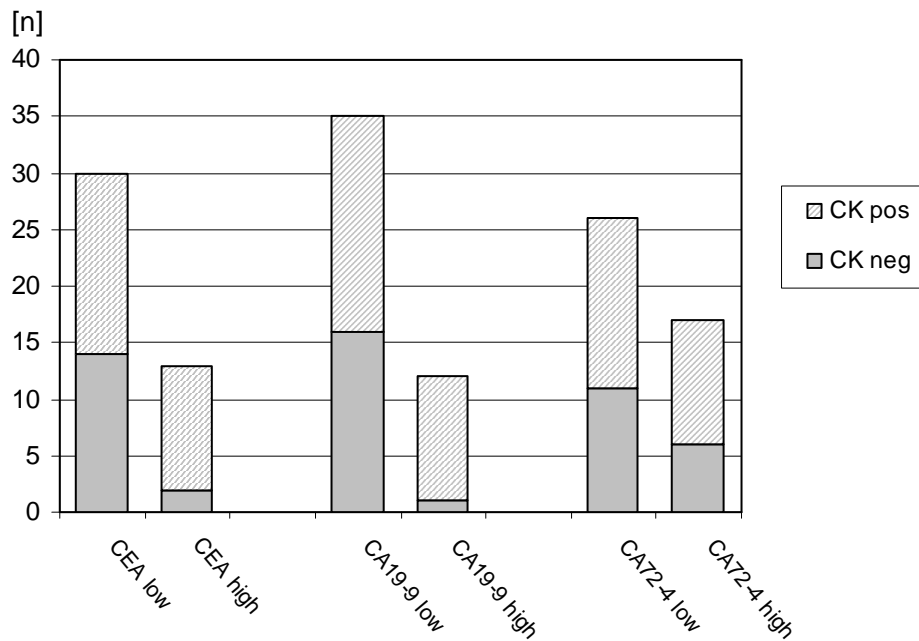


Abbildung 8. Anzahl von Patienten mit oder ohne Mikrometastasen im Knochenmark (CKpos / CK neg) in Abhängigkeit der Tumormarker CEA, CA19-9 und CA72-4.

4.6 Detektion und prognostische Bedeutung minimaler Resterkrankung beim Mammakarzinom

Viele Studien konnten zeigen, dass das Vorkommen von MRD/Mikrometastasen im Knochenmark bei soliden Tumoren mit einer schlechteren Prognose der Patienten vergesellschaftet ist. Allerdings ist die Gewinnung von Knochenmark relativ aufwändig und trotz lokaler Betäubung häufig schmerzhaft. Daher wäre die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut analog der Mikrometastasen im KM zu bevorzugen. Bisherige Methoden, v. a. die Immunzytologie scheiterten an der geringen Sensitivität des Verfahrens. Daher wurde eine Studie initiiert, um mittels der hochsensitiven MACS-Methode die zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blut nachzuweisen. Als Modellerkrankung wurde hierbei das Mammakarzinom (MK) gewählt, da aus Untersuchungen bekannt ist, dass es relativ häufig zur hämatogenen Aussaat von Tumorzellen kommt.

Es wurden Proben vor und nach der primären Operation bei MK-Patientinnen untersucht. Zusätzlich wurden Patientinnen mit metastasierter Erkrankung untersucht. Nach Einverständniserklärung wurden 105 Patientinnen von 2 Krankenhäusern in die Studie eingeschlossen. 81 Patientinnen erhielten eine primäre Operation bei Verdacht auf Mammakarzinom, von denen 56 ein Karzinom aufwiesen. 19 Patientinnen hatten eine metastasierte Erkrankung. Bei allen primären Patientinnen wurde vor der Operation 10-15 ml

Blut abgenommen, bei 33 Patientinnen auch nach der Operation. CTC wurden bei 5 von 19 metastasierten Patientinnen (26%) detektiert. Die CTC positiven Patientinnen hatten erhöhte CA15-3 Tumormarkerwerte verglichen mit den 6 ohne CTC. Insgesamt wurden die Patientinnen 36 Monate (28 – 41 Monate) nachbeobachtet. Hierbei zeigten Patientinnen mit CTC ein schlechteres Überleben als Patientinnen ohne CTC (Abbildung 9). Aufgrund der kleinen Fallzahlen war dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei den primären MK wurden bei 7 von 55 CTC (13%) vor Operation gefunden verglichen mit 6 von 33 nach Operation (18%). Nur eine Patientin hatte sowohl vor als auch nach der Operation CTC. Somit wiesen bei Addition beider Blutabnahmezeitpunkte 11 von 32 Patientinnen (34%) CTC im Blut auf. Patientinnen mit CTC zeigten einen Trend für nicht erhöhtes CEA ($p=0,055$) und negativen Her2/neu-Status ($p=0,067$). Während der medianen Nachbeobachtungszeit von 35 Monaten (8 – 40 Monate) erlitt nur eine Patientin ein Rezidiv, so dass keine Auswertung hinsichtlich der prognostischen Signifikanz der CTC möglich war (→ **Bannwarth C, Warm M, Epple N, Skibowski E, Tuscher M, Breidenbach M, Hartmann M, Roemer T, Weihrauch MR, submitted**). Tabelle 6 fasst die Patientencharakteristika und Ergebnisse der CTC-Detektion zusammen.

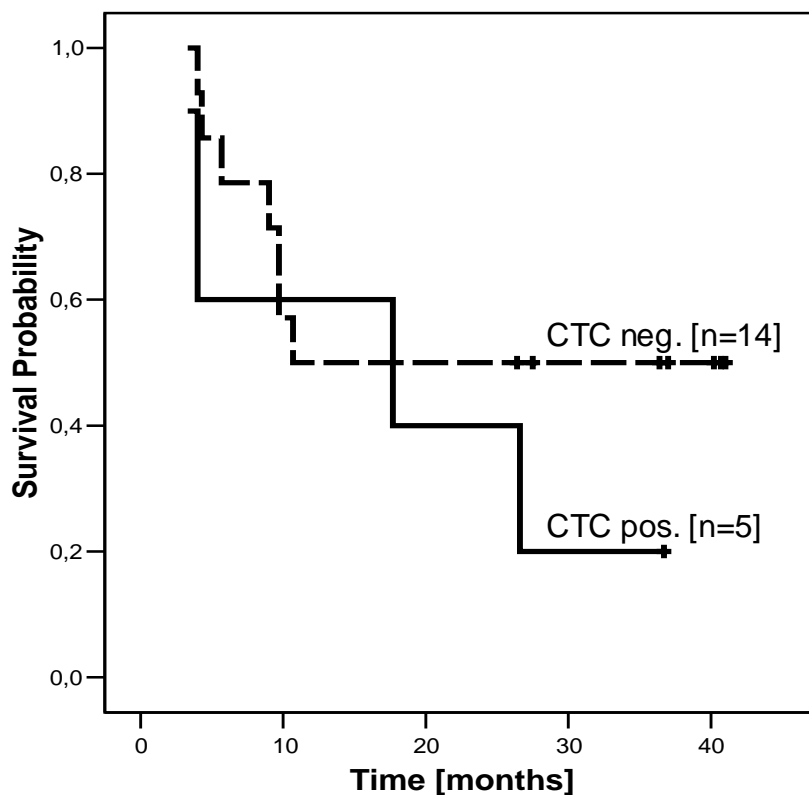


Abbildung 9. Kaplan-Meier Kurve des Survival von 19 Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom in Abhängigkeit vom Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen (CTC). Die Patienten mit CTC hatten ein geringeres mittleres Überleben als Patienten ohne CTC (log-rank Test nicht signifikant).

Tabelle 6. Charakteristika von 56 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom.

Primäre Mammakarzinom-Patientinnen (n=56)		Patientinnen mit CTC (%)
Tumorgröße	n=56 (%)	
T1	27 (48)	4 (15)
T2	16 (29)	1 (6)
T3/4	5 (9)	0
Tx	4 (7)	2 (50)
Tis	4 (7)	0
Axillärer LK-Status	n=56	
N0	27 (48)	5 (19)
N1	19 (34)	1 (5)
Nx	10 (18)	1 (10)
Tumordifferenzierung	n=56	
G1	4 (7)	1 (25)
G2	31 (55)	3 (10)
G3	7 (13)	1 (16)
Gx	14 (25)	2 (14)
CEA	n=26	
Erhöht	5 (19)	0
Normal	21 (81)	6 (29)
CA15-3	n=39	
Erhöht	3 (8)	0
Normal	36 (92)	6 (17)
HER-2 status	n=50	
Positiv (2+/3+)	12 (24)	0
Negativ (0/1+)	37 (76)	5 (14)
Östrogenrezeptor Status	n=51	
Positiv	46 (90)	5 (11)
Negativ	1 (10)	0
Progesteronrezeptor Status	n=51	
Positiv	37 (73)	5 (14)
Negativ	14 (27)	0
p53 Status	n=26	
Positiv	11 (42)	3 (27)
Negativ	15 (58)	2 (13)

4.7 Experimentelle Immuntherapie der minimalen Resterkrankung beim kolorektalen Karzinom

Nach den zuvor dargestellten Studien zur Detektion der MRD, war es Ziel, eine experimentelle Immuntherapie der MRD zu etablieren. Hierzu diente zunächst eine Studie

beim metastasierten kolorektalen Karzinom als Modell, weil in einer Studie gezeigt werden konnte, dass Patienten mit einer hohen T-Zellinfiltration im Tumor eine bessere Prognose aufweisen als Patienten mit geringer T-Zellinfiltration. Dies ist ein indirekter Hinweis auf eine mögliche „Immunogenität“ des Tumors. Ziel der Studie war es, eine Vakzinierungsstrategie zu etablieren, die zu einer signifikanten T-Zell Antwort führt, um das Konzept dann in zukünftigen Studien bei tumorfreien Patienten mit minimaler Resterkrankung anzuwenden.

In dieser prospektiv randomisierten Phase I/II Studie behandelten wir HLA-A2 positive Patienten mit unbehandeltem, metastasierten kolorektalem Karzinom mit einer Kombination aus Chemotherapie und Vakzinationen gegen das HLA-A2 restringierte CAP-1 Peptid des carcinoembryonalen Antigens. Die Studie wurde so ausgelegt, um zwei wichtige Fragen in der Immuntherapie der MRD zu beantworten:

1. Ist es möglich, mit einer Vakzinierungsstrategie, trotz gleichzeitig verabreichter Chemotherapie, eine T-Zellimmunität zu generieren?
2. Zeigt eines der Adjuvantien GM-CSF oder CpG Vorteile hinsichtlich der Immunisierung mit dem CAP-1 Peptid?

Weiterhin wurde in der Studie die Durchführbarkeit und die Toxizität dieses innovativen Regimes geprüft.

Die Kombination mit einer Chemotherapie erfolgte aus den Überlegungen, dass 1. Patienten mit durch Chemotherapie gesenkter Tumorlast besser auf eine Immuntherapie ansprechen und 2. das Schema, bestehend aus Irinotecan, 5-FU und Leukovorin, kaum lymphozytotoxisch ist und daher eine Vakzinierungsstrategie nicht einschränken sollte.

Alle Patienten erhielten das CAP-1 Peptid und Interleukin-2, wurden jedoch hinsichtlich des Adjuvans (GM-CSF, CpG oder kein Adjuvans) und hinsichtlich einer Vakzination mit dendritischen Zellen bei der ersten Verabreichung randomisiert. Abbildung 10 zeigt das Studiendesign.

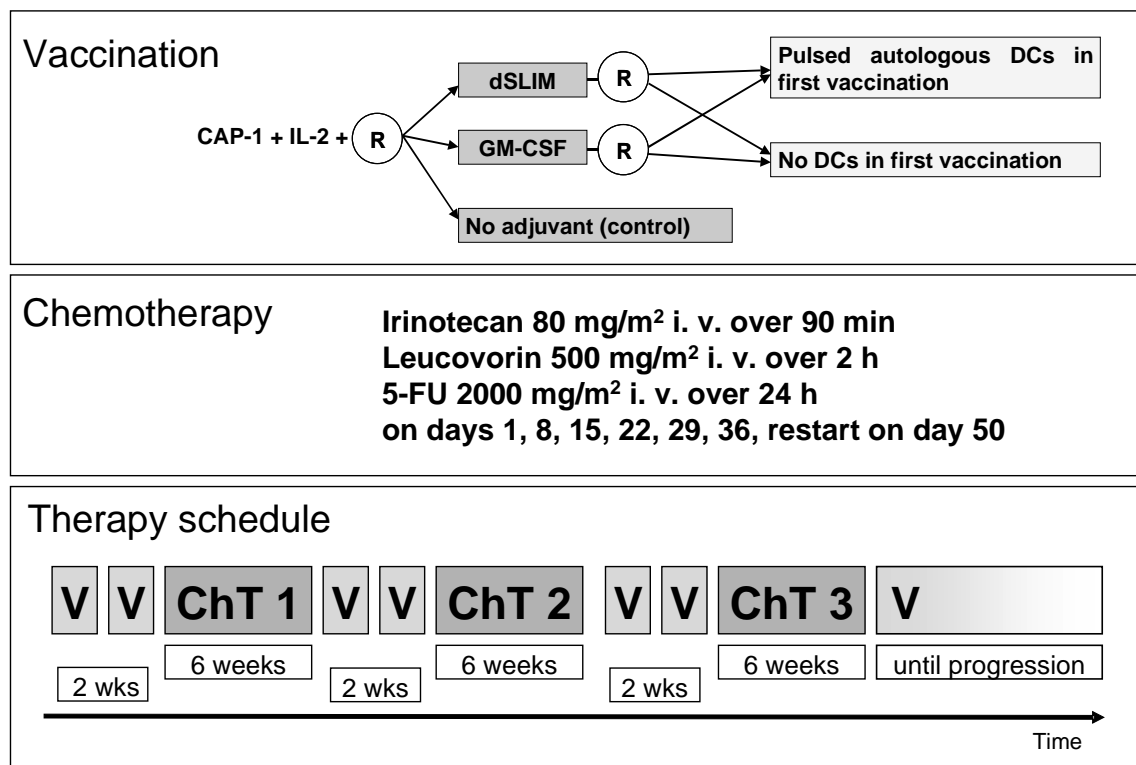


Abbildung 10. Patienten wurden zunächst hinsichtlich des Adjuvans, welches in Kombination mit CAP-1 und IL-2 verabreicht wurde, randomisiert (eingekreistes R). Danach wurde erneut randomisiert, ob die Therapie mit oder ohne autologe dendritische Zellen verabreicht wurde. Vakzinationen (V) und Chemotherapie (ChT) wurden im Wechsel verabreicht, wobei mit 2 Vakzinationen begonnen wurde.

4.7.1 Behandlung, Toxizität und klinisches Ansprechen

Insgesamt konnten 17 HLA-A2+ Patienten (13 Kolonkarzinome, 4 Rektumkarzinome) in die Studie eingeschlossen werden. Zwei von 17 Patienten erhielten CAP-1, GM-CSF, IL-2, 6 erhielten CAP-1, CpG, IL-2 und 5 Patienten erhielten nur CAP-1 und IL-2. CAP-1 gepulste dendritische Zellen wurden bei 4 Patienten während der ersten Vakzination verabreicht. Es kam bei 6 Patienten zu milden lokalen Reaktionen und bei einer Patientin zu vorübergehendem Schüttelfrost und Fieber, welches nach kurzer Zeit zurückging.

Es wurden jedoch keine Grad 3 oder Grad 4 Toxizitäten beobachtet, die der Immuntherapie zugeordnet werden konnten. Fünf der Patienten (29%) erreichten eine komplette Remission, 1 (6%) eine partielle Remission und 5 (29%) eine stabilisierte Erkrankung. Sechs der Patienten (36%) erlitten unter der Therapie eine fortschreitender Erkrankung. Es fiel auf, dass Patienten, die CpG als Adjuvans erhalten hatten, häufiger ein Ansprechen erreichten als Patienten ohne CpG (44% gegenüber 25%). Diese Daten waren jedoch aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht statistisch signifikant. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 29 Monaten, waren 11 von 17 Patienten verstorben und 5 Patienten hatten ein Rezidiv erlitten. Das rezidivfreie Überleben (FFTF) und das Gesamtüberleben (Survival) sind in Abbildung 11 dargestellt.

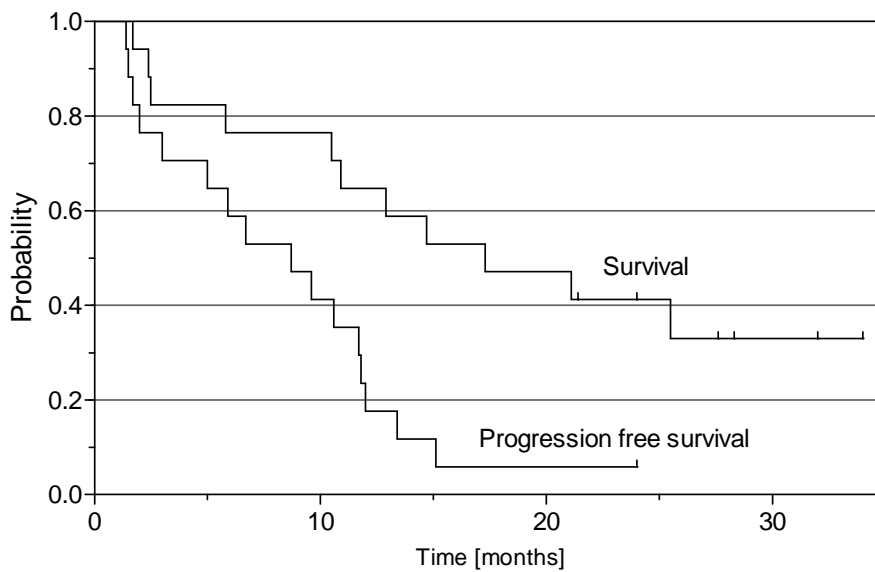


Abbildung 11. Progressionsfreie Zeit und Gesamtüberleben von 17 Patienten mit KRK, die eine kombinierte Chemo-/Immuntherapie erhielten.

4.7.2 Immunologisches Ansprechen auf die Vakzinationstherapie

Um das klinische Ansprechen auf die Immuntherapie messen zu können, wurden die Serum-CEA Verläufe nach 3 Zyklen kombinierter Immunchemotherapie bestimmt. Während dieser Zeit wurde ausschließlich eine Vakzinationserhaltungstherapie verabreicht, so dass der Effekt von Chemotherapie und Immuntherapie getrennt werden konnte. Zwölf der 17 Patienten erhielten alle 3 Chemo-/Immuntherapiezyklen und nachfolgend eine Erhaltungstherapie mit ihrem jeweiligen Immunisierungsschema. Zwei Patienten zeigten ein passageres Plateau unter der Immuntherapie und ein Patient zeigte abfallende CEA-Werte. Die CEA-Verläufe sind in Abbildung 12 wiedergegeben.

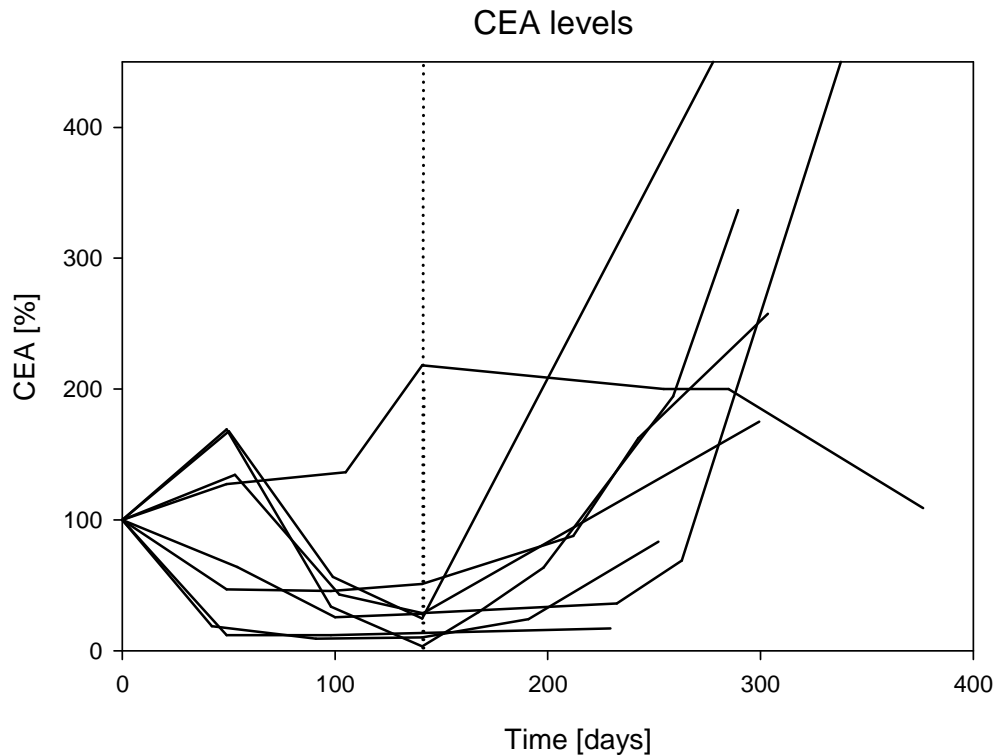


Abbildung 12. Normalisierte CEA-Werte von 8 Patienten, die nach abgeschlossener Chemo-/Immuntherapie wöchentliche Booster-Vakzinationen erhielten. Alle bis auf zwei Patienten zeigten ansteigende Werte nach Ende der Zytostatika (gestrichelte vertikale Linie).

Um die T-Zellantwort auf die Vakzinierungsstrategie zu messen, wurden CAP-1 spezifische T-Zellen mittels MHC Klasse 1-Tetramere bestimmt. Vor der ersten Immunisierung wurden bereits CAP-1 spezifische T-Zellen bei 8 der Patienten (47%) in einer medianen Frequenz von $0,045 \pm 0,035\%$ gemessen. Frühere Studien hatten gezeigt, dass Patienten mit kolorektalem Karzinom in 30-50% der Fälle bereits eine leichte Immunantwort gegen CEA aufweisen. Insgesamt konnte bei 4 Patienten (24%) ein Anstieg der spezifischen CD8+ Zellen nach 3 Zyklen Immunisierung gemessen werden. Nach einer *in vitro* Stimulation mit CAP-1 (zur Verstärkung des T-Zellsignals) konnte bei insgesamt 8 Patienten (48%) ein Anstieg der CAP-1 spezifischen Immunantwort verzeichnet werden. Abbildungen 13 und 14 zeigen Beispiele von Patienten, die auf die Vakzinationstherapie mit einem Anstieg der CAP-1 spezifischen CD8+ Zellen reagierten (→ **Weihrauch et al., Clin. Cancer Res. 2005**).

Tetramer Staining

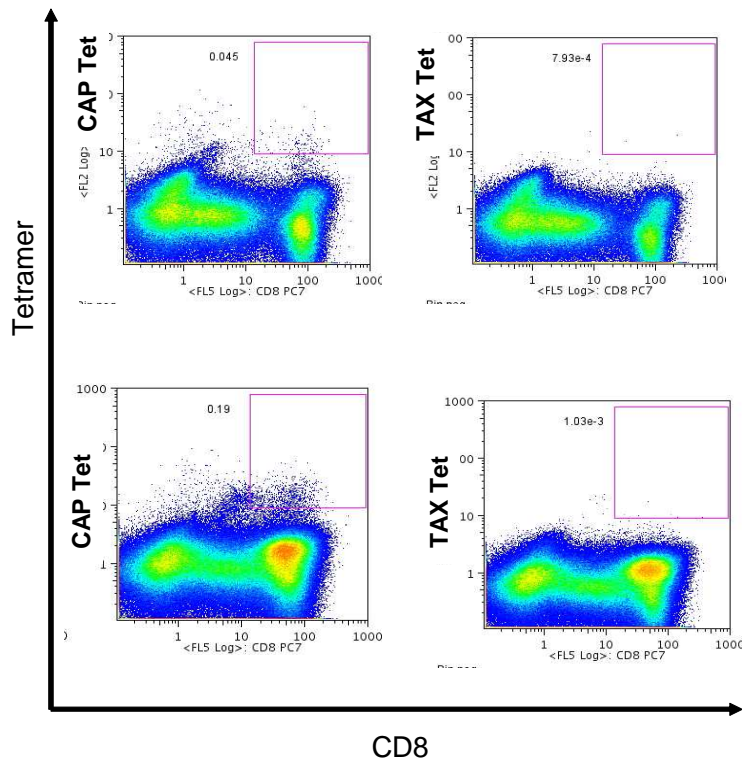


Abbildung 13. Beispiel von Patient 14, der ein Ansteigen von CAP-1 spezifischen T-Zellen (CD8+) nach 3 Zyklen Chemo-/Immuntherapie zeigt (oben: vor Therapie, unten: nach Therapie). Als Kontrolltetramer wurde TAX HTLV-1 verwendet.

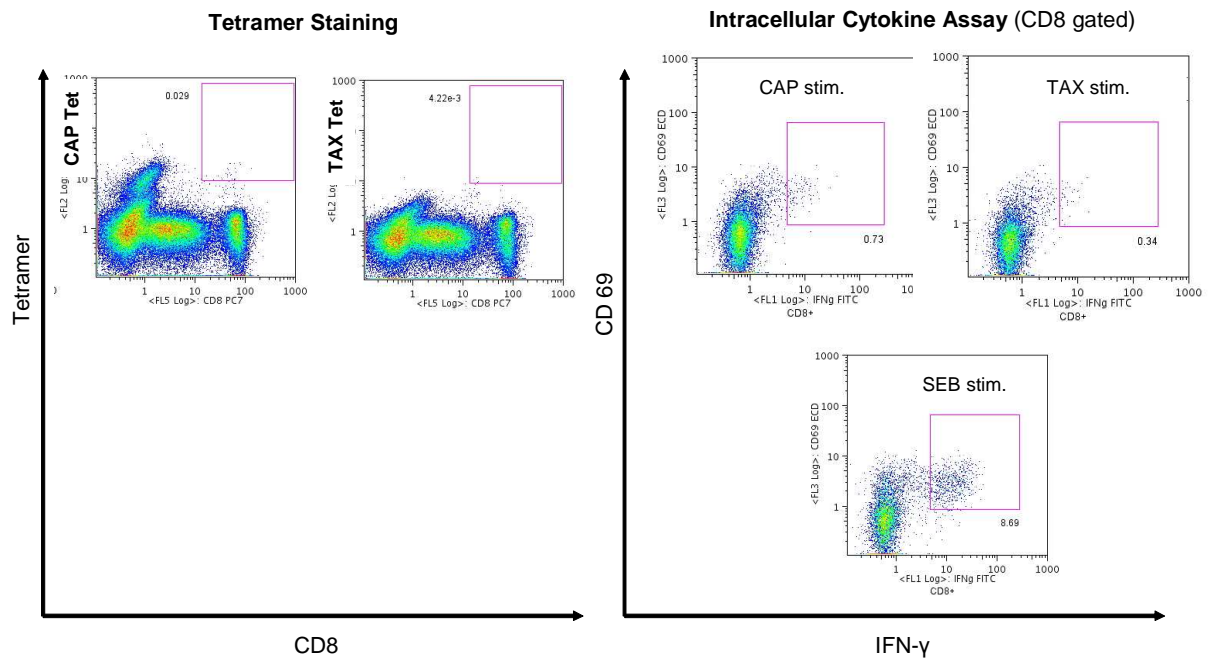


Abbildung 14. Beispiel von Patient 15, der nach insgesamt 3 Zyklen Chemo-/Immuntherapie eine CAP-1 spezifische CD8+ Antwort zeigt (linke Grafik). Diese Zellen waren in einem intrazellulären Zytokinassay funktionell (rechte Grafik).

4.7.3 Erhöhte Frequenz von regulatorischen CD25^{high}FOXP3⁺ T_{reg} Zellen vor Therapie

Regulatorische (T_{reg}) T-Zellen stellen eine Subpopulation der T-Zellen dar, welche die Aktivierung des Immunsystems unterdrücken und die Toleranz gegenüber Selbstantigenen unterstützen. Die FOXP3-exprimierenden CD4⁺CD25^{high} T_{reg} Zellen wurden im peripheren Blut vor Therapiebeginn gemessen und mit denen von gesunden Spendern verglichen (Abbildung 15A). Die Frequenz der T_{reg} Zellen betrug bei gesunden Spendern 2,9% ± 1,2% (n=22) während die Frequenz bei den Patienten mit kolorektalem Karzinom signifikant erhöht war (4,7% ± 1,2%, p<0,001). Dies wird in Abbildungen 15A und 15B dargestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass Patienten mit metastasiertem KRK eine geschwächte Immunantwort aufweisen. Der Mechanismus dieser Beobachtung ist aktuell nicht bekannt (→ **Beyer M, Schumak B, Wehrauch MR et al., submitted**).

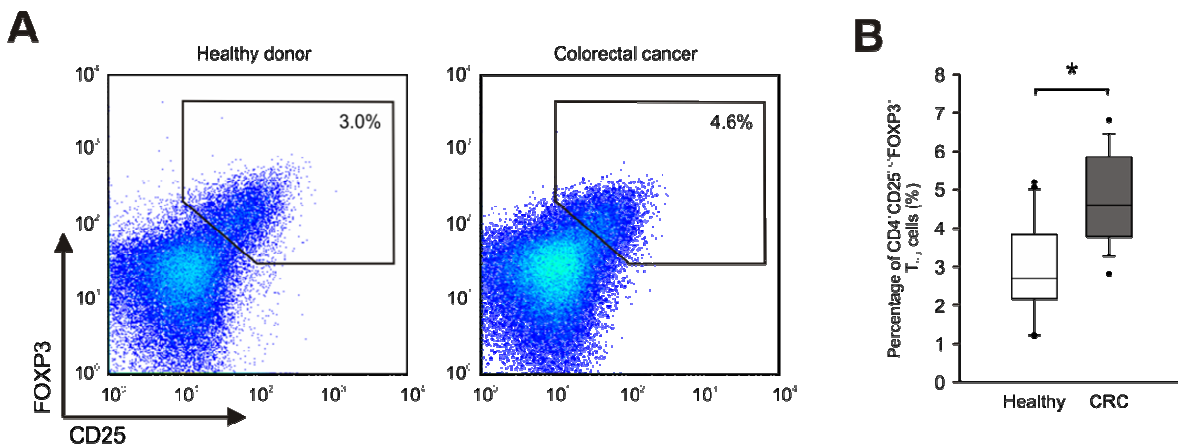


Abbildung 15. Durchflusszytometrisch bestimmte Frequenz (%) von CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg Zellen eines gesunden Spenders (A, linke Grafik) und eines Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom (A, rechte Grafik). In (B) ist die Frequenz der CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg Zellen von 22 gesunden Spendern im Vergleich zu 15 Patienten mit KRC mittels Boxplot dargestellt (p<0.05, t Test).

4.7.4 Einfluss der Chemotherapie auf die spezifische T-Zellantwort

Um den Einfluss der parallel zur Immuntherapie verabreichten Chemotherapie auf die zytotoxischen T-Zellen zu untersuchen, wurden zunächst die T-Zellkompartimente der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vor und nach Chemotherapie bestimmt. Es kam durch die Chemotherapie zu keiner signifikanten Änderung. Vor dem ersten Zyklus betragen die durchschnittlichen CD4⁺ und CD8⁺ Frequenzen 41±18% und 26±13% und nach 3 oder weniger Zyklen Chemotherapie 43±14% und 26±11% bei etwa gleichbleibenden absoluten Lymphozytenzahlen. Zusätzlich wurden die spezifischen CD8⁺ Zellen gegen sogenannte

„Recall-Antigene“ für CMV und EBV mittels MHC-Tetramere wurden gemessen, um die spezifischen CD8⁺ Zellkompartimente zu untersuchen. Es zeigte sich, dass 3 Zyklen (à 6 wöchentlichen Gaben) von Irinotecan, 5-FU und Leukovorin, einen messbaren Einfluss auf die EBV/CMV spezifischen CD8⁺ Zellen hatten. So betrug die mittlere spezifische T-Zellfrequenz vor Therapie $0,64 \pm 0,7\%$ und $0,47 \pm 0,51\%$ ($p=0,017$) nach Therapie. Dies entspricht einer geringen, aber messbaren relativen Abnahme um ca. 14%. Interessant war jedoch die Beobachtung, dass nach nur einem Zyklus (6 Gaben oder weniger) dieser Therapie die EBV/CMV spezifischen T-Zellen anstiegen und zwar im Mittel auf $1,81 \pm 2,14\%$, was einer relativen Zunahme um ca. 310% entspricht. Dies war eine wichtige Beobachtung für zukünftige Studien, da es nun wichtige Hinweise gibt, dass eine kurze, geringe Applikation von Chemotherapie die antigenspezifische zytotoxische T-Zellimmunität steigern kann. Dies steht vermutlich in Zusammenhang mit der Erniedrigung der sogenannten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (→ **Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrach MR et al., Blood 2006**). Abbildung 16 zeigt Beispiele dieser spezifischen T-Zellzunahme.

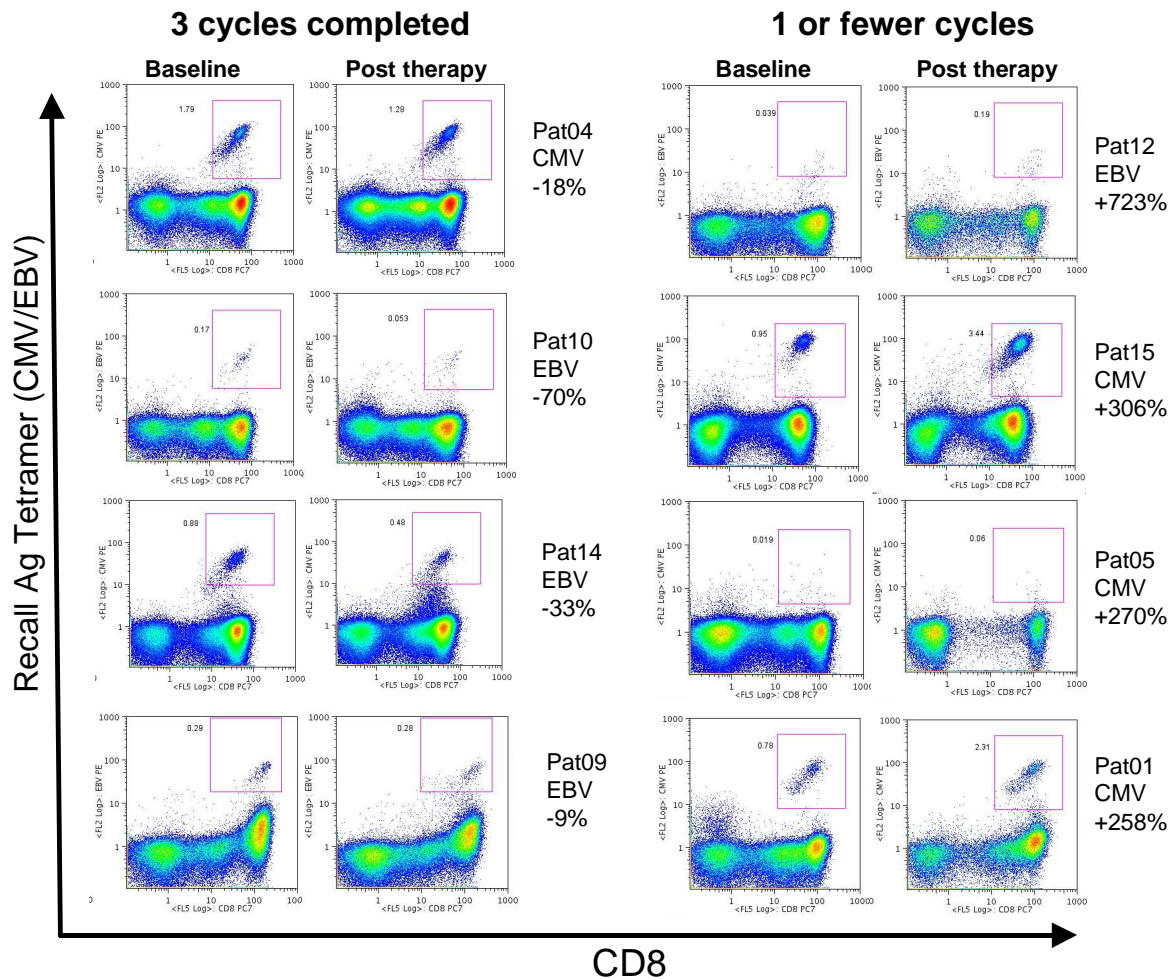


Abbildung 16. Durchflusszytometrische Analyse von CMV und EBV spezifischen zytotoxischen T-Zellen bei 4 von 11 Patienten, die 3 Zyklen (2 linke Säulen), bzw. 4 von 5 Patienten, die nur 1 oder weniger Zyklen (2 rechte Säulen) Chemotherapie erhielten. Patienten mit 3 Zyklen zeigten eine statistisch signifikante Abnahme der CMV/EBV spezifischen T-Zellen, während Patienten mit 1 oder weniger Zyklen einen Anstieg zeigten.

4.7.5 Eine CAP-1 spezifische T-Zelllinie kann durch wiederholte CAP1-6D-Stimulation generiert werden

Um die MHC-Tetramere gegen CAP-1 zu testen und weitere Versuche zur CAP-1 spezifischen Immunantwort der Patienten durchzuführen, wurde eine CAP-1 CD8+ T-Zelllinie mittels wiederholter *in vitro* Stimulation generiert. Dies gelang jedoch nicht durch Stimulation mit CAP-1, sondern erst mittels des heteroklitischen und potenteren Peptids CAP1-6D. Abbildung 17 zeigt die CAP-1 Tetrameranalyse dieser Zelllinie sowie den funktionellen Nachweis der Lysefähigkeit gegenüber CAP-1 beladenen T2-Zellen (→ **Weihrauch et al., Clin. Cancer Res. 2005**).

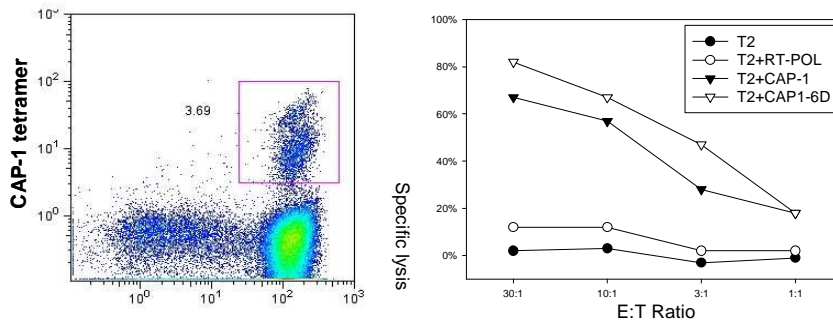


Abbildung 17. Tetrameranalyse einer CAP-1 spezifischen zytotoxischen T-Zelllinie (linke Grafik). Im Europium Zytotoxizitätsassay waren diese Zellen in der Lage, mit CAP-1 beladene T2-Zellen zu lysieren (rechte Grafik).

Literaturverzeichnis der zitierten eigenen Arbeiten

Weihrauch MR, Ansen S, Jurkiewicz E, Geisen C, Xia Z, Anderson KS, Schmidt M, Wittig B, Diehl V, Wolf J, Bohlen H, Nadler LM. Phase I/II combined immuno-/chemotherapy with CEA derived HLA-A2 restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2005 Aug 15;11(16):5993-6001

Weihrauch MR, Manzke O, Beyer M, Haverkamp H, Diehl V, Bohlen H, Wolf J, Schultze JL. Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic factor. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5516-9

Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, Voiss W, Re D, Kuhn-Regnier F, Bannwarth C, Siedeck M, Diehl V, Bohlen H: Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: Correlation with established clinical parameters. *J Clin Oncol* 20:4338-4343 (2002)

Weihrauch MR, Skibowski E, Draube A, Geller A, Tesch H, Diehl V, Bohlen H: Immunomagnetic enrichment and detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with epithelial malignancies. *Clin Exp Metastasis* 19:617-621 (2002)

Bannwarth C, Warm M, Epple N, Skibowski E, Tuscher M, Breidenbach M, Hartmann M, Roemer T, Weihrauch MR. Immunomagnetic enrichment and detection of circulating tumor cells in primary and metastatic breast cancer: correlation with clinical parameters and prognostic significance. *Submitted*

Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrauch MR, Knolle PA, Classen S, Schultze JL.: *In vivo* peripheral expansion of naïve CD4+CD25high FOXP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood* 107(10):3940-9 (2006)

Beyer M, Schumak B, Weihrauch MR, Andres B, Giese T, Endl E, Knolle PA, Classen S, Schultze JL.: *In vivo* expansion of naïve CD4+CD25high FOXP3+ regulatory T cells in patients with colorectal carcinoma after IL-2 administration. *Submitted*

Rautert R, Franklin J, Weihrauch M, Schinkoethe T, Böll B, Pogge E, Engert A, Diehl V, Re D. Elevated pretreatment Interleukin-10 serum level is an IPS-independent risk factor for early treatment failure in advanced stage Hodgkin Lymphoma. *Leukemia Lymphoma*, accepted (2008)

Weihrauch MR, Re D, Scheidhauer K, Ansen S, Dietlein M, Bischoff S, Bohlen H, Wolf J, Schicha H, Diehl V, Tesch H: Thoracic positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for the evaluation of residual mediastinal Hodgkin disease. *Blood* 98:2930-2934 (2001)

Weihrauch MR, Re D, Bischoff S, Dietlein M, Scheidhauer K, Krug B, Textoris F, Ansen S, Franklin J, Bohlen H, Wolf J, Schicha H, Diehl V, Tesch H: Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for initial staging of patients with Hodgkin's disease. *Ann Hematol* 81:20-25 (2002)

5 Ausblick

Die Studien der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die minimale Resterkrankung der entscheidende prognostische Faktor für das Überleben beim kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom wie auch beim Hodgkin Lymphom ist. Zahlreiche andere internationale Studien haben dies mittlerweile für die meisten anderen Tumorerkrankungen belegt. Nun muss es Ziel sein, einen tatsächlichen Nutzen aus dem Erkenntnisgewinn und der „Detektierbarkeit“ der MRD zu ziehen. Insbesondere Chemotherapien können häufig die MRD nicht zerstören, da sich die Zellen in einer chemotherapieresistenten Ruhephase des Zellzyklus befinden.

Ein Ansatz ist daher, wie bereits beschrieben, die passive oder aktive Immuntherapie. Um nun die beiden dargestellten Studienbereiche – Detektion und Behandlung der MRD – zusammenzubringen, wird derzeit eine Phase I/II Studie zur Vakzinationstherapie mit CpG und ggf. einem Zielantigen beim kolorektalen Karzinom geplant. In diese Studie sollen Patienten nach kurativer Leberresektion, quasi im „tumorfremem“ Stadium eingeschlossen werden und mit dieser innovativen Therapie placebokontrolliert nachbehandelt werden. Solange die Tumorlast des Patienten gering ist, ist der Ansatz einer Immuntherapie vielversprechend. Die Instrumente zur Bestimmung der residuellen Erkrankung sind, wie die vorliegende Arbeit zeigt, vorhanden, um den Erfolg unserer zukünftigen experimentellen Studien zu analysieren.

6 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Hans Tesch und Herrn Prof. Dr. med. Volker Diehl für die Förderung und die Möglichkeit danken, die wissenschaftlichen Arbeiten an der Uniklinik Köln aufzunehmen. Herrn Prof. Dr. med. Michael Hallek, Direktor der Klinik I für Innere Medizin, möchte ich ganz besonders danken, dass er mir ermöglicht hat, die wissenschaftlichen Arbeiten an der hiesigen Klinik fortzusetzen und mit klinischem Schwerpunkt Patienten mit kolorektalem Karzinom in Studien zu behandeln.

Herrn PD Dr. med. Heribert Bohlen möchte ich für die Zeit als „Post-Doc“ im Labor für Immunologie und für die stetige Unterstützung sowie für den kontinuierlichen beiderseitigen Ideenaustausch danken.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des ehemaligen Immunologischen Labors, Herrn PD Dr. med. Oliver Manzke, Frau Dr. rer. nat. Caroline Geisen, Frau Dr. rer. nat. Elke Jurkiewicz und natürlich meinen Doktoranden, deren exzellente Arbeit die Studien teilweise erst möglich werden ließen (E. Skibowski, C. Bannwarth, S. Bischof, N. Epple, M. Kandic, B. Seiberlich).

7 Literatur

1. Cheng Z, Xiong Z, Subbarayan M, Chen X, Gambhir SS. (64)Cu-Labeled Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Analog for MicroPET Imaging of Melanocortin 1 Receptor Expression. *Bioconjug Chem* (2007)
2. Cai W, Chen K, He L, Cao Q, Koong A, Chen X. Quantitative PET of EGFR expression in xenograft-bearing mice using (64)Cu-labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2007)
3. Dankerl A, Liebisch P, Glatting G, Friesen C, Blumstein NM, Kocot D, Wendl C, Bunjes D, Reske SN. Multiple Myeloma: Molecular Imaging with 11C-Methionine PET/CT--Initial Experience. *Radiology* 242:498-508, (2007)
4. Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, Dobrozemsky G, Heute D, Uprimny C, Kovacs P, Von GE, Bale R, Virgolini IJ. 68Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J Nucl Med* 48:508-518, (2007)
5. Mankoff DA, Tewson TJ, Eary JF. Analysis of blood clearance and labeled metabolites for the estrogen receptor tracer [F-18]-16 alpha-fluoroestradiol (FES). *Nucl Med Biol* 24:341-348, (1997)
6. Newman JS, Francis IR, Kaminski MS, Wahl RL. Imaging of lymphoma with PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: correlation with CT. *Radiology* 190:111-116, (1994)
7. Hoh CK, Glaspy J, Rosen P, Dahlbom M, Lee SJ, Kunkel L, Hawkin RA, Maddahi J, Phelps ME. Whole-body FDG-PET imaging for staging of Hodgkin's disease and lymphoma. *J Nucl Med* 38:343-348, (1997)
8. Ingram CE, Belli AM, Lewars MD, Reznick RH, Husband JE. Normal lymph node size in the mediastinum: a retrospective study in two patient groups. *Clin Radiol* 40:35-39, (1989)
9. Bangerter M, Moog F, Buchmann I, Kotzerke J, Griesshammer M, Hafner M, Elsner K, Frickhofen N, Reske SN, Bergmann L. Whole-body 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) for accurate staging of Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 9:1117-1122, (1998)
10. Moog F, Bangerter M, Diederichs CG, Guhlmann A, Kotzerke J, Merkle E, Kolokythas O, Herrmann F, Reske SN. Lymphoma: role of whole-body 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose (FDG) PET in nodal staging. *Radiology* 203:795-800, (1997)
11. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, Tesch H, Herrmann R, Dorken B, Muller-Hermelink HK, Duhmke E, Loeffler M. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 348:2386-2395, (2003)

12. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Muller G, Foss HD, Royer HD, Stein H, Dorken B. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 94:2065-2071, (1999)
13. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR, Kingma DW, Setsuda JE, Tosato G. Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia. *Blood* 93:2463-2470, (1999)
14. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 339:1506-1514, (1998)
15. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 271:21514-21521, (1996)
16. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11:81-88, (1999)
17. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187:875-883, (1998)
18. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165:2205-2213, (2000)
19. Coombes RC, Berger U, Mansi J, Redding H, Powles TJ, Neville AM, McKinna A, Nash AG, Gazet JC, Ford HT, . Prognostic significance of micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer. *NCI Monogr* 51-53, (1986)
20. Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, . Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 2:1271-1274, (1983)
21. Choismel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thiery JP, Blin N. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res* 6:R556-R570, (2004)
22. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91:1113-1124, (1999)
23. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353:793-802, (2005)

24. Wiedswang G, Naess AB, Naume B, Karesen R. Micrometastasis to axillary lymph nodes and bone marrow in breast cancer patients. *Breast* 10:237-242, (2001)
25. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 21:3469-3478, (2003)
26. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347:649-653, (1996)
27. Sugio K, Kase S, Sakada T, Yamazaki K, Yamaguchi M, Ondo K, Yano T. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery* 131:S226-S231, (2002)
28. Leinung S, Wurl P, Weiss CL, Roder I, Schonfelder M. Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 385:337-343, (2000)
29. Werther K, Normark M, Brunner N, Nielsen HJ. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 62:49-57, (2002)
30. Seeliger H, Spatz H, Jauch KW. Minimal residual disease in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res* 162:79-87, (2003)
31. Zehentner BK. Detection of disseminated tumor cells: strategies and diagnostic implications. *Expert Rev Mol Diagn* 2:41-48, (2002)
32. Braun S, Marth C. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer--toward individualized treatment? *N Engl J Med* 351:824-826, (2004)
33. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791, (2004)
34. Wong LS, Bateman WJ, Morris AG, Fraser IA. Detection of circulating tumour cells with the magnetic activated cell sorter. *Br J Surg* 82:1333-1337, (1995)
35. Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 26:252-264, (1998)
36. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Inculet R, Vallieres E, Fry W, Bethune D, Ayoub J, Ding K, Seymour L, Graham B, Tsao MS, Gandara D, Kesler K, Demmy T, Shepherd F. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 352:2589-2597, (2005)

37. Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, Macdonald JS, Labianca R, Haller DG, Shepherd LE, Seitz JF, Francini G. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *N Engl J Med* 345:1091-1097, (2001)
38. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2343-2351, (2004)
39. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutterlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297:267-277, (2007)
40. Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A, Bassler R. High dose chemotherapy for poor prognosis breast cancer: Systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* (2007)
41. Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18:80-86, (2000)
42. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85:1419-1424, (1993)
43. 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 PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964, (2006)
44. Mosolits S, Nilsson B, Mellstedt H. Towards therapeutic vaccines for colorectal carcinoma: a review of clinical trials. *Expert Rev Vaccines* 4:329-350, (2005)
45. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lyerly HK. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 5:1331-1338, (1999)
46. Morse MA, Lyerly HK. Dendritic cell-based approaches to cancer immunotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* 7:1617-1627, (1998)
47. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S, Niedzwiecki D, Panicali D, Schlom J, Lyerly HK. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 11:3017-3024, (2005)
48. 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, 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* 10:929-937, (2004)
49. Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Jr., Stuart RK, Oken MM, Benson AB, III, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG, Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 18:148-157, (2000)
 50. Hoover HC, Jr., Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J, Muenz LR, Hanna MG, Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow-up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol* 11:390-399, (1993)
 51. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG, Jr., Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353:345-350, (1999)
 52. Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87:982-990, (1995)
 53. Tsang KY, Zhu M, Nieroda CA, Correale P, Zaremba S, Hamilton JM, Cole D, Lam C, Schlom J. Phenotypic stability of a cytotoxic T-cell line directed against an immunodominant epitope of human carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 3:2439-2449, (1997)
 54. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 82:121-124, (1999)
 55. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, Schlom J, Ryback ME, Lyerly HK. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 5:1331-1338, (1999)
 56. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S, Niedzwiecki D, Panicali D, Schlom J, Lyerly HK. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 11:3017-3024, (2005)
 57. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549, (1995)
 58. Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2:305-315, (2003)
 59. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 9:831-835, (2003)

60. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 24:693-701, (2004)
61. Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, Krieg AM, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS* 19:1473-1479, (2005)
62. Schmidt M, Anton K, Nordhaus C, Junghans C, Wittig B, Worm M. Cytokine and Ig-production by CG-containing sequences with phosphodiester backbone and dumbbell-shape. *Allergy* 61:56-63, (2006)