

Dutch Summary



Nederlandse samenvatting

Zoals besproken in **Hoofdstuk 1**, blijft volledige chirurgische excisie in een vroeg stadium de enige curatieve behandeling voor melanomen aangezien er bijna geen beschikbare adjuvante behandelopties zijn. Het melanoom is echter een relatief immunogeen tumortype en bijzonder vatbaar voor immunotherapeutische benaderingen. (1) Een dicht netwerk van cutane Dendritische Cellen (DC) zou een rol kunnen spelen in de gevonden effectiviteit van huidvaccins en is een aantrekkelijk doelwit voor immunotherapie van melanomen. Enkele fenotypisch verschillende DC groepen zijn te onderscheiden in de huid: o.a. epidermale Langerhans cellen (LC) en dermale DC (dDC). Na activatie kunnen beide subgroepen efficiënt migreren naar de drainerende lymfeklieren (LN) van het melanoom om daar een T-cel gemedieerde immuunreactie uit te lokken. (2) Helaas wordt de ontwikkeling van melanomen in een vroeg stadium gekenmerkt door sterke onderdrukking van het immuunsysteem, welke ongecontroleerde groei en verspreiding van de tumor bevordert. Met name het gebied rond de primaire tumor en de eerstelijns tumor-drainerende LN, de zogenoemde Schildwachtklier (SLN), worden de dupe van deze, door het melanoom geïnduceerde, immuunonderdrukking. Dit zijn precies de plaatsen waar anti-melanoom effector-T-cellen geprikkeld zouden moeten worden door DC om vroege uitzaaiing te voorkomen. (3-5) Via lokale immunopotentiëring kan de huid gebruikt worden voor het activeren van DC en voor het versterken van een effectieve T-cel gemedieerde anti-melanoom immuniteit, zelfs bij deze onderdrukking van het immuunsysteem.

Klinische observaties in melanoompatiënten

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we de invloed op ziektevrije en algehele overleving van het type diagnostische biopsie en van de aanwezigheid van residuale tumorcellen in het re-excisie preparaat. Na (gedeeltelijke) verwijdering van een gepigmenteerde huidlaesie werd bij 471 patiënten een stadium I/II melanoom vastgesteld en ondergingen zij een re-excisie en een SLN biopsie. Alle patiënten werden prospectief gevolgd tot 5 jaar na de diagnose. Patiënten werden ingedeeld aan de hand van 1) hun diagnostische biopsietype (wijde excisiebiopsie (n = 279), krappe excisiebiopsie (109), excisiebiopsie met positieve marges (n = 52) en de incisiebiopsie (n = 31)) en 2) de aanwezigheid van residuale tumorcellen in het re-excisie preparaat (n = 41). De overlevingsanalyse werd uitgevoerd met behulp van Cox's proportional hazard model aangepast voor de acht belangrijkste variabelen gerelateerd aan de overleving van melanoompatiënten. We concludeerden dat noch het diagnostische biopsietype, noch de aanwezigheid van tumorcellen in het re-excisiepreparaat invloed hadden op de ziektevrije en totale overleving van melanoompatiënten. Niettemin wordt routinematig gebruik van incisiebiopten niet aanbevolen. Incisiebiopten bestaan vaak uit slechts een klein percentage van de oppervlakte van de gepigmenteerde huidlaesie, waardoor het moeilijk is een representatief tumorgebied vast te stellen. (6) Bovendien, is het lastig de diepte en mate van invasie te evalueren in een incisiebiopsie wat kan leiden tot over- of onderschatting van de tumor. (7, 8) Uiteraard zijn deze problemen minder relevant voor excisiebiopten met positieve marges, waar de meerderheid van de laesie is verwijderd en alleen de buitenste randen zijn gecompromitteerd. Dit maakt een fout in de steekpoel hoogst onwaarschijnlijk. De incidentiecijfers van het melanoom blijven stijgen. (9) Vroegtijdige opsporing van melanomen is nog steeds de enige manier om de overleving van melanoompatiënten te verbeteren. (10) Het is van belang dat alle artsen zich zeker voelen bij het verwijderen van een voor melanoom verdacht, gepigmenteerde huidlaesie. Incisiebiopten worden niet aanbevolen, maar er is geen reden tot bezorgdheid wanneer een excisiebiopsie positieve marges blijkt te hebben.

In **Hoofdstuk 3** evalueerden we de klinische resultaten van fase I/II melanoompatiënten die selectieve SLN dissectie ondergingen na een follow-up (FU) van ten minste 10 jaar. We analyseerden verschillende variabelen van ziektevrije overleving, waaronder de invloed van het aantal bijkomende positieve lymfeklieren na volledige lymfklierdissectie (CLND) en de tumorgrootte in de schildwachtklier. Tweehonderdvierentwintig patiënten met een klinisch stadium I/II cutaan melanoom met een FU van 10 jaar werden geanalyseerd. Drieënveertig patiënten hadden een positieve SLN. Informatie over de grootte van de lymfkliermetastase was beschikbaar voor alle patiënten. Ziektevrije en totale overleving analyses werden uitgevoerd met behulp van de Kaplan-Meier benadering. Cox's proportional hazards regression model werd gebruikt om de aan DFS en OS gerelateerd covariabelen te analyseren. De algemene en de ziektevrije overleving blijven dalen na 5 jaar. Dit was het meest uitgesproken bij patiënten met bijkomende positieve lymfeklieren na CLND en bij patiënten met een SLN tumorbelasting van $>1,0 \text{ mm}^2$. Wij raden aan dat SLN procedures worden uitgevoerd voor melanomen $\geq 0.9 \text{ mm}$ Breslow en dat alle patiënten met een tumordikte onder de 1 mm Breslow niet vervolgd hoeven worden, onafhankelijk van hun SLN status. De eerste 5 jaar blijft de meest kritische periode in het bijzonder voor patiënten met een positieve SLN, ulceratie, lymfinvasie en zeker voor patiënten met positieve LN bij CLND. Desalniettemin vinden we dat hoog risico patiënten extra aandacht verdienen en minstens 10 jaar gevolgd moeten worden.

Immunohistochemie van de primaire tumoren en de SLN van stadium I/II melanoompatiënten

Het cellulaire immuunsysteem speelt een belangrijke rol in de immuunrespons bij melanoompatiënten. (11, 12) In de **Hoofdstukken 4 en 5** hebben we gekeken naar de invloed van de tumorinfiltrerende lymfocyten (TIL) op de SLN status en de overleving. In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of de aanwezigheid van TIL en Natural Killer (NK) cellen gecorreleerd is aan de expressie van MHC-I of MHC-II op primaire tumorcellen en/of antigeen presenterende cellen en of dit gerelateerd was aan de klinische uitkomst bij klinisch stadium II melanoompatiënten. Diagnostische primaire tumormonsters van 35 patiënten met een melanoom zijn onderzocht en geëvalueerd op de aanwezigheid van Granzym B (GrB), CD8, CD4 en/of CD56 TIL populaties na immunohistochemische kleuring. Bovendien werd de expressie van MHC-I en -II op de tumor en/of tumorinfiltrerende cellen onderzocht. De expressie van PI-9, een GrB remmer, werd in melanoomcellen bepaald en gecorreleerd aan de overleving. Ziektevrije overleving werd gekozen als klinisch eindpunt. Aanwezigheid van geactiveerde cytotoxische TIL bleek een gunstige prognostische factor, onafhankelijk van geslacht, Breslow dikte, ulceratie en SLN status. Bovendien was er een significante correlatie tussen de aanwezigheid van geactiveerde cytotoxische TIL en de expressie van MHC-I op tumorcellen en expressie van MHC-II op intratumorale antigeen presenterende cellen. De aanwezigheid van geactiveerde cytotoxische TIL en vermeende intacte antigeenpresentatie in het kader van MHC-I en MHC-II in primaire melanomen was een voorspellende factor van een gunstige uitkomst bij klinisch stadium II melanoompatiënten. Deze gegevens ondersteunen de idee dat een intact cellulaire immuunreactie een belangrijke factor is bij het voorkomen van (vroeg) invasie en verspreiding van melanoomcellen. In **Hoofdstuk 5** werd de mogelijke associatie tussen de aanwezigheid van geactiveerde en/of onderdrukkende TIL en SLN status bij klinisch stadium I/II melanoompatiënten onderzocht. Diagnostische primaire tumormonsters van 20 patiënten met een SLN metastase werden vergeleken met melanoommonsters van 20 patiënten met een schone SLN. Er waren geen verschillen tussen de patiënten wat betreft geslacht, leeftijd en Breslow dikte. Aanwezigheid van geactiveerde GrB TIL, van onderdrukkende (FoxP3) TIL en MHC klasse I-antigeenexpressie op tumorcellen werd geanalyseerd met behulp van immunohistochemie. FoxP3⁺ en MHC-I expressie had geen directe invloed op de aanwezigheid van melanoomuitzaaiingen in de SLN. Aanwezigheid van

geactiveerde GrB⁺ TIL in het primaire melanoom had geen voorspellende waarde voor SLN status. Wel was hun afwezigheid sterk geassocieerd met de aanwezigheid van uitzaaiingen in de SLN. Hoewel GrB⁺ en FoxP3⁺ TIL beiden gevonden konden worden in SLN metastasen, brengt een meerderheid van deze uitzaaiingen geen MHC-I tot expressie. Deze gegevens onderschrijven het idee dat cytotoxische T-cellen een rol spelen in de preventie van vroege uitzaaiing van melanomen naar de drainerende lymfeklieren en suggereren dat de aanwezigheid van onderdrukkende FoxP3⁺ TILs verantwoordelijk is voor de verspreiding van melanoomcellen in de aanwezigheid van geactiveerde effector T-cellen. Deze resultaten komen overeen met eerdere studies waaruit blijkt dat de aanwezigheid van lymfocyten in melanoombiopsen geassocieerd is met een gunstig klinisch resultaat. (13-15) Bovendien tonen onze data aan dat melanoominfiltrerende T-lymfocyten bestaan uit CD4⁺, CD8⁺ en geactiveerde GrB⁺ cytotoxische T-lymfocyten populaties. Activatie van deze cytotoxische T-lymfocyten is afhankelijk van de specifieke MHC-I antigen herkenning en de aanwezigheid van CD4⁺ T-helpercellen die co-stimulerende moleculen tot expressie brengen en cytokines produceren. (16, 17) Omdat we een sterke correlatie vonden tussen de aanwezigheid van TIL en intacte MHC-I expressie op melanoomcellen, onderschrijven onze gegevens het idee dat het verlies van MHC-I expressie resulteert in het spaak lopen van een cellulaire anti-melanoom reactie. Daarom is het verlies van MHC-I expressie een belangrijke manier van de tumor om aan het immuunsysteem te ontsnappen. (18, 19) Het belang van een cellulaire respons in de primaire tumor kan ook worden gezien in het feit dat het ontbreken van GrB⁺ TIL in het primair melanoombiops sterk wordt geassocieerd met de aanwezigheid van metastasen in de SLN. Deze gegevens tonen aan dat een actieve cellulaire immuunreactie belangrijk is voor het voorkomen van uitzaaiingen naar de lymfeklieren.

Priming van de SLN van melanoompatiënten met GM-CSF en/or PF-3512676 CpG-B

Gestoorde immuunfuncties in de SLN kunnen zorgen voor vroegtijdige metastasering. Lokale toediening van PF-3512676 (voorheen bekend als CpG 7909) en Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) heeft in eerdere studies geleid tot immunostimulatoire effecten op zowel DC als T-cel subgroepen. (20-27) Eerder hebben we twee kleine fase II studies uitgevoerd om de effecten van GM-CSF of CpG bij melanoompatiënten te kunnen beoordelen. In de eerste studie kregen 12 stadium I melanoompatiënten dagelijks vier intradermale (i.d.) injecties van GM-CSF (3 µg/kg) of een zoutoplossing. (28, 29) DC fenotypen in de SLN werden door middel van flowcytometrie beoordeeld. Daarnaast onderzochten we de frequentie en functionaliteit van CD8⁺ T-cellen middels hun reactie op melanoom-afgeleide peptiden in een IFN γ -Elispot assay. De patiënten die GM-CSF ontvingen vertoonden een significante toename van het aantal en de activatie van CD1a⁺ Conventionele DC (cDC), wat werd geassocieerd met een meer robuuste melanoom-specifieke CD8⁺ T-cel respons in de SLN, in vergelijking met patiënten die een zoutoplossing hadden ontvangen. Daarnaast correleerde de frequentie van melanoomspecifieke T-cellen rechtstreeks met mature CD83⁺CD1a⁺ DC-frequenties in de SLN, wat het belang onderstreept van goed geactiveerde DC in de inductie van een anti-melanoom immuunrespons. In een tweede fase-II onderzoek kregen 23 stadium I/II melanoompatiënten een intradermale injectie van 8 mg PF-3512676 of een zoutoplossing. (30) PF-3512676 toediening resulteerde in grotere SLN en hogere opbrengsten van geïsoleerde SLN leukocyten. Ook werd een duidelijke verbetering van zowel plasmacytoïde DC (pDC) en CD1a⁺ cDC maturatie en activering gezien en een significante daling van Treg frequenties in de SLN. Daarnaast was toediening van PF-3512676 geassocieerd met de aanwezigheid van een onlangs geïdentificeerde mature CD11c^{hi}CD123⁺CD83⁺TRAIL⁺ SLN-cDC subgroep en een verhoogde afgifte van meerdere inflammatoire cytokines.

In **Hoofdstuk 6** zijn we nagegaan of deze immunostimulerende effecten van PF-3512676 zich ook vertaalden in hogere frequenties van melanoom-specifieke CD8⁺ T-cellen. Hiervoor werden CD8⁺ T-cellen uit de SLN en uit perifere bloed getest op reactiviteit op verschillende HLA-A1/A2/A3-gebonden epitopen, afgeleid van verschillende Melanoom-geassocieerde antigenen (MAA) met behulp van een IFN- γ ELISPOT test in 21 van 24 geïncubeerde patiënten.

De frequentie van NK-cellen en de frequentie en de maturatie van DC subgroepen in de SLN werden bepaald door flowcytometrie. Melanoomspecifieke CD8⁺ T-cel respons tegen meer dan één MAA-afgeleide epitoot werd gevonden in de SLN-cellen bij 0 van de 11 patiënten die een zoutoplossing toegediend kregen tegen 5 van de 10 patiënten in de PF-3512676 toegediende groep. Van de 5 patiënten die een reactie vertoonden hadden 4 ook een meetbare respons op meer dan één MAA epitoot in het bloed. Verder is er een duidelijke relatie gevonden tussen de toename van de frequentie in de SLN van zowel MAA-specifieke CD8⁺ T-cellen of NK-cellen en CpG-geïnduceerde pDC maturatie. Deze gegevens tonen een toename aan van melanoomspecifieke CD8⁺ T-cellen, evenals een verhoogde concentratie NK effectorcellen na een enkele dosis PF-3512676. Bovendien wijst de significante correlatie tussen geactiveerd SLN-pDC aan de ene kant en NK-cellen en melanoomspecifieke CD8⁺ T-cel reactiviteit in zowel de SLN als de bloedmonsters na behandeling aan de andere kant, er sterk op dat lokale en systemische bescherming tegen tumoruitzaaiing het gevolg is van directe PF-3512676-geïnduceerde pDC activering in plaats van indirecte (bijvoorbeeld via IFN α) cDC activering. Al met al suggereren deze gegevens een rol voor lokale toediening van PF-3512676 als adjuvante behandeling in een vroeg stadium bij de bestrijding van melanoomuitzaaiingen.

In **Hoofdstuk 7** onderzochten we de gecombineerde effecten van een lage dosis GM-CSF en PF-3512676 CpG-B op cDC en pDC subgroep in de SLN, in een poging de reactie van het immuunsysteem tegen uitzaaiingen te versterken. GM-CSF werkt met name op CD1a⁺ cDC en CpG-B op pDC en niet-klassieke CD1a⁻CD11c^{hi} cDC. Door een combinatie van beiden te gebruiken hoopten we een maximale DC subgroep activering te verkrijgen. Om vast te stellen wat de toegevoegde waarde van GM-CSF bij het gebruik van CpG monotherapie is, hebben we een 3-armige fase II studie uitgevoerd waarin 28 stadium I-III melanoompatiënten werden gerandomiseerd om intradermale injecties zoutoplossing of een lage dosis CpG-B (1 mg PF-3512676) rond de locatie van de excisie van de primaire tumor te ontvangen. CpG-B werd alleen of in combinatie met een lage dosis GM-CSF (100 μ g), 7 en 2 dagen voor de SLN procedure gegeven. SLN cellen en PBMC werden geanalyseerd door middel van flowcytometrie. Er werd aanzienlijk verhoogde maturatie van alle identificeerbare cDC en pDC subgroepen waargenomen in de SLN na gecombineerde toediening van CpG en GM-CSF, evenals de rekrutering van twee CD1a⁻CD11c^{hi} cDC subgroepen (een CD14⁻ en de ander CD14⁺). De laatste brachten beide BDCA3/CD141 tot expressie, wat duidt op een cross-primend vermogen. (31) Activering van de cDC, pDC en monocytten werd ook waargenomen in het perifere bloed. Correlatie en *in vitro* analyses toonden aan dat CpG-B en GM-CSF BDCA3/CD141⁺ cDC activeren en uit het bloed rekruteren naar de SLN. We concluderen dat gecombineerd CpG/GM-CSF toediening resulteert in een sterkere en bredere DC subgroep activering in SLN en bloed, dan welke wordt bereikt door CpG toediening alleen. De onderling afgestemde activering van pDC en cDC subgroepen, evenals de rekrutering van BDCA3/CD141⁺ cDC subgroepen met een vermeend cross-primend vermogen versterkt de beschermende anti-melanoom immuniteit.

In de meeste preklinische modellen, en in sommige klinische studies zijn CD8⁺ cytotoxische T-cellen erkend als de belangrijkste voorwaarden voor tumorregressie (32-36), de meeste immunomonitoringprogramma's richten zich dan ook op deze cellen. (37-39) Ondanks de recente vooruitgang, blijft nauwkeurig meten van vaccin specifieke en/of tumor specifieke T-cel reacties moeilijk als gevolg van extreem lage frequenties van tumor specifieke T-cellen. (40-43) Dit maakt het noodzakelijk voorafgaand aan de functionele testen polyclonale expansies te verrichten. (44) Verschillende protocollen zijn beschikbaar voor polyclonale T-cel expansie, maar deze zijn niet vergelijkbaar als het gaat om de subgroep of differentiatie status van de geëxpandeerde T-cellen. In **Hoofdstuk 8** hebben we gekeken naar een nieuwe op 4-1BBL antigeen presenterende cellen (aAPC) gebaseerde methode (45-47) en deze vergeleken met de klassieke op CD3/CD28 antilichaam gebaseerde methoden (48, 49) voor de expansie van de functionele MAA-specifieke CD8⁺ effector-T-cellen uit SLN.

Het ging om lymfkliercellen van vroeg stadium melanoompatiënten die deelnamen aan onze klinische fase II studie, waarbij ze intradermale lage dosis CpG-B ODN PF-3512676 (zie hoofdstuk 7) of zoutoplossing ontvingen. T-cellen van SLN monsters werden geëxpandeerd met behulp van plaatgebonden anti-CD3/CD28 antilichamen, anti-CD3/CD28 gecoate beads (beide gecombineerd met IL-2) of K32/4-1BB aAPC. Dit zijn bestraalde K562 cellen die zijn getransfecteerd met het humane Fcγ-receptor CD32 (geladen met anti-CD3 OKT3 monoclaal antilichaam) en het co-stimulatoire molecuul 4-1BBL (gecombineerd met IL-15). Geëxpandeerde T-cellen werden geanalyseerd op de aanwezigheid van memory/effector CD8⁺ subgroepen en daarnaast op het herkennen van en reageren op, bekende antigenen- of MAA-afgeleide epitopen met behulp van verschillende onderzoeken. Onze gegevens tonen aan dat K32/4-1BB aAPC veel beter zijn dan plaat- en bead-gebonden anti-CD3/CD28 antilichamen in het expanderen van functionele effector-memory CD8⁺ T-cellen uit immuun gemoduleerde SLN. Dit werd aangetoond door gecombineerde analyse van tetrameer binding, IFNα/CD107a-oppervlakte expressie en cytokine productie. Wij concluderen dat 4-1BB-gemedieerde expansie van de *in vivo* geprimeerde effector-memory CD8⁺ T cellen door middel van aAPC de gevoelige monitoring van functionele anti-tumor immuniteit vergemakkelijkt, met name in kleine monsters verkregen van tumor-drainerende LN.

References

1. Dranoff,G. Targets of protective tumor immunity, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1174: 74-80, 2009.
2. Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B. and Palucka,K. Immunobiology of dendritic cells, *Annu.Rev.Immunol.*, 18: 767-811, 2000.
3. Molenkamp,B.G., van Leeuwen,P.A., van den Eertwegh,A.J., Sluijter,B.J., Scheper,R.J., Meijer,S. and de Gruijl,T.D. Immunomodulation of the melanoma sentinel lymph node: a novel adjuvant therapeutic option, *Immunobiology*, 211: 651-661, 2006.
4. Cochran,A.J., Huang,R.R., Lee,J., Itakura,E., Leong,S.P. and Essner,R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes, *Nat.Rev.Immunol.*, 6: 659-670, 2006.
5. Rabinovich,G.A., Gabrilovich,D. and Sotomayor,E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells, *Annu.Rev.Immunol.*, 25: 267-296, 2007.
6. Somach,S.C., Taira,J.W., Pitha,J.V. and Everett,M.A. Pigmented lesions in actinically damaged skin. Histopathologic comparison of biopsy and excisional specimens, *Arch.Dermatol.*, 132: 1297-1302, 1996.
7. Lorusso,G.D., Sarma,D.P. and Sarwar,S.F. Punch biopsies of melanoma: A diagnostic peril, *Dermatol.Online.J.*, 11: 7, 2005.
8. Karimipour,D.J., Schwartz,J.L., Wang,T.S., Bichakjian,C.K., Orringer,J.S., King,A.L., Huang,C.C. and Johnson,T.M. Microstaging accuracy after subtotal incisional biopsy of cutaneous melanoma, *J.Am.Acad.Dermatol.*, 52: 798-802, 2005.
9. de Vries,E. and Coebergh,J.W. Cutaneous malignant melanoma in Europe, *Eur.J Cancer*, 40: 2355-2366, 2004.
10. MacKie,R.M., Bray,C.A., Hole,D.J., Morris,A., Nicolson,M., Evans,A., Doherty,V. and Vestey,J. Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: an epidemiological study, *Lancet*, 360: 587-591, 2002.
11. Romero,P., Dunbar,P.R., Valmori,D., Pittet,M., Ogg,G.S., Rimoldi,D., Chen,J.L., Lienard,D., Cerottini,J.C. and Cerundolo,V. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen- experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes, *J.Exp.Med.*, 188: 1641-1650, 1998.
12. Haanen,J.B., Baars,A., Gomez,R., Weder,P., Smits,M., de Gruijl,T.D., von Blumberg,B.M., Bloemena,E., Scheper,R.J., van Ham,S.M., Pinedo,H.M. and van den Eertwegh,A.J. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients, *Cancer Immunol.Immunother.*, 55: 451-458, 2006.
13. Taylor,R.C., Patel,A., Panageas,K.S., Busam,K.J. and Brady,M.S. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma, *J.Clin.Oncol.*, 25: 869-875, 2007.
14. Ladanyi,A., Somlai,B., Gilde,K., Fejos,Z., Gaudi,I. and Timar,J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma, *Clin.Cancer Res.*, 10: 521-530, 2004.
15. Clemente,C.G., Mihm,M.C., Jr., Bufalino,R., Zurrida,S., Collini,P. and Cascinelli,N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma, *Cancer*, 77: 1303-1310, 1996.
16. Bevan,M.J. Helping the CD8(+) T-cell response, *Nat.Rev.Immunol.*, 4: 595-602, 2004.
17. Behrens,G., Li,M., Smith,C.M., Belz,G.T., Mintern,J., Carbone,F.R. and Heath,W.R. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity, *Immunol.Cell Biol.*, 82: 84-90, 2004.
18. Ferrone,S. and Marincola,F.M. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance, *Immunol.Today*, 16: 487-494, 1995.
19. Rees,R.C. and Mian,S. Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses, *Cancer Immunol.Immunother.*, 48: 374-381, 1999.
20. Waller,E.K. The role of sargramostim (rhGM-CSF) as immunotherapy, *Oncologist.*, 12 Suppl 2: 22-26, 2007.
21. Dranoff,G. GM-CSF-secreting melanoma vaccines, *Oncogene*, 22: 3188-3192, 2003.
22. Sun,X., Hodge,L.M., Jones,H.P., Tabor,L. and Simecka,J.W. Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination, *Vaccine*, 20: 1466-1474, 2002.
23. Kass,E., Panicali,D.L., Mazzara,G., Schlom,J. and Greiner,J.W. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant, *Cancer Res.*, 61: 206-214, 2001.
24. Krieg,A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, *Annu.Rev.Immunol.*, 20: 709-760, 2002.
25. Krieg,A.M. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer, *Oncogene*, 27: 161-167, 2008.
26. Jakob,T., Walker,P.S., Krieg,A.M., Udey,M.C. and Vogel,J.C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA, *J.Immunol.*, 161: 3042-3049, 1998.
27. Warren,T.L., Bhatia,S.K., Acosta,A.M., Dahle,C.E., Ratliff,T.L., Krieg,A.M. and Weiner,G.J. APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells, *J.Immunol.*, 165: 6244-6251, 2000.
28. Vuylsteke,R.J.C.L.M., Molenkamp,B.G., Gietema,H.A., van Leeuwen,P.A.M., Wijnands,P.G.J.T.B., Vos,W., van Diest,P.J., Scheper,R.J., Meijer,S. and de Gruijl,T.D. Local Administration of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Increases the Number and Activation State of Dendritic Cells in the Sentinel Lymph Node of Early-Stage Melanoma, *Cancer Res.*, 64: 8456-8460, 2004.
29. Vuylsteke,R.J., Molenkamp,B.G., van Leeuwen,P.A., Meijer,S., Wijnands,P.G., Haanen,J.B., Scheper,R.J. and de Gruijl,T.D. Tumor-Specific CD8+ T Cell Reactivity in the Sentinel Lymph Node of GM-CSF-Treated Stage I Melanoma Patients is Associated with High Myeloid Dendritic Cell Content, *Clin.Cancer Res.*, 12: 2826-2833, 2006.

30. Molenkamp,B.G., van Leeuwen,P.A., Meijer,S., Sluijter,B.J., Wijnands,P.G., Baars,A., van den Eertwegh,A.J., Scheper,R.J. and de Gruijl,T.D. Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients, *Clin.Cancer Res.*, 13: 2961-2969, 2007.
31. Bachem,A., Guttler,S., Hartung,E., Ebstein,F., Schaefer,M., Tannert,A., Salama,A., Movassaghi,K., Opitz,C., Mages,H.W., Henn,V., Kloetzel,P.M., Gurka,S. and Kroczeck,R.A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells, *J.Exp.Med.*, 207: 1273-1281, 2010.
32. Dudley,M.E., Wunderlich,J.R., Robbins,P.F., Yang,J.C., Hwu,P., Schwartzentruber,D.J., Topalian,S.L., Sherry,R., Restifo,N.P., Hubicki,A.M., Robinson,M.R., Raffeld,M., Duray,P., Seipp,C.A., Rogers-Freezer,L., Morton,K.E., Mavroukakis,S.A., White,D.E. and Rosenberg,S.A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, *Science*, 298: 850-854, 2002.
33. Yee,C., Thompson,J.A., Byrd,D., Riddell,S.R., Roche,P., Celis,E. and Greenberg,P.D. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 16168-16173, 2002.
34. Greenberg,P.D. Therapy of murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-2+ cells: cytolytic T cells can mediate eradication of disseminated leukemia, *J.Immunol.*, 136: 1917-1922, 1986.
35. Surman,D.R., Dudley,M.E., Overwijk,W.W. and Restifo,N.P. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen, *J.Immunol.*, 164: 562-565, 2000.
36. Hwang,L.N., Yu,Z., Palmer,D.C. and Restifo,N.P. The in vivo expansion rate of properly stimulated transferred CD8+ T cells exceeds that of an aggressively growing mouse tumor, *Cancer Res.*, 66: 1132-1138, 2006.
37. Romero,P., Cerottini,J.C. and Speiser,D.E. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination, *Cancer Immunol.Immunother.*, 53: 249-255, 2004.
38. Scheibenbogen,C., Letsch,A., Schmittel,A., Asemissen,A.M., Thiel,E. and Keilholz,U. Rational peptide-based tumour vaccine development and T cell monitoring, *Semin.Cancer Biol.*, 13: 423-429, 2003.
39. Speiser,D.E., Pittet,M.J., Rimoldi,D., Guillaume,P., Luescher,I.F., Lienard,D., Lejeune,F., Cerottini,J.C. and Romero,P. Evaluation of melanoma vaccines with molecularly defined antigens by ex vivo monitoring of tumor-specific T cells, *Semin.Cancer Biol.*, 13: 461-472, 2003.
40. De Vries,I., Bernsen,M.R., Lesterhuis,W.J., Scharenborg,N.M., Strijk,S.P., Gerritsen,M.J., Ruiter,D.J., Figdor,C.G., Punt,C.J. and Adema,G.J. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome, *J.Clin.Oncol.*, 23: 5779-5787, 2005.
41. Lesterhuis,W.J., De,V., I, Schuurhuis,D.H., Boullart,A.C., Jacobs,J.F., de Boer,A.J., Scharenborg,N.M., Brouwer,H.M., van de Rakt,M.W., Figdor,C.G., Ruers,T.J., Adema,G.J. and Punt,C.J. Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests, *Ann.Oncol.*, 17: 974-980, 2006.
42. Yamshchikov,G.V., Barnd,D.L., Eastham,S., Galavotti,H., Patterson,J.W., Deacon,D.H., Teates,D., Neese,P., Grosh,W.W., Petroni,G., Engelhard,V.H. and Slingluff,C.L., Jr. Evaluation of peptide vaccine immunogenicity in draining lymph nodes and peripheral blood of melanoma patients, *Int.J.Cancer*, 92: 703-711, 2001.
43. Vuylsteke,R.J., van Leeuwen,P.A., Meijer,S., Wijnands,P.G., Statius Muller,M.G., Busch,D.H., Scheper,R.J. and de Gruijl,T.D. Sampling tumor-draining lymph nodes for phenotypic and functional analysis of dendritic cells and T cells, *Am.J.Pathol.*, 161: 19-26, 2002.
44. Britten,C.M., Gouttefangeas,C., Welters,M.J., Pawelec,G., Koch,S., Ottensmeier,C., Mander,A., Walter,S., Paschen,A., Muller-Berghaus,J., Haas,I., Mackensen,A., Kollgaard,T., thor,S.P., Schmitt,M., Giannopoulos,K., Maier,R., Veelken,H., Bertinetti,C., Konur,A., Huber,C., Stevanovic,S., Wolfel,T. and van der Burg,S.H. The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays, *Cancer Immunol.Immunother.*, 57: 289-302, 2008.
45. Greenwald,R.J., Freeman,G.J. and Sharpe,A.H. The B7 family revisited, *Annu.Rev.Immunol.*, 23: 515-548, 2005.
46. Maus,M.V., Thomas,A.K., Leonard,D.G., Allman,D., Addya,K., Schlienger,K., Riley,J.L. and June,C.H. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB, *Nat.Biotechnol.*, 20: 143-148, 2002.
47. Bukczynski,J., Wen,T., Ellefsen,K., Gaudie,J. and Watts,T.H. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101: 1291-1296, 2004. *vestig. Drugs*, 11: 699-706, 2010.
48. Maus,M.V., Thomas,A.K., Leonard,D.G., Allman,D., Addya,K., Schlienger,K., Riley,J.L. and June,C.H. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB, *Nat.Biotechnol.*, 20: 143-148, 2002.
49. Zhang,H., Snyder,K.M., Suhoski,M.M., Maus,M.V., Kapoor,V., June,C.H. and Mackall,C.L. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy, *J.Immunol.*, 179: 4910-4918, 2007.