

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 HLA-Typisierung von Melanomzelllinien, gesunden Kontrollpersonen sowie Melanompatienten mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS)**

In dieser Studie sollte zur Analyse der tumorgerichteten T-Zellantwort hauptsächlich allogene, in bestimmten HLA-Allelen übereinstimmende Tumorzelllinien benutzt werden, die im Gegensatz zu bisher häufig eingesetzten isolierten Peptiden und Proteinen, ein breiteres Antigenpektrum bieten. Zudem wurde dieser Ansatz aufgrund der besseren Verfügbarkeit von allogenem Tumormaterial im Vergleich zu autologem Tumormaterial gewählt, welches oft schwierig und nur bei wenigen Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium zu gewinnen ist. Aus Gründen der Häufigkeitsverteilung und Praktikabilität fand eine Beschränkung auf die HLA-Typen A1 und A2 statt. Zunächst wurden daher entsprechende Tumorzelllinien ausgewählt, deren HLA-Typ entweder bekannt oder durch FACS-Analysen ermittelt wurde. Daneben konnte eine Gruppe von gesunden Kontrollpersonen und Melanompatienten mit Hilfe von FACS-Analysen HLA-typisiert und eine Reihe geeigneter HLA-A1+ und HLA-A2+ Personen gefunden werden.

#### **3.2 Analyse von Oberflächenrezeptoren auf Tumorzellen mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS)**

Als Voraussetzung für eine effektive Antigenpräsentation spielen neben der Expressionsdichte von MHC-Molekülen, kostimulatorische Signale (B7-1=CD80, B7.2=CD86) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1=CD54, LFA-3=CD58) eine wichtige Rolle. Daher wurde die Existenz solcher Oberflächenstrukturen auf den zuvor als HLA-A1+ und HLA-A2+ charakterisierten Tumorzellen mittels FACS-Analyse untersucht. Die fünf letztlich ausgewählten Melanom-Zelllinien zeigten alle das Vorliegen von HLA-Klasse I und Klasse-II Molekülen, sowie die Expression von ICAM-1 und LFA-3. Zusätzlich zeichneten sich die

Melanom-Zelllinien SK-Mel-24 und MKR durch eine schwache Expression von B7-1 und B7-2 aus (siehe Tabelle 3.1).

**TABELLE 3.1:**

FACS-Analyse zur HLA-Typisierung und Charakterisierung der kostimulatorischen Signale auf Tumorzelllinien

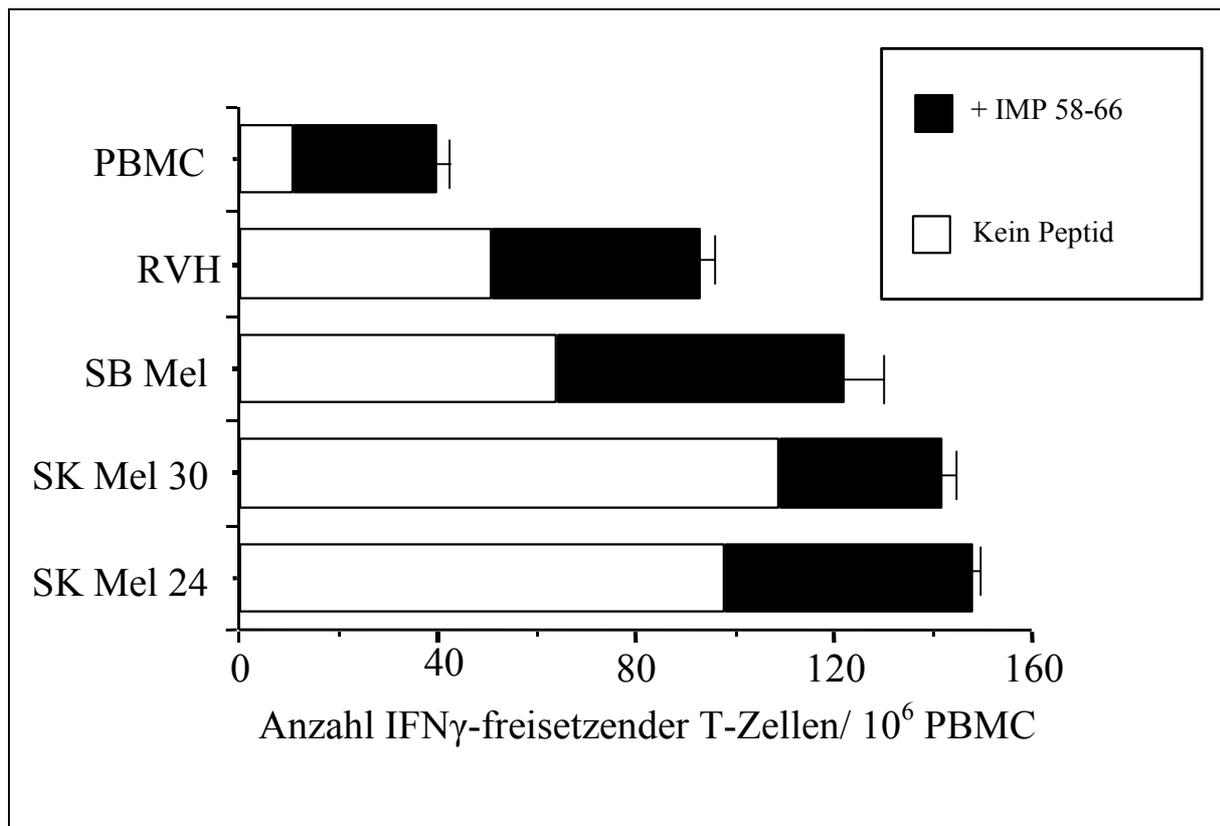
	<b>RVH</b>	<b>SB-Mel</b>	<b>SK-Mel- 30</b>	<b>SK-Mel- 24</b>	<b>MKR</b>
Kontrolle Sekundärer Antikörper (GAM-FITC)	46	37	41	56	21
HLA-A2 - GAM-FITC	234	155	129	168	25
HLA-A1 - GAM-FITC	50	43	57	130	108
Isotypen - Kontrolle (IgG-FITC)	6	4	6	5	4
HLA-KL I - FITC	105	76	82	129	175
HLA-DR - FITC	25	37	25	47	68
CD54 - FITC	31	50	48	82	45
CD58 - FITC	17	25	25	42	23
CD80 - FITC	6	5	8	14	14
CD86 - FITC	9	7	8	14	18

Die Tabelle zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der primär bzw. sekundär fluoreszenzmarkierten Oberflächenrezeptoren.

### **3.3 Analyse der Antigen-präsentierenden Fähigkeiten von HLA-A2+ Tumorzelllinien im ELISPOT-Assay**

Um die Antigen-präsentierende Funktion der vier HLA-A2+ Tumorzelllinien RVH, SB-Mel, SK-Mel-30 und SK-Mel-24 zu analysieren, wurden diese mit dem HLA-A2-bindenden Influenza-Peptid IMP7190 für zwei Stunden vorbeladen. Danach erfolgte eine Koinkubation

über 24 Stunden mit Influenza-reaktiven MNCs einer HLA-A2+ gesunden Person im ELISPOT-Assay. Alle Melanomzelllinien waren in der Lage das Peptid zu präsentieren und IFN $\gamma$ -freisetzende Influenza-spezifische T-Zellen zu induzieren (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:**

Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender Influenza-spezifischer T-Zellen eines HLA-A2+ Spenders als Reaktion auf HLA-A2+ MNCs und Melanomzelllinien sowie Influenza-Peptid (IMP 58-66)-vorbeladene HLA-A2+ MNCs und Melanomzelllinien. MNCs und Melanomzelllinien wurden 2h zuvor mit 1 $\mu$ g/ $\mu$ l des HLA-A2 bindenden Influenza-Peptids vorbeladen, anschließend gewaschen und 24h mit den MNCs des HLA-A2+ Spenders im ELISPOT inkubiert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes werden als Anzahl an Spots/1x 10<sup>6</sup> MNCs dargestellt.

### **3.4 T-Zellantwort HLA-A1+ und HLA-A2+ gesunder Kontrollpersonen gegen allogene Tumorzelllinien**

Um bei dem gewählten Ansatz mit allogenen Tumorzelllinien das mögliche Auftreten von Alloreaktivität zu analysieren, wurde zunächst die Frequenz reaktiver T-Zellen gegen HLA-A1-idente und HLA-A2-idente Melanomzelllinien bei gesunden Kontrollpersonen bestimmt. Es standen neun HLA-A2+ gesunde Personen zur Verfügung, deren T-Zellreaktivität gegen vier HLA-A2+ Melanomzelllinien gemessen wurde. Außerdem wurde die Anzahl an IFN $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen bei sieben HLA-A1+ gesunden Personen gegen die HLA-A1+ Melanomzelllinien MKR und SK-Mel-24 analysiert. Die MNCs wurden dafür über 24 Stunden gemeinsam mit den Tumor-Zelllinien im ELISPOT-Assay inkubiert. HLA-A1+ und HLA-A2+ gesunde Kontrollpersonen zeigten nur geringe Frequenzen IFN $\gamma$ - freisetzender T-Zellen gegen die einzelnen Melanomzelllinien mit max. 0,02%, 0,02%, 0,01%, 0,01%, 0,006%, 0,004%, 0,002%, 0,002%, 0,001% IFN $\gamma$ - freisetzenden T-Zellen pro 10<sup>6</sup> MNCs (siehe Tabelle 3.2 und 3.3). Basierend auf diesen Daten wurde für jede Tumorzelllinie ein Grenzwert definiert, bestehend aus Mittelwert und dreifacher Standardabweichung (siehe Tabelle 3.2 und 3.3). Bei der Analyse der T-Zell-Reaktivität der Tumorpatienten wurden nur die T-Zell-Frequenzen als spezifisch Tumor-gerichtet gewertet, die über diesem Grenzwert lagen.

### **3.5 T-Zellantwort von Melanom-Patienten gegen allogene Tumorzelllinien**

Als nächstes wurde die T-Zell-Antwort von 15 HLA-A2+ und von vier HLA-A1+ Patienten mit metastasiertem Melanom gegen HLA-A1- bzw. A2-idente allogene Tumor-Zelllinien analysiert. Dabei wurden die HLA-A2+ Melanomzelllinien RVH, SB-Mel, SK-Mel-24 und SK-Mel-30 und HLA-A1+ Melanomzelllinien MKR und SK-Mel 24 als Ziel-Zellen im ELISPOT eingesetzt. Elf von 19 Patienten zeigten nach der zuvor genannten Definition eine Tumor-gerichtete-T-Zellantwort mit max. 0,81%, 0,78%, 0,53%, 0,12%, 0,10%, 0,09%, 0,07%, 0,06%, 0,06%, 0,04% und 0,04% IFN $\gamma$ -freisetzenden T-Zellen pro 10<sup>6</sup> MNCs gegen mindestens eine der allogenen Melanomzelllinien. Die Frequenzen dieser Patienten (Pat.

Nr.1-7, Pat Nr.12, Pat Nr.14, Pat Nr.16 und Pat Nr.17) lagen deutlich über dem Mittelwert und der dreifachen Standardabweichung der Reaktion der gesunden Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3.2). Alle weiteren Patienten wiesen T-Zell-Frequenzen auf, die innerhalb des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung der gesunden Kontrollgruppe lagen.

Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten Melanom-reaktiver T-Zellen der HLA-A2+ gesunden Kontrollgruppe und den HLA-A2+ Melanompatienten für die drei Melanomzelllinien RVH ( $p=0,028$ ), SK-Mel-30 ( $p=0,05$ ) und SK-Mel-24 ( $p=0,021$ ). Der Vergleich der Melanom-gerichteten T-Zellantwort zwischen Gesunden und Melanompatienten für die Zelllinie SB-Mel zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0,594$ ). Die statistische Prüfung der Frequenzen Melanom-reaktiver T-Zellen bei Gesunden im Vergleich zu Melanompatienten wurde mit dem Wilcoxon-Rangreihentest für unabhängige Stichproben durchgeführt.

**TABELLE 3.2 –**  
T-Zell-Reaktion gesunder Kontrollpersonen und Melanom-  
patienten gegen ein Panel HLA-A2+ Melanomzelllinien

	Hinter- grund	RVH -----	SBMel (Hintergrund subtrahiert)	SK-Mel-30	SK-Mel-24
Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender T-Zellen /10 <sup>6</sup> PBMC					
Spender 1	7	9	8	5	8
Spender 2	0	9	90	6	29
Spender 3	11	51	64	109	102
Spender 4	3	17	21	21	10
Spender 5	3	31	43	39	41
Spender 6	13	4	7	18	34
Spender 7	9	174	41	210	151
Spender 8	18	215	20	240	145
Spender 9	2	56	13	11	41
Mittelwert	7	63	34	73	62
Median	5	31	21	21	39
MW +3SD	n. a.	294	118	346	287
Pat 1	0	3800	2600	863	8100
Pat 2	3	7870	89	975	1145
Pat 3	4	924	95	967	533
Pat 4	13	856	38	489	714
Pat 5	33	217	64	27	714
Pat 6	7	250	3	433	118
Pat 7	22	203	3	210	363
Pat 8	0	72	17	7	68
Pat 9	9	54	3	48	21
Pat 10	0	69	15	22	73
Pat 11	2	158	8	95	86
Pat 12	46	582	845	1200	1088
Pat 13	38	470	80	468	568
Pat 14	7	26	33	69	177
Pat 15	0	5	15	89	15
Mittelwert	9	1316 <sup>1</sup>	267 <sup>2</sup>	376 <sup>3</sup>	1085 <sup>4</sup>
Median	4	217	17	210	363

Wilcoxon Rangreihentest: <sup>1</sup>p= 0,028, <sup>2</sup>p= 0,594, <sup>3</sup>p= 0,05, <sup>4</sup>p= 0,021  
n.a. = nicht analysiert

**TABELLE 3.3:**  
T-Zell-Reaktion von gesunden Kontrollpersonen  
und Melanompatienten gegen ein Panel von  
HLA-A1+ Melanomzelllinien

	Hinter- grund	MKR ---(Hintergrund subtrahiert)---	SK-Mel-24
Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender T-Zellen /10 <sup>6</sup> PBMC			
Spender 1	5	63	23
Spender 2	20	44	40
Spender 3	35	128	132
Spender 4	103	140	47
Spender 5	10	82	122
Spender 6	12	40	32
Spender 7	25	149	230
Mittelwert	30	92	89
Median	20	82	47
MW +3 SD	n.a.	230	314
Pat 16	33	5350	3500
Pat 17	10	562	440
Pat 18	12	60	127
Pat 19	0	74	91

n.a.= nicht analysiert

### 3.6 T-Zellantwort gegen allogene Melanomzelllinien bei verkürztem Antigen-Kontakt

Um auszuschließen, dass es bereits durch die 24-stündige Inkubation von T-Zellen mit den Tumorzellen zu einer Veränderung des Aktivierungszustandes der T-Zellen durch „in vitro“-Einflüsse kommt, wurde bei Pat Nr.1 zusätzlich ein ELISPOT-Assay mit nur sechs-stündiger Koinkubation durchgeführt. Dabei zeigten sich ähnliche Frequenzen an IFN $\gamma$ -freisetzenden T-

Zellen nach sechs Stunden und nach 24 Stunden gegen die Melanomzelllinien SBMel (n=2600/n=2300) und SK-Mel-30 (n=733/n=800). Die IFN $\gamma$ -Spots wiesen allerdings eine geringere Intensität auf und waren im Durchschnitt nach sechs Stunden kleiner als nach 24 Stunden.

### 3.7 Subpopulations-Analysen Tumor-reaktiver T-Zellen

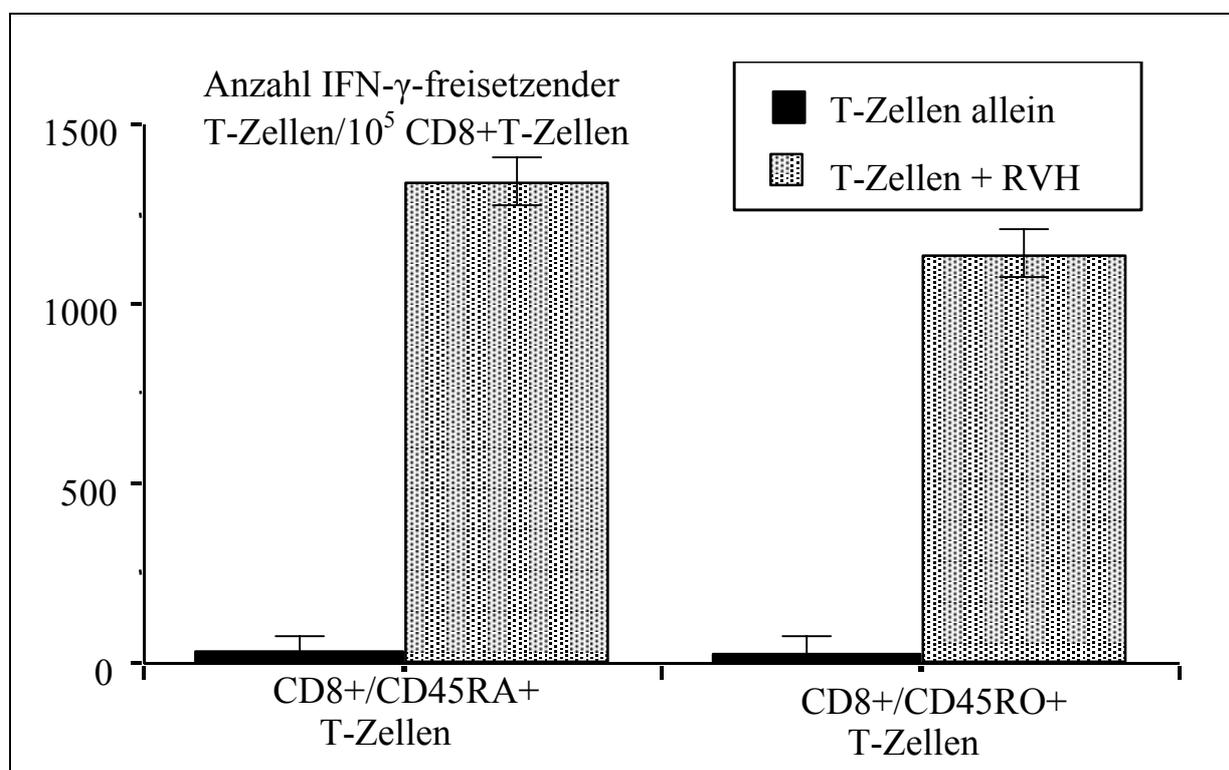
Zur weiteren Charakterisierung der Tumor-reaktiven T-Zellen wurden bei zwei HLA-A2+ Melanom-Patienten (Nr.1+2) mit hohen Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen CD4+ und CD8+ T-Zellen isoliert. Die Reinheit der mit dem MiniMACS-System durchgeführten Separation wurde mittels FACS-Analysen kontrolliert und lag bei über 95%. Der überwiegende Teil der Tumor-reaktiven T-Zellen war im CD8+-Kompartiment anzutreffen. Nur wenige CD4+ T-Zellen zeigten Reaktionen gegen die verschiedenen Tumorzelllinien (siehe Tabelle 3.4).

#### TABELLE 3.4:

Reaktion von CD8+ und CD4+- T-Zellen bei 2 HLA-A2+ Melanompatienten gegen ein Panel HLA-A2+ Melanomzelllinien

	Hinter- grund	RVH -----	SBMel (Hintergrund subtrahiert)	SK-Mel-30 -----	SK-Mel-24 -----
Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender T-Zellen /10 <sup>6</sup> PBMC					
Patient 1 CD8+	0	3800	5010	1310	8350
Patient 1 CD4+	0	200	0	0	0
Patient 2 CD8+	0	3500	134	1236	1570
Patient 2 CD4+	0	0	0	0	0

In Studien von HAMANN et al. wurden innerhalb der CD8+ Fraktion verschiedene Subpopulationen charakterisiert, darunter Naive-, Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen. Nur Gedächtnis- (CD8+/CD45RO+) und Effektor-T-Zellen (CD8+/CD45RA+) sind in der Lage IFN $\gamma$  freizusetzen, im Gegensatz zu Naiven CD8+/CD45RA+ T-Zellen, welche diese Fähigkeit nicht besitzen (HAMANN 1997+1999). Zur näheren Identifizierung der Tumorreaktiven CD8+ T-Zellen wurden CD45RA+ und CD45RO+ T-Zellen von Pat Nr.1 mit dem MiniMACS-System separiert und im ELISPOT analysiert. Eine T-Zellantwort gegen die allogene Melanomzelllinie RVH fand sich in beiden Subpopulationen (siehe Abbildung 3.3). Diese Daten legen nahe, dass Tumor-reaktive T-Zellen sowohl CD8+ Gedächtnis-Typ- als auch CD8+ Effektor-Typ-T-Zellen sind.

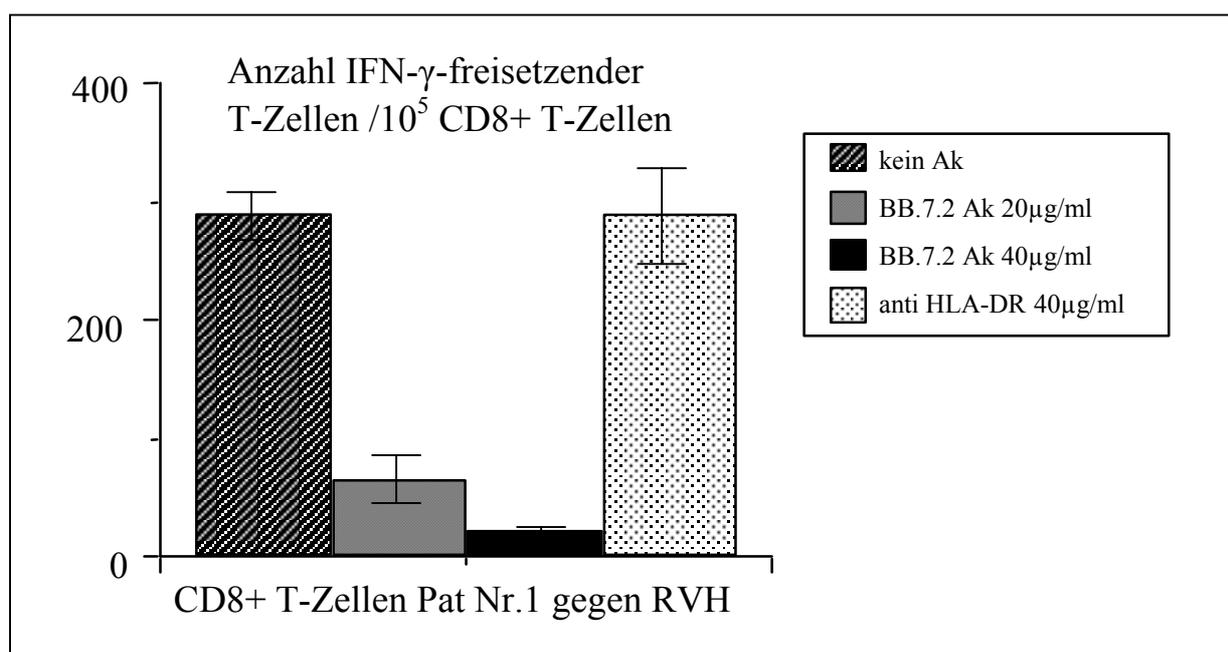


**Abbildung 3.2**

Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender T-Zellen der CD8+/CD45RA+ und CD8+/CD45RO+ Subpopulation als Reaktion auf die HLA-A2+ Melanomzelllinie RVH bei Patient Nr.1. CD8+/CD45RA+ und CD8+/CD45RO+ T-Zellen wurden mit einer Reinheit  $\geq 90\%$  aus PBMCs isoliert, wie unter 2.2.4 beschrieben. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$ /well eingesetzt und 24 h lang mit der Tumorzelllinie RVH im IFN $\gamma$ -ELISPOT Assay inkubiert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments werden als Anzahl an Spots/ $1 \times 10^5$  MNCs dargestellt.

### 3.8 Blockierungsexperimente mit Tumor-reaktiven T-Zellen bei zwei HLA-A2+Melanompatienten

Im nächsten Schritt wurden bei zwei HLA-A2+ Melanom-Patienten Blockierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden CD8+ T-Zellen zunächst mit dem anti-HLA-A2-Antikörper BB7.2 bzw. dem anti-HLA-DR-Antikörper AIMHC II beladen und dann für 24 Stunden mit einer HLA-A2-identen allogenen Tumorzelllinie im ELISPOT inkubiert. Die T-Zell-Reaktion konnte dosisabhängig durch den anti-HLA-A2-Antikörper bis zu 97% bei Pat Nr.1 (siehe Abbildung 3.3) und bis zu 75% bei Pat Nr.3 (Daten nicht gezeigt) blockiert werden. Der anti-HLA-DR-Antikörper zeigte keinen Einfluss auf die T-Zell-Reaktivität. Somit handelt es sich um eine über HLA-A2 vermittelte, MHC-Klasse-I-abhängige Reaktion von CD8+T-Zellen.

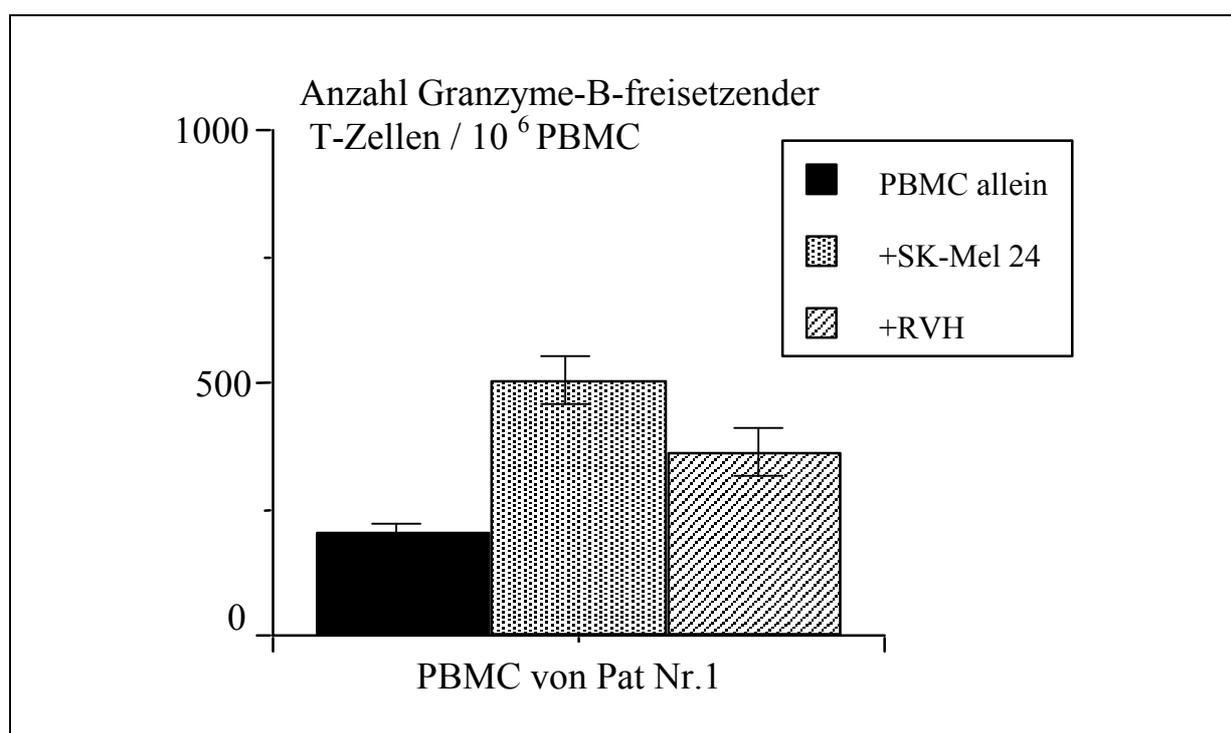


**Abbildung 3.3:**

Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender CD8+ T-Zellen als Reaktion auf die HLA-A2+ Melanomzelllinie RVH bei Patient Nr.1: Die T-Zellantwort konnte durch den anti-HLA-A2-mAk BB7.2 in einer Konzentration von 20 $\mu$ g/ml und 40 $\mu$ g/ml blockiert werden. Eine Blockade durch den anti-HLA-DR-mAk AIMHC-II konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments werden als Anzahl an Spots/ $1 \times 10^5$  MNCs dargestellt.

### 3.9 Analyse der Granzyme-B-Freisetzung Tumor-reaktiver T-Zellen

Granzyme-B stellt einen von zytotoxischen T-Zellen produzierten Mediator dar, der in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird und einen schnellen Tod der Zielzelle durch Apoptose induzieren kann (BERTHOU 1998, PHAM 1997, SHI 1997). Die Granzyme-B-Freisetzung Tumor-reaktiver T-Zellen von Pat. Nr.1 wurde im ELISPOT-Assay mit einem Antikörper-Paar, welches Granzyme-B erkennt, analysiert. Gegen die beiden untersuchten allogenen HLA-A2+ Melanomzelllinien RVH und SK-Mel-24 konnten Granzyme-B-freisetzende T-Zellen beobachtet werden. Die Zahl der Granzyme-B-freisetzenden T-Zellen lag deutlich unter den Frequenzen der IFN $\gamma$ -freisetzenden Tumor-reaktiven T-Zellen. Der relativ hohe Hintergrund Granzyme-B-freisetzender Zellen ohne Antigen-Kontakt, wurde auch bei unstimulierten MNCs gesunder Spender in diesem Assay beobachtet.



**Abbildung 3.4:**

Anzahl Granzyme-B freisetzender T-Zellen als Reaktion auf die HLA-A2+ Melanomzelllinien RVH und SB-Mel-24 bei Patient Nr.1. PBMCs wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$ /well eingesetzt und 24h lang entweder allein oder mit den Tumorzelllinien RVH und SB-Mel-24 im Granzyme-B-ELISPOT-Assay inkubiert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes werden als Anzahl an Spots/ $1 \times 10^5$  MNCs dargestellt.

### **3.10 T-Zellantwort von Melanompatienten gegen autologe Tumorzelllinien im Vergleich mit allogenen Tumorzelllinien**

Um Aussagen über die Repräsentativität der T-Zell-Antwort gegen allogene Melanomzelllinien in Bezug auf die T-Zell-Antwort gegen autologe Tumoren treffen zu können, wurden weitere fünf Melanompatienten analysiert, bei denen autologe Tumorzelllinien zur Verfügung standen. Vier der fünf Patienten zeigten eine T-Zell-Antwort gegen ihre autologe Tumorzelllinie mit 0,06% (Pat Nr. 12), 0,03% (Pat Nr. 19), 0,01% (Pat Nr. 13) und 0,005% (Pat Nr. 14) IFN $\gamma$ -freisetzender MNCs (siehe Tabelle 3.5). Bei zwei dieser vier HLA-A2+ Patienten wurden ähnliche Frequenzen Tumor-reaktiver T-Zellen gegen die allogenen HLA-A2+ Melanomzelllinien SK-Mel-24, SK-Mel-30 und RVH bei Pat Nr. 12 und gegen die HLA-A1+ SK-Mel-24 bei Pat Nr. 13, wie gegen die autologen Zelllinien beobachtet. Weniger als 0,01% Tumor-reaktiver T-Zellen gegen die allogenen HLA-A1+ Tumorzelllinien wurden bei Pat Nr. 19 gemessen, was möglicherweise auf die Erkennung eines Individual-spezifischen Antigens hindeutet, welches auf den allogenen Tumorzelllinien nicht vorhanden ist. Dagegen konnten bei Pat Nr.17 10 bis 20-fach höhere Zahlen an reaktiven T-Zellen gegen die vier allogenen Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die autologe Tumorzelllinie die entsprechenden Ziel-Antigene oder die Fähigkeit, diese zu präsentieren, verloren hat. Pat Nr.15 zeigte sowohl gegen die autologe als auch gegen die allogenen HLA-A2+ Zelllinien nur eine geringe T-Zell-Antwort unter 0,01%.

**TABELLE 3.5:**

T-Zell-Reaktion gegen autologe Tumorzelllinien und gegen allogene HLA-A-idente Melanomzelllinien bei Melanompatienten

		HLA-A2+ Melanomzelllinien				
Hintergrund	Autol.	RVH	SBMel	SK-Mel-30	SK-Mel-24	
		----- (Hintergrund subtrahiert) -----				
Anzahl IFN $\gamma$ -freisetzender T-Zellen /10 <sup>6</sup> PBMC						
Pat 12 (A2+)	58	46	582	845	1200	1088
Pat 13 (A2+)	38	582	470	80	468	568
Pat 14 (A2+)	7	118	26	33	69	177
Pat 15 (A2+)	0	0	5	15	89	15
		HLA-A1+ Melanomzelllinien				
Hintergrund	Autol.	MKR	SK-Mel-24			
		----- (Hintergrund subtrahiert) -----				
Pat 19 (A1+)	0	308	74	91		

Autol. = autologer Tumor

### **3.11 Klinischer Verlauf bei Melanompatienten mit Tumor-reaktiven T-Zellen**

Drei Patienten mit hochfrequenter T-Zellantwort gegen allogene Tumorzelllinien (Pat Nr.4, Nr.6 und Nr.16) hatten nach vorhergehender Immuntherapie mit Hochdosis IL-2 und/oder IFN- $\alpha$  enthaltenen Therapieschemata eine komplette oder partielle Tumor-Remission erreicht (siehe Tabelle 3.6). Zusätzlich konnte bei Pat Nr.17 nach Vakzinierungstherapie mit IL-12-transfizierten autologen Melanomzellen eine stabile Tumorerkrankung nachgewiesen werden. Ein anderer Patient (Nr.3) stellte sich mit einer Lymphknotenmetastase melanotischen Ursprungs vor, jedoch ohne ein nachweisbares primäres Melanom. Möglicherweise wurde der primäre Tumor dieses Patienten immunologisch zerstört. Sechs der 11 Patienten bei denen Tumor-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden konnten, hatten einen progredient wachsenden metastasierenden Tumor. Von diesen sechs Patienten hatten drei eine Immuntherapie mit Hochdosis IL-2 und/oder IFN- $\alpha$  erhalten ohne eine klinische Antwort zu zeigen, was wiederum die Existenz von Tumor-Escape-Mechanismen wahrscheinlich macht.

**TABELLE 3.6** – Patienten-Charakteristika, Tumor Status zum Zeitpunkt der Analyse und Melanom-gerichtete T-Zell-Antwort

Patient Nr..	Bisherige Behandlung			Status zum Zeitpunkt der Analyse			Maximaler Prozentsatz tumor-reaktiver T-Zellen gegen allogene Linien
	HLA- Typ	systemische Therapie	Antwort auf Therapie	Tumor Stadium	Metastasen- Lokalisation	Tumor Status	
1	A2	Keine	n.a	IV	Blase, LK	Progredienz	0.81%
2	A2	CDDP/ IFN $\alpha$ /IL-2	PD	IV	LK	Progredienz	0.78%
3	A2	Keine	n.a.	III b	NED	NED	0.10%
4	A2	CDDP/IFN $\alpha$	PR	IV	Pankreas, LK	Rezidiv	0.09%
5	A2	IFN $\alpha$ /IL-2	PD	IV	Lunge, LK	Progredienz	0.07%
6	A2	IFN $\gamma$ /IL-2	CR	IV	NED	NED	0.04%
7	A2	Keine	n.a.	IV	Weichteil	Progredienz	0.04%
8	A2	CDDP/ IFN $\alpha$ /IL-2	PR	IV	Leber, Lunge	Rezidiv	<0.01%
9	A2	CDDP/IFN $\alpha$	CR	IV	Leber, LK	Rezidiv	<0.01%
10	A2	Tyrosinase Peptid	n.a.	IV	NED, wdh. Hautmet., alle reseziert	NED	<0.01%
11	A2	IFN $\alpha$ /DTIC Tyrosinase Peptid	PD PD	IV	Leber, LK	Progredienz	<0.01%
12	A2	IFN $\alpha$ /DTIC/VDS IL-2/Vakzinierung autol. Melanom	PD SD	IV	LK, Dünndarm	SD	0.12%
13	A2	Keine	n.a.	IV	Weichteil	Progredienz	0.06%
14	A2	CDDP/DTIC/IFN $\alpha$	PD	IV	Weichteil	Progredienz	<0.02%
15	A2	IFN $\alpha$ /IL-2 Vakzinierung Den- dritische Zellen	PR	IV	Haut, Lunge	SD	<0.01%
16	A1	MAGE-3 Protein CDDP/DTIC	PD	IV	NED	Anhaltende Remission	0.53%
17	A1	IFN $\alpha$ /IL-2 MAGE-3 Protein CDDP/DTIC/IFN $\alpha$	PR PD	IV	Weichteil	Progredienz	0.06%
18	A1	CDDP/DTIC IFN $\alpha$ /IL-2	CR	IV	NED	NED	<0.01%
19	A1	VDS/ IFN $\alpha$ IL-2/Vakzinierung autol. Melanom	PD SD	IV	LK, Haut	SD	<0.01%

CDDP=Cis-diamine-dichloro-platinum, CR=complete remission, DTIC=Dacarbazin, LK=Lymphknoten, NED=No evidence of disease, n.a.=nicht analysiert, PD=progressive disease, SD=stable disease, VDS=Vindesin