

Inmunoterapia en melanoma

A. Torrella, E. Noris-García

Resumen

La cirugía temprana es el único método con efectividad clínica demostrada en el tratamiento del melanoma maligno. La capacidad del melanoma para generar una respuesta inmunitaria efectora, junto a su frecuente resistencia a la quimioterapia y radioterapia, conduce a la búsqueda de soluciones terapéuticas en la manipulación del sistema inmunitario. En la actualidad se ha producido un incremento logarítmico de ensayos clínicos de inmunoterapia en melanoma en sus diferentes variantes. Aunque muchos de estos agentes inmunoterapéuticos han mostrado su eficacia, todavía existen muchos aspectos por definir para lograr una estrategia terapéutica verdaderamente efectiva e inocua.

Palabras claves:

Inmunoterapia. Inmunoterapia activa. Inmunoterapia pasiva. Melanoma.

Oncología, 2004; 27 (3):102-107

Summary

Early surgery is the only method with demonstrated clinical effectiveness in the malignant melanoma treatment. The melanoma capacity to develop an effective immune response and its frequent resistance to chemotherapy and radiotherapy, lead to look for a therapeutic solution involving the immune system. Currently a logarithmic increment of immunotherapy clinical trials in melanoma has been produced in its different modalities. Although many of these immunotherapeutic agents have shown its efficacy, there are a lot of aspects to define for obtain a true effective and safe therapeutic strategy.

Key words: Immunotherapy. Active immunotherapy. Pasive immunotherapy. Melanoma.

Introducción

En las últimas décadas, el melanoma ha mostrado un incremento alarmante tanto en la incidencia como en la mortalidad en varias regiones del mundo. Esta localización tumoral constituye un serio problema de salud no sólo porque se duplica su incidencia cada 6 ó 10 años, sino que además se diagnostica fundamentalmente en el adulto joven o en las edades más productivas de la vida¹.

La progresión del melanoma se ve afectada por dos factores: los intrínsecos del potencial maligno del tumor (clínicos, histológicos, localización anatómica de la lesión) y la respuesta inmune del hospedero². En estadios tempranos, esta enfermedad puede curar con una intervención quirúrgica, sin embargo esta solución sólo puede ser paliativa en el estadio metastásico. Hasta el momento, no existe ninguna terapia adyuvante capaz de evitar las recidivas, sobre todo en los pacientes que presentan factores de mal pronóstico, como tampoco ningún tratamiento es eficaz cuando el melanoma se encuentra en estadio avanzado³. La capacidad del melanoma para generar una respuesta inmunitaria efectora, junto a su frecuente resistencia a la quimioterapia y radioterapia, conduce a la búsqueda de soluciones terapéuticas en la manipulación del sistema inmunitario.

Melanoma y sistema inmune

A pesar de que la respuesta inmune usualmente falla en la prevención del desarrollo del tumor^{4, 5}, existen evidencias clínico patológicas del carácter inmunogénico del melanoma y de la relevancia de la inmunidad mediada por células en este tumor⁶:

1. Una elevada incidencia de melanoma en pacientes con déficit de la inmunidad celular.

2. El común hallazgo de la regresión de las lesiones primarias.
3. La presencia de un infiltrado de células T en las lesiones primarias, que es atenuado en las lesiones metastásicas.
4. La existencia de linfocitos T citotóxicos melanoma específico circulantes.
5. La pequeña pero reproducible incidencia de regresión tanto espontánea como después del tratamiento con citocinas tales como IL-2.
6. La relación entre la respuesta a la terapia del tumor y el vitiligo en pacientes con melanoma maligno.

Con relación a la respuesta inmune humoral se han obtenido evidencias de que los anticuerpos del suero son capaces de inducir regresión de los tumores, ya sea por ser citotóxicos o por reaccionar ante antígenos circulantes. Los anticuerpos con potencial antitumoral pueden unirse directamente a las células tumorales o a los antígenos circulantes derivados de ellas. Los anticuerpos juegan un papel importante en la restauración de la inmunocompetencia debido a lo cual los títulos han sido correlacionados con el curso clínico de los pacientes con melanoma⁷.

Inmunoterapia

En la actualidad, se ha producido un incremento logarítmico de ensayos clínicos de inmunoterapia en melanoma. El objetivo fundamental que persigue la inmunoterapia es superar los mecanismos de escape, restituir la disponibilidad de los antígenos a los linfocitos T citotóxicos y células presentadoras de antígeno y restaurar la función de estas células y los linfocitos T⁸.

En los últimos años se han desarrollado diferentes clasificaciones de inmunoterapia en el tratamiento del cáncer⁹:

Inmunoterapia pasiva

Inespecífica: Transferencia de células mononucleares activadas con citocinas (células LAK)

Específica: Anticuerpos monoclonales

Transferencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL)

Inmunoterapia activa

Inespecífica: Inducción de respuesta inmune de manera inespecífica. Ej: BCG, IFN, IL-2.

Específica: Inducción de respuesta inmune contra uno o más antígenos tumor específicos (Vacunas).

En melanoma se han estudiado prácticamente todos los agentes inmunoterapéuticos conocidos, y en la actualidad existen áreas de investigación activa en los siguientes campos¹⁰:

Transferencia de células preestimuladas in vitro con antígenos tumorales y citocinas.

Anticuerpos monoclonales

Citocinas recombinantes (solas o en combinación con otros agentes) Hormonas tiroideas

Terapia génica

Vacunas

Transferencia de células preestimuladas in vitro con antígenos tumorales y citocinas

Aunque existen diferentes tipos de células inmunes que pueden ser consideradas para su uso en este tipo de inmunoterapia, los linfocitos autólogos infiltrantes de tumor han sido el foco de la mayoría de las investigaciones clínicas. La eficacia clínica de los linfocitos infiltrantes de tumor en melanoma todavía está siendo investigada. Estudios clínicos recientes muestran una inducción exitosa de lisis del tumor en pacientes con estadio IV de melanoma, pero no ha sido demostrado un aumento en la supervivencia de los pacientes^{11, 12}.

Anticuerpos monoclonales

La inmunoterapia pasiva implica, como se menciona anteriormente, la administración de anticuerpos monoclonales capaces de mediar citotoxicidad. Los anticuerpos monoclonales tienen dos formas fundamentales de aplicación: (1) inyección de anticuerpos monoclonales humanos directamente en el tumor, o sea, administración intralésión; o (2) administración sistémica de anticuerpos murinos o quiméricos¹³.

Los anticuerpos monoclonales humanos solamente son utilizados en la variante local porque actualmente su producción en cantidades suficientes para la administración sistémica resulta muy costosa. La inyección intra-

lesión de anticuerpos monoclonales anti-gangliósidos en pacientes con melanoma cutáneo produjo regresión de los tumores que presentaban alta expresión de los antígenos sin que se observaran efectos secundarios¹⁴.

En cambio, la administración sistémica de anticuerpos monoclonales murinos ha resultado fallida en la mayoría de los casos. Un ejemplo de esto es el anticuerpo monoclonal murino R(24) que reconoce a la molécula GD3 y se encuentra en fase IB, con una limitada respuesta clínica. Estos anticuerpos no pueden ser administrados por períodos de tiempo prolongados porque los pacientes desarrollan una fuerte respuesta inmune antimurina que causa hipersensibilidad contra proteínas extrañas. Como consecuencia, la regresión suele ser dramática pero temporal y comúnmente se produce recurrencia¹⁵.

Con el objetivo de disminuir la respuesta inmune antimurina se han desarrollado anticuerpos monoclonales quiméricos.

El KM871 es un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce al gangliósido GD3 que está altamente expresado en las células de melanomas. Este anticuerpo se encuentra actualmente en un ensayo clínico fase I con resultados alentadores y poca toxicidad¹⁶.

Otra causa del fallo en la inmunoterapia pasiva puede estar relacionada con la heterogeneidad antigénica entre células tumorales en un mismo individuo.

Actualmente se combinan los anticuerpos monoclonales, en bajas dosis, con quimioterapia o radioterapia resultando potenciadores de estos tratamientos. También se están ensayando toxinas de origen animal o vegetal, fármacos antineoplásicos o isótopos radioactivos asociados a anticuerpos monoclonales, bien directamente o en forma de liposomas; estos inmunocombinados pueden concentrar el agente citotóxico selectivamente sobre las células tumorales¹⁷.

Para lograr el efecto terapéutico deseado en los pacientes con cáncer deben ser mejores alternativas el uso de combinaciones de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes antígenos o la estimulación del sistema inmune de los pacientes para crear sus propios anticuerpos específicos contra los antígenos presentes sobre las células tumorales, nos referimos al uso de anticuerpos monoclonales anti-idiotipo, como modalidad de inmunoterapia activa¹⁸. Entre los anticuerpos anti-idiotípicos que han demostrado potencialidad terapéutica y han sido llevados a ensayo clínico están los anticuerpos contra gangliósidos. Entre ellos, se destacan el BEC2 y el TriGem.

El BEC2 es capaz de inducir la producción de anticuerpos anti-GD3 en algunos pacientes, así como un aumento de la supervivencia y del tiempo de reaparición de la enfermedad o recaída^{19, 20}.

El TriGem es un AcM anti-idiotipo que asemeja a la molécula GD2. Los resultados obtenidos en un ensayo clínico fase II, sugieren que este anticuerpo tiene actividad clínica y es capaz de generar una respuesta antitumoral robusta²¹.

Citocinas

Las citocinas deben ser administradas sistemáticamente en grandes cantidades para que puedan alcanzar, a nivel del entorno celular local, las concentraciones adecuadas que le permitan llevar a cabo su acción efectora. Estas dosis tan elevadas producen efectos tóxicos y marcan los límites de su utilización terapéutica²².

Gracias a la ingeniería genética se dispone de la mayoría de las citocinas en forma recombinante, lo que ha facilitado en gran medida su utilización terapéutica, por dos motivos principales, su disponibilidad en forma pura y la posibilidad de fabricarla en cantidades ilimitadas¹⁰.

Las únicas citocinas que han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma han sido el interferón alfa y la interleucina 2²³.

El tratamiento del melanoma metastásico con dosis altas de INF2a y 2b, ha producido en los ensayos clínicos en fase I y II un 6% de respuestas completas y un 10% de respuestas parciales. La duración de las respuestas parciales fue de unos 4 meses, mientras que algunas respuestas completas se ha mantenido durante 5 años²⁴.

El rol del INF2b como terapia adyuvante de pacientes con melanoma localizado y alto riesgo de recaída ha sido bien establecido por el resultado de tres ensayos clínicos randomizados conducidos por el Intergrupo de los E.U. Estos ensayos demostraron mejoría en la supervivencia y en el tiempo libre de enfermedad²⁵.

La terapia con IL-2 a altas dosis, ha logrado entre un 15-20% de respuesta en melanoma metastásico y es capaz de producir una remisión completa y de larga duración en el 6% de los pacientes tratados. La duración media de la respuesta es de 9 meses^{26, 27}. Uno de los grupos que más se ha destacado en estos ensayos, es el de Rosenberg. Este grupo publicó los resultados del seguimiento de 182 pacientes de melanoma metastásico, 10 de ellos presentaron respuestas completas de larga duración que se prolongaron desde los 70 hasta los 148 meses, desde el comienzo del tratamiento²⁸.

Los principales efectos secundarios de la terapia con INF e IL-2 son: mielosupresión (64% de neutropenia febril y 48% de bacteriemia), náuseas, vómitos, anorexia, retención de fluidos e hipotensión²⁹.

Debido a estas razones, en la actualidad se evalúan drogas que disminuyan los efectos tóxicos de estas citocinas sin afectar sus efectos terapéuticos y que permitan utilizar dosis incluso superiores a las máximas establecidas. Un ensayo clínico fase III aleatorizado que compara la utilización de IL-2 sola con IL-2 más histamina en enfermos de melanoma en estadio IV, ha demostrado un aumento en la supervivencia en los pacientes, pero con afectación hepática³⁰.

Otra variante ha sido la bioquimioterapia, que no es más que combinar esquemas tradicionales de quimioterapia con dosis altas de IL-2 intravenosa o dosis más bajas de IL-2 combinada con IFN subcutáneo, obteniéndose así mejores resultados, pero con elevada toxicidad y alto costo. En su conjunto, estos regímenes terapéuticos dan un 48% de respuestas (12% de completas y 36% de parciales), con una media de supervivencia de 11 meses y una media de la duración de 6 meses. El aspecto más interesante de este tratamiento, es que un 10% de los pacientes presentan respuestas completas y duraderas. El aspecto negativo es que es impracticable por varios motivos: por una parte requiere la hospitalización del paciente durante largos períodos de tiempo en unidades de cuidados intensivos, debido a su muy elevada toxicidad; por otra parte son tratamientos extremadamente costosos³¹.

Por estos motivos, varios grupos han intentado aumentar la practicabilidad y tolerabilidad de la bioquimioterapia, administrando de forma concurrente la poliquimioterapia, seguida de la IL-2 y del IFN-2. La bioquimioterapia concurrente, ha proporcionado alrededor de un 55% de respuestas (un 18% completas y un 37% parciales), con una media de supervivencia de 11 meses y una duración media de unos 6 meses³².

Terapia génica

La respuesta antitumoral del sistema inmune del huésped puede ser mejorada mediante la introducción de genes en los efectores de la inmunidad celular o en las células tumorales.

Actualmente existen 17 ensayos clínicos en fase I-II en pacientes con melanoma metastásico, de ellos 16 usan genes de citocinas. Estos estudios son muy heterogéneos en cuanto a su metodología y presentan una tolerancia aceptable, observándose una respuesta de remisión completa en el 8% de los pacientes³³.

Hormonas tiroideas

Los ensayos clínicos con hormonas y factores tiroideos en cáncer, inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes, han revelado su efecto inmunomodulador. Es

tos factores no solo, potencian la acción de las citocinas y de las drogas utilizadas en los tratamientos quimioterapéuticos, sino que reducen la toxicidad hematológica asociada a estos tratamientos^{34, 35}.

La Timosina I es una de las hormonas tímicas que más se han empleado en los ensayos clínicos en pacientes con melanoma. Actualmente esta hormona combinada con INF γ , se encuentra en ensayos clínicos fase III en los E.U y en ensayos clínicos fase I en Europa³⁶.

Vacunas antitumorales

A diferencia de las vacunas contra enfermedades infecciosas, que son administradas profilácticamente, las vacunas de cáncer son generalmente administradas después de la aparición de la enfermedad. Ambos tipos de vacunas utilizan células completas atenuadas, paredes celulares o antígenos específicos para estimular al sistema inmune del paciente a luchar contra la enfermedad³⁷.

Todas las variantes de vacunas terapéuticas descritas han sido evaluadas en ensayos clínicos en pacientes con melanoma. Aunque todavía están en fase experimental las vacunas han demostrado ser la estrategia inmunoterapéutica más efectiva con un mayor aumento de la supervivencia media de los pacientes (desde los 6-9 meses a los 23 meses), sin efectos tóxicos notables^{38, 39}. Entre las vacunas que han mostrado mayor efectividad están: Canvaxin, Melacine, GMK, M-Vax y la vacuna polivalente de antígenos parcialmente purificados de Bystryn, que actualmente se encuentran en ensayo clínico fase III⁴⁰⁻⁴⁴.

Conclusiones

Es muy difícil establecer comparaciones sobre la eficacia de las distintas estrategias inmunoterapéuticas debido entre otras razones, a su diferente modo de acción sobre el sistema inmune y a la diferente composición de los grupos de enfermos en cada estudio. Aunque muchos de estos agentes inmunoterapéuticos han mostrado su eficacia, todavía existen muchos aspectos por definir para lograr una estrategia terapéutica verdaderamente efectiva e inocua.

Correspondencia:
Dra. A. Torrella
INOR
29 y F, Plaza. Ciudad Habana
10400 Cuba
E-mail: atorella@infomed.sld.cu

Bibliografía

1. Lotze MT, Dallal RM, Kirkwood JM, Flickinger JC. Cutaneous Melanoma En: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven 2000; p.2012-56.
2. Phillips NC, Loufi A, A-Kareem AM, Shibata HR, Baines MG. Clinical evaluation of liposomal tumor antigen vaccines in patients with stage-III melanoma. *Cancer Detection and Prevention* 1990; 14: 491-96.
3. Lee JE. Factors associated with melanoma incidence and prognosis. *Seminars in Surgical Oncology* 1996; Vol. 12 : 379-85.
4. Leiping C. Immunological ignorance of silent antigen as an explanation of tumor evasion. *Immunology Today* 1998;19: 27-29.
5. Ferrone S, Fenestry J, Jaffie EM, Nobel G. How much longer will tumour cell fool the immune system? *Immunology Today* 2000;21 : 270-75
6. Curiel-Lewandrowski C, Demierre MF. Advances in specific immunotherapy of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43 : 167-85.
7. Difronzo LA, Gupta RK, Essner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Wanek LA, et al. Enhanced humoral immune response correlates with improved disease-free and overall survival in American Joint Committee on cancer stage II melanoma patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3242- 48.
8. Talmadge JE. Development of immunotherapeutic strategies for treatment of malignant neoplasms. *Biotherapy* 1992; 4: 215-236.
9. Calvo E, Brugarolas A. Inmunoterapia ¿una modalidad terapéutica eficaz en melanoma? *Rev. Oncología* 2001; 24: 13-16.
10. Vilella R, Benítez D, Milá J, Castel T. Inmunoterapia en el melanoma maligno diseminado. *Inmunología* 2001; 20 : 160-72.
11. Ridolfi R, Flamini E, Riccobon A, De Paola F, Maltoni R, Gardini R, et al. Adjuvant adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and modulated doses of interleukin-2 in 22 patients with melanoma, colorectal and renal cancer, after radical metastasectomy, and in 12 advanced patients. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 4: 619-27.
12. Rosenberg SA. Cellular therapy: an introduction. *Cancer J* 2001; 7 Suppl 2: S51-S52.
13. Atkins MB. Immunotherapy and experimental approaches for metastatic melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12: 877-902.
14. Irie RF, Morton DL. Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 8694-99.
15. Kirkwood JM, Mascari RA, Edington HD, Rabkin MS, Day RS, Whiteside TL, et al. Analysis of therapeutic and

- immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2000; 88: 2693-702.
16. Scott AM, Lee FT, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, et al. Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3976-87.
 17. Glushkov AN. New approaches to immunoprevention and immunotherapy of neoplasms. *Russ J Immunol* 2002; 7(3): 219-28.
 18. Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, Foon KA. The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2001; 3(1): 63-9.
 19. Yao TJ, Meyers M, Livingston PO, Houghton AN, Chapman PB. Immunization of melanoma patients with BEC2-keyhole limpet hemocyanin plus BCG intradermally followed by intravenous booster immunization with BEC2 to induced anti- GD3 ganglioside antibodies. *Clin Cancer Res* 1999; 1 : 77-81.
 20. Chapman PB. Vaccinating against GD3 ganglioside using BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4(6): 710-15.
 21. Razis E, Fountzilas G. Technology evaluation: TriGem, Titan. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5(2): 204-7.
 22. Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 2001; 250(6): 462-75.
 23. Guirguis LM, Yang JC, White DE, Steinberg SM, Liewehr DJ, Rosenberg SA, et al. Safety and efficacy of high-dose interleukin-2 therapy in patients with brain metastases. *J Immunother* 2002; 25(1): 82-87.
 24. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Songdak VK, Agarwala SA, Ernstoff MS, et al. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2370-74.
 25. Agarwalas S. Improving survival in patients with high - risk and metastatic melanoma : immunotherapy leads the way. *Am J clin Dermatol*,2003; 4: 333-46.
 26. Atkins MB, Kunkler L, Sznol M, Rosenberg SA. High dose aldesleukin therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 2000; 6: S11-S4.
 27. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher IR, Weiss G, Margolin K, et al. High dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma : analysis of 270 patients treated from 1985-1993. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2105-16.
 28. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 1998; 228: 307-19.
 29. Mitchel MS. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer. *Int Immunopharmacol*,2003; 3(8) : 1051-9.
 30. Hellstrand K, Hermodsson S, Naredi P, Mellqvist UH, Brune M. Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncológica* 1998 ; 37: 347-53.
 31. Keilholz U, Gore ME. Biochemotherapy for advanced melanoma. *Semin Oncol* 2002; 29(5): 456-61.
 32. Hakansson A, Hakansson L, Gustafsson B, Krysanter L, Rettrup B, Ruitter D, et al. On the effect of biochemotherapy in metastatic malignant melanoma: an immunopathological evaluation. *Melanoma Res.* 2003 Aug;13(4): 401-7.
 33. Pennel N, Bonnetterre J. Gene therapy of melanoma: review of publish clinical trial. *Rev Med Interne*.2003; 24: 443-51.
 34. Ben-Efraim S, Keisari Y, Ophir R, Pecht M, Trainin N, Burstein Y. Immunopotentiating and immunotherapeutic effects of thymic hormones and factors with special emphasis on thymic humoral factor THF-gamma2. *Crit Rev Immunol* 1999; 19(4): 261-84.
 35. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(4): 261-73.
 36. Billich A. Thymosin alpha1. *SciClone Pharmaceuticals.* *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3(5): 698-707.
 37. Dalglish AD. Cancer vaccines. *Br J Cancer* 2000; 82: 1619-24.
 38. Bystryjn JC. Vaccines for melanoma. *Dermatol Clin* 2002; 20(4): 717-25.
 39. Reicher JM, Paquette Ch. Therapeutic cancer vaccines on trial. *Nature Biotechnology* 2002; 20: 659-63.
 40. Morton DL, Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Bilchik A, et al. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann Surg* 2002; 236(4): 438-48.
 41. Mitchell MS, Rechtman DJ, Von Eschen KB. A randomized phase III trial of melacine versus combination chemotherapy in patients with disseminated melanoma. *Can J Infect Dis* 1995; 6: (Suppl C): 347C-351C.
 42. Livingston PO. Gangliosides vaccines with emphasis on GM2. *Seminars in Oncology* 1998; 25: 636-43.
 43. Berd D. M-Vax: an autologous, hapten-modified vaccine for human cancer. *M Expert Opin Biol Ther* 2002; 2(3): 335-42.
 44. Reynolds SR, Zeleniuch- Jacquote A, Shapiro RL, Roses DF, Harris MN, Johnston D, Bystryjn JC. Vaccine induced CD8+ T cell response to MAGE 3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 657-62.