

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische und immunologische Effektivität
einer Phase-II-Vakzinierungs-Studie
mit Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 (WT1)
und GM-CSF und KLH als Adjuvantien
zur Behandlung von
Patienten mit WT1-exprimierenden soliden Tumoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Kaja Alogna, geb. Lukas

aus Berlin

Datum der Promotion: 18. September 2020

Für U.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungen.....	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Zusammenfassung.....	11
2 Abstract	13
3 Einleitung.....	15
3.1 Tumor-Immunologie	15
3.1.1 Immunsystem und Tumorentstehung.....	15
3.1.2 Cancer Immunoediting: Die drei E´s: Elimination, Equilibrium, Escape	18
3.1.3 Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem.....	18
3.1.4 Regulatorische Zellelemente und Oberflächenproteine und ihre Rolle in der Tumorentstehung und der Hemmung der Immunantwort.....	19
3.1.5 Rolle der T-Zellen: Klassifikationen und T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene	21
3.2 Tumor-Antigene als Zielstruktur für Immuntherapien und Prädiktoren für das Therapieansprechen.....	22
3.2.1 Tumor-Antigene Subgruppen (Klassifikation)	24
3.3 Targeted Therapy: Gezielte Krebstherapie	26
3.3.1 Entstehung und Fortschritte.....	26
3.3.2 Krebsimmuntherapie.....	27
3.3.3 Peptid-basierte Tumor-Vakzinierung	30
3.4 WT1 als therapeutisches Ziel	31
3.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	32
4 Material und Methoden	33
4.1 Studiendesign und Studienpopulation	33
4.1.1 Patienten-Charakteristika, Ein- und Ausschlusskriterien	33

4.1.2	Studienprotokoll.....	33
4.1.3	Beurteilung des Behandlungserfolges.....	34
4.2	Probenaufarbeitung.....	35
4.2.1	Extraktion von MNCs aus Heparin-Vollblut.....	35
4.3	FACS-Analyse (fluorescence activated cellscanning) / Durchflusszytometrie.....	36
4.3.1	Reagenzien, Positiv- und Negativkontrolle.....	36
4.3.2	FACS-Antikörper.....	37
4.3.3	Panel 1.....	38
4.3.4	Panel 2-3.....	39
4.3.5	WT1-Panel.....	39
4.3.6	Messung und Daten-Analyse.....	40
4.4	Statistische Methoden.....	41
5	Ergebnisse.....	42
5.1	Klinische Daten.....	42
5.1.1	Patienten-Charakteristika.....	42
5.1.2	Impfprotokoll und Toxizität.....	43
5.1.3	Assoziation zwischen Immunologischen Analysen und klinischen Verläufen.....	43
5.2	Immunologischer Status nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptidmix.....	49
5.2.1	Analyse der T-Zell-Antwort nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid.....	49
5.2.2	Frequenzen WT1-spezifischer zytokinproduzierender CD8 ⁺ T-Zellen.....	51
5.2.3	Analyse des Aktivierungsmarkers CD137 auf CD4 ⁺ T-Zellen und CD4 T-Zellen (Panel 2):.....	54
5.2.4	Analyse der T _{reg} -Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2).....	56
5.2.5	Analyse der CD4 ⁺ CD279 ⁻ (PD1-)Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2).....	57
5.2.6	Analyse der CD4 ⁺ CD274 ⁺ (PD-L1)T-Zell-Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2).....	59
5.2.7	Analyse der CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR-/ _{low} MDSCs im PB nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 3).....	61
5.2.8	Resistenzmechanismen als limitierende Faktoren von Immuntherapien.....	62
6	Diskussion.....	64

6.1	Klinische Verläufe der Patienten	64
6.1.1	Klinische Verläufe der Patienten in Bezug auf immunologische Analysen	65
6.2	Immunologischer Status der Patienten nach Vakzinierung	66
6.3	Schlussfolgerung.....	71
7	Literaturverzeichnis.....	73
8	Eidesstattliche Versicherung.....	80
9	Lebenslauf.....	81
10	Danksagung.....	84

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

APZ	Antigenpräsentierende Zelle (engl: antigen presenting cell)
BSA	Rinder-Serum Albumin (engl: bovine serum albumin)
BRCA 1/2	Breast cancer Antigen 1/2
CAFS	Krebszellen assoziierte Fibroblasten
CAR-T-Zellen	chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD	Differenzierungscluster (engl: Cluster of differentiation)
CDK	Cyclin-dependent kinase
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	Complete response
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl: cytotoxic T-cell)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: desoxyribonucleic acid)
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamid-tetra-acid
et al.	<i>et alii</i> (Latein: « und Mitarbeiter »)
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FSC	Forward-Scatter
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPV	Humanes Papillom Virus
ICC	Intrazelluläre Zytokinfärbung (engl: intracellular cytokine staining)
IE	Internationale Einheit

IFN	Interferon
IL	Interleukin
MAGE	Melanoma Antigen
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
ml	Milliliter
MHC	Major-histocompatibility-complex
MNC	Mononukleäre Zellen
MRD	Minimal residual disease
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NGS	Next generation sequencing
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (engl: natural killer cell)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl: polymerase chain reaction)
PD	Progressive disease
PD-1	Programmed death-1
PD-L1	Programmed death ligand-1
PNC	Peptid-Nanoclusters
PR	Partial response
RDA	repräsentativen Differenz-Analyse
RECIST	Response-Evaluation-Criteria-In-Solid-Tumors
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SSC	Side scatter
SD	Stable disease
SEREX	Serological screening of cDNA expression libraries
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl: T-cell receptor)
TH1	CD4+ T helper cell, producing type-1 cytokines

TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TMB	Tumor mutational burden
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT1	Wilms-Tumor-Protein-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Tumor Mikromilieu (TME): Komponenten und in-vivo-Darstellung des TME.....	17
Abbildung 2: Immuntherapieansätze und mögliche Kombinationstherapien	30
Abbildung 3: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der CD8+WT1-spezifischen T-Zellen; I)Lymphozyten gate. II)CD3+/CD8+, III)CD8+/WT1+, a)Baseline, b)Zeitpunkt 1, c)Zeitpunkt 2	40
Abbildung 4: Progressionsfreies Überleben in Tagen; Patienten aufsteigend geordnet nach Eintritt in die Studie.....	44
Abbildung 5: WT1-Tetramer-Verlauf des Patienten H.K. BL = Baseline, ZP = Zeitpunkt	46
Abbildung 6: CT-Thorax des Patienten 1. Links: vor der WT1-Vakzinierung; rechts: Therapieansprechen nach 6 Impfungen	47
Abbildung 7: WT1-Tetramer-Analyse in Prozent (%) zu Baseline, Zeitpunkt 1 und 2	50
Abbildung 8: Tetrameranalyse im peripheren Blut.....	50
Abbildung 9: Mittelwerte der intrazellulären Freisetzung von TNF α nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3+CD8+T-Zellen zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2; HIV = Negativkontrolle.....	51
Abbildung 10: Prozentualer Anteil der intrazellulären Freisetzung von IL-2 nach WT1- Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3+CD8+T-Zellen zu drei Zeitpunkten: Baseline, Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. * = Behandlungsende	52
Abbildung 11: Mittelwerte der intrazellulären Freisetzung von INF γ nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3+CD8+T-Zellen zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. HIV = Negativkontrolle.....	53
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der CD4+CD137+T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+T-Zell- Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 1,31 \pm 1,12%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 1,25 \pm 0,58%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 1,54 \pm 0,93%) * = Behandlungsende	55
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der CD4-CD137+T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+T-Zell- Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 2,28 \pm 2,19%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 2,04 \pm 1,40%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 2,22 \pm 2,06%). * = Behandlungsende	56
Abbildung 14: Prozentualer Anteil der CD4+CD25+CD127-T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+T-Zell- Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 5,46%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 6,09%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 6,51%). * = Behandlungsende.....	57
Abbildung 15: Prozentualer Anteil der CD4+CD279+T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+T-Zell- Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 3,99%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 4,18%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 4,25%). * = Behandlungsende	58
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der CD4+CD274+T-Zellen innerhalb der CD3+CD4+T-Zell- Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 1,13%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 1,13%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 1,30%). * = Behandlungsende.....	60
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der CD11b+CD14+HLA-DR-/low MDSCs der CD14+Zellen im PB zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 8,33%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 13,25%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 11,41%). * = Behandlungsende	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vakzinierungsbestandteile	34
Tabelle 2: RECIST-Kriterien (Version 1.1) (92).....	35
Tabelle 3: Panel 1. CD3+, CD4+, CD8+ und Zytokine.....	37
Tabelle 4: Panel 2. Tregs, PD-L1, PD-1, TNFRSF9	38
Tabelle 5: Panel 3. MDSCs.....	38
Tabelle 6: Panel 4. WT1-Peptid-Mix.....	38
Tabelle 7: Patienten-Charakteristika.....	42
Tabelle 9: Übersicht möglicher Resistenzmechanismen während WT1-Vakzinierung zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2	63

1 Zusammenfassung

Einleitung: Die Balance zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen stellt einen entscheidenden Faktor bei der normalen Gewebsentwicklung dar. Gerät diese Balance jedoch ins Wanken, begünstigt dies die Tumorgenese. Eine zentrale Rolle in der modernen Krebsforschung spielt die Erkennung spezifischer Targets zur Verhinderung und Behandlung von Krebserkrankungen sowie die Individualisierung und Präzisierung der Krebstherapie. Das Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1) wird in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen und einer Reihe von soliden Tumoren exprimiert und hat eine onkogene Funktion. Damit stellt es ein attraktives Ziel für Therapieansätze in der Krebsmedizin dar. Bisher durchgeführte Studien mit einer WT1-Peptidvakzinierung zeigten gute Ergebnisse in der Therapie hämatologischer Erkrankungen. Die hier vorliegende Phase-2-Studie untersuchte die Sicherheit und Immunogenität einer WT1- Peptidvakzinierung bei Patienten mit WT1-Expression in soliden Tumoren ohne kurative Behandlungsoptionen.

Methoden: Das Studiendesign sah insgesamt 12 Impfungen vor, davon initial 4 - 12 Impfungen im Abstand von zwei Wochen, danach monatlich jeweils bis zum Krankheitsprogress. Gegebenenfalls auftretende Toxizitäten wurden mittels CTCAE (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events) Version 3.0 evaluiert. Das Staging erfolgte mittels Computertomographie. Das Therapieansprechen wurde anhand von RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)-Kriterien Version 1.1 als komplettes Ansprechen (CR), teilweises Ansprechen (PR), stabile Erkrankung (SD) oder Krankheitsprogress (PD) definiert. Daneben erfolgte eine Analyse der Immunogenität der Vakzinierung: mittels Durchflusszytometrie wurden die Frequenzen der WT1-Tetramer⁺ T-Zellen (WT1⁺TCs), der regulativen T-Zellen (T_{regs}), der myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) und der proinflammatorischen Zytokine (TNF α , IFN γ und IL-2) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 14 Patienten zwischen 2005 und 2015 in die Studie eingeschlossen. Die Patienten erhielten im Mittel 10 Vakzinierungen (Spannbreite 2 - >100). Die Therapie wurde von den Patienten gut vertragen. Als Therapieansprechen konnte eine

PR, neun SDs und vier PDs erreicht werden. Das progressionsfreie Überleben lag bei 359 Tagen (Spannbreite 98 - 2672 Tage (siehe Graphik)). WT1+TCs waren bei 12/14 Patienten zur Baseline nachweisbar (Mittelwert 0,73%). Die WT1+TCs stiegen im peripheren Blut (PB) bei 2 Patienten zum Zeitpunkt 1 (Mittelwert 7 Wochen) und bei 3 Patienten zum Zeitpunkt 2 (Mittelwert 17 Wochen) an. Zum Zeitpunkt 3 (Mittelwert 39 Wochen) stiegen bei 4/6 Patienten, die zu dem Zeitpunkt noch geimpft wurden, die WT1+TCs an. Ein Patient mit Pleuramesotheliom hatte nach 45 Wochen einen plötzlichen Anstieg der WT1+TCs. Dies resultierte in einem anhaltenden SD bis dato (>130 Monate). Die T_{reg} und MDSC-Frequenzen stiegen bei 12/14 respektive 7/14 Patienten im Verlauf an. Die intrazelluläre pro-inflammatorische Zytokinausschüttung zeigte im Verlauf keine Veränderung.

Zusammenfassung: Die hier analysierte WT1-Vakzinierungsstudie liefert den Nachweis einer sicheren und potenziell immunologisch und klinisch effektiven Therapieoption bei Patienten mit WT1-exprimierenden Tumoren. Weitere Studien zur genaueren Evaluation der Effektivität bei größeren Patientengruppen verschiedener Tumorentitäten und insbesondere dem Potential von Vakzinierungen als Teil von Kombinationstherapien sollten folgen.

2 Abstract

Background: The balance between oncogenes and tumor suppressor genes is a prime determinant of normal tissue development versus tumorigenesis. In the past years, some of these genes emerged as potential specific targets for prevention and individualized treatment of cancer. Wilms' tumor gene (WT1) is expressed in different types of hematological malignancies and solid cancers and plays an oncogenic role in various types of malignant tumors. Recent studies showed encouraging results from a WT-1-peptide vaccination in patients with hematological diseases. In this phase 2 trial we investigated the safety and immunogenicity of WT1-peptide vaccination in patients with WT1-expressing solid tumors without curative treatment options.

Patients and methods: Between 2005 and 2015 14 patients were enrolled in the trial. Patients initially received between 4 and 12 vaccinations biweekly, then monthly for up to 8 times, for a total of 12 vaccinations or until disease progression. Toxicities were evaluated according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE version 3.0). Tumor size was measured by computed tomography. The responses were evaluated according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST version 1.1), defined as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD) and progressive disease (PD). Frequencies of WT1-tetramer⁺ T-cells (WT1⁺TCs), regulatory T-cells (T_{regs}), Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and proinflammatory cytokines (TNF α , IFN γ and IL-2) were analyzed at three different timepoints (Tp1-3) using flow cytometry.

Results: 14 patients were enrolled in the study. Patients received a median of 10 vaccinations (range 2 - >100). Treatment was well tolerated. Objective responses were 1 PR, 9 SDs and 4 PDs. Progression free survival was 359 days (range 98-2672 days). WT1⁺TCs were present at baseline in 12 out of 14 patients (median frequency 0.73%). WT1⁺TCs increased in blood in 2 patients at Tp1 (median 7 weeks) and in 3 patients at Tp2 (median 17 weeks). At Tp3 (median 39 weeks) WT1⁺TCs increased in blood in 4 out of 6 patients still under vaccination. A patient affected by pleural mesothelioma had a sudden

increase of WT1⁺TC in blood after 45 weeks, resulting eventually in a SD over up to date (> 130 months). Frequency of T_{regs} and MDSCs increased over time in 12 and 7 patients, respectively. T-cell intracellular proinflammatory cytokines response did not show any increase over time.

Conclusion: Our WT1 vaccination study provides preliminary evidence of safety and potential immunologic and clinical efficacy in patients with WT1 expressing solid tumors. Further studies are needed to provide evidence of efficacy in larger cohorts of different solid tumor entities and to evaluate the potential of tumour vaccinations as part of combination therapies.

3 Einleitung

3.1 Tumor-Immunologie

3.1.1 Immunsystem und Tumorentstehung

Eines der forschungsintensivsten Themen der medizinischen Wissenschaft sind die komplexen Fragen der Ätiologie, Pathogenese, Diagnose und Therapie maligner Tumoren. Die Grundidee besteht darin, möglichst spezifische Eigenschaften von Tumorzellen nachzuweisen, durch die sich der Tumor vom umgebenden Gewebe eindeutig unterscheiden lässt. Die Grundsteine der Tumorpathologie wurden bereits Mitte des 19. Jahrhunderts von Rudolph Virchow gelegt. 1858 veröffentlichte er in der "Cellularpathologie" in Abrenzung zu den ontologischen Krankheitstheorien die Begriffs-Trias Heterotopie, Heterochronie und Heterometrie, in der er das Wachstum von Tumorzellen am „falschen Ort, zur falschen Zeit und im falschen Ausmaß“ charakterisierte.

Im Jahre 1863 beschrieb Virchow zum ersten Mal die enge Verbindung zwischen Entzündungsreaktionen und Tumorentstehung.⁽¹⁾ 1909 formulierte Paul Ehrlich erstmalig die These, das Immunsystem sei in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu beseitigen. Thomas und Burnet griffen Mitte des 20. Jahrhunderts dieses Thema erneut auf und prägten den Begriff der "Tumor-Immunosurveillance", der beschreibt, dass das Immunsystem durch eine ständige „Überwachung“ in der Lage sei, krankhaft veränderte Zellen zu erkennen und zu zerstören. Die Tumorentstehung sei demnach auf eine Störung des Immunsystems zurückzuführen.^(2, 3) Dafür spricht u.a. das gehäufte Auftreten von Krebserkrankungen bei Kindern und Erwachsenen mit einer primären Immundefizienz. Diese würde demnach auf eine fehlerhafte oder unzureichende Zerstörung veränderter Zellen und eine veränderte Immunität gegenüber Krebszellen zurückgeführt.⁽⁴⁾

Zunächst wurde vermutet, Lymphozyten seien die Basis des "Immunosurveillance"-Prozesses, der immunkompetente Wirte gegen die Entwicklung eines Primärtumors schützt. Von dieser Theorie wurde abgerückt, nachdem keine Unterschiede in der Tumorentstehung zwischen athymischen Mäusen und genidentischen Mäusen vom Wild-Typ festgestellt

werden konnten.⁽⁵⁾ Auch Infektionen mit dem humanen Herpesvirus 8 (HHV8) sowie Epstein-Barr-Virus- (EBV-) assoziierte Krebserkrankungen wie das Kaposi-Sarkom oder das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) sind meist eng mit der Schwere der Immundefizienz verknüpft.⁽⁶⁾ Diese Theorie wurde u.a. von Schreiber et al. gestützt, die 2011 die „duale Rolle des Immunsystems“ in der Krebsentstehung genauer untersuchten. Sie schrieben, das Immunsystem sei nicht nur in der Lage, das Tumorwachstum zu unterdrücken, indem der Tumor zerstört wird oder in seinem Wachstum gehindert wird. Es sei ebenso in der Lage, das Tumorwachstum zu fördern, indem nur die Zellen selektiert würden, die es schaffen, einen immunkompetenten Wirt zu überleben. Ebenso könnte das „Tumormikromilieu“ dahingehend verändert werden, dass ein Tumorwachstum begünstigt würde.⁽⁷⁾ Das „Tumormikromilieu“ (TMM) bzw. das “Tumor microenvironment“ (TME) mit seinen einzelnen Komponenten wie mesenchymalen Stammzellen, Adipozyten, Tumor-assoziierten Fibroblasten, Endothelialzellen und Immunzellen sei demnach ein weiterer Einflussfaktor, der darüber entscheidet, ob das Immunsystem bzw. die Immunzellen den Tumor angreifen, ihn ignorieren oder im schlimmsten Fall sogar seine (weitere) Entwicklung bzw. das Überleben fördern.⁽⁸⁾ In Bezug auf das „Tumormikromilieu“ konnten Witkiewicz et al. 2011 in einem Brustkrebs-Modell zeigen, dass Krebszellen in der Lage sind, oxidativen Stress in angrenzenden Stromazellen zu induzieren, was wiederum die stromalen Fibroblasten zu Autophagie bzw. Mitophagie und aerober Glykolyse zwingt. Die dadurch produzierten Nährstoffe (Laktat, Ketone und Glutamin) stellen daraufhin Nahrung für die anabolischen Krebszellen dar.⁽⁹⁾

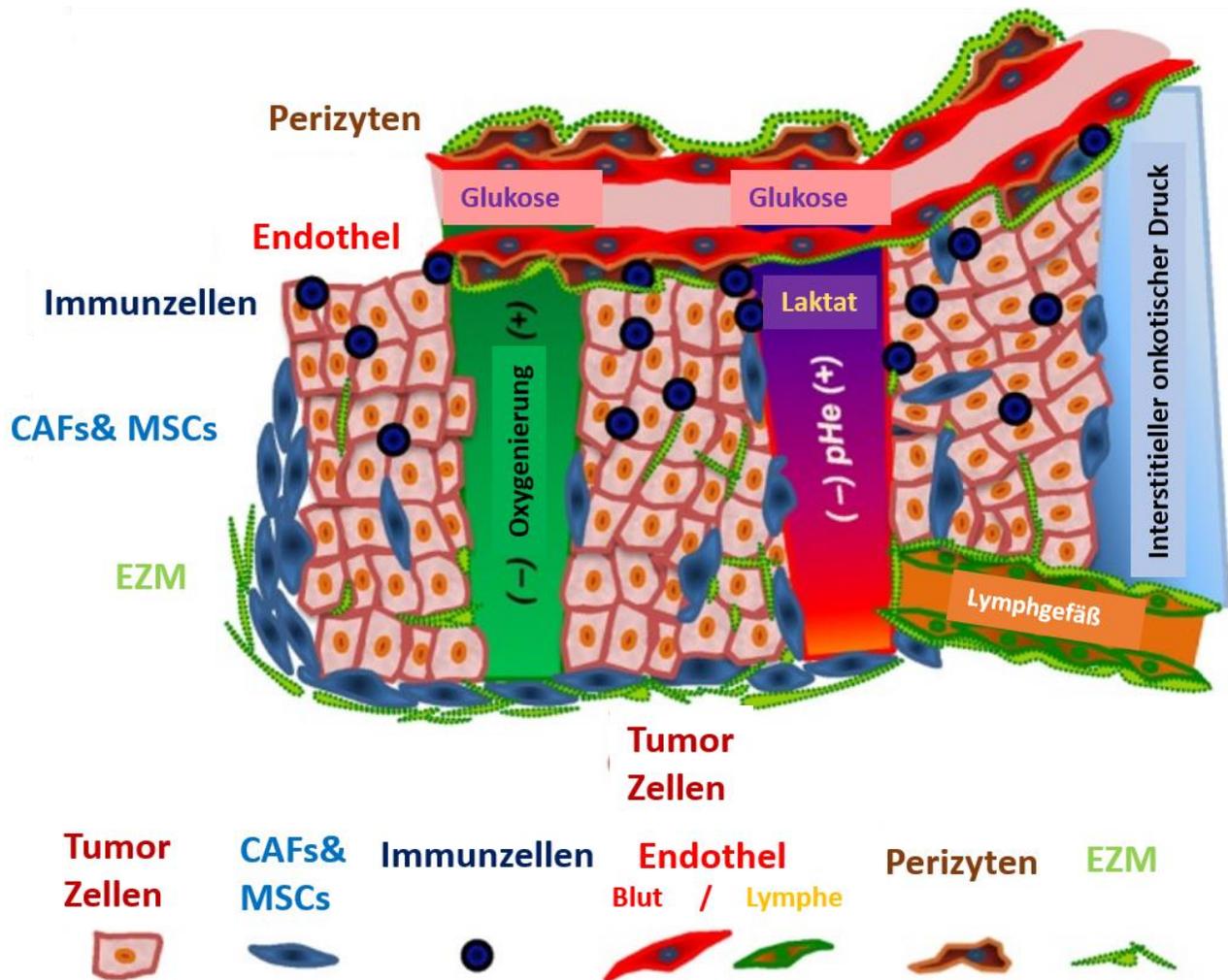


Abbildung 1: Das Tumor Mikromilieu (TME): Komponenten und in-vivo-Darstellung des TME

CAFs: Krebszellen-assoziierte Fibroblasten, MSCs: mesenchymale Stammzellen, ECM: Extrazellulärmatrix, bestehend aus Kollagen, Laminin und anderen Matrix-Proteinen. Endothelialzellen, Perizyten und vaskuläre Extrazellulärmatrix setzen das Tumorblut- und Gefäßsystem zusammen. (Adaptiert nach Ramamonjisoa und Ackerstaff)⁽¹⁰⁾

3.1.2 Cancer Immunoediting: Die drei E's: Elimination, Equilibrium, Escape

Die Hypothese des "Immunoediting" besteht aus der dualen Rolle des Immunsystems: Zum einen dem a) Schutz des Wirtes durch die Zerstörung von Tumorzellen und zum anderen der b) Beeinflussung des Tumors durch die Veränderung seines Genoms⁽¹¹⁾. Das Immunoediting wird in drei unterschiedliche Phasen unterteilt: Eliminierung (engl. elimination), Gleichgewicht (engl. equilibrium) und Entkommen (engl. escape) und wurde im Jahre 2004 durch Dunn et al. geprägt.

In der ersten Phase, der Eliminierungsphase (diese beinhaltet sowohl das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem), setzt die tumoröse Zelle u.a. inflammatorische Zytokine frei, durch die eine Entzündungsreaktion hervorgerufen und NK-Zellen und T-Zellen angelockt werden. Im Idealfall werden die Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und zerstört.

Die zweite Phase, die Gleichgewichtsphase, ist die längste aller drei Phasen und kann Monate bis Jahre andauern. Hier können die Tumorzellen, die die Eliminierungsphase mithilfe von Escape-Mechanismen umgehen konnten, ungehindert wachsen. In dieser Phase können neue Tumorzell-Varianten entstehen, die mithilfe unterschiedlichster Mutationen gegenüber dem Angriff des Immunsystems resistent sind.

In der dritten Phase, der Phase des Entkommens, haben die Tumorzellen unterschiedliche genetische und epigenetische Immunresistenzmechanismen entwickelt, die die Detektion durch das Immunsystem (fast) unmöglich machen.^{(12) (13)}

3.1.3 Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem

Mittlerweile sind viele Mechanismen bekannt, durch die der Tumor einer Immunantwort entgehen kann. Der Verlust der HLA-Klasse-1-Moleküle, über die ein wesentlicher Teil der Tumorantigene an der Oberfläche präsentiert werden, führt beispielsweise dazu, dass die Tumorerkennung durch Antigen-spezifische T-Zellen aufgehoben oder vermindert ist.⁽¹⁴⁾ Ein weiterer Mechanismus des "Tumor-Escapes" ist die Inhibierung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TNF α , INF β) und die Induktion tolerogener Faktoren (IL-10).

Die Funktion dendritischer Zellen wird somit gehemmt und führt zur Toleranz von Tumor Infiltrierenden Lymphozyten (TILs). Wenn Tumorzellen oder regulatorische Zellen des Immunsystems Zytokine oder Prostaglandine ausschütten, kann somit eine Immunreaktion direkt gehemmt werden.⁽¹⁵⁾ Des Weiteren wird beschrieben, dass Tumorzellen in der Lage sein können, den Fas-Liganden zu exprimieren, der durch die Bindung an TIL (tumor infiltrating lymphocytes) deren Apoptose induzieren kann.⁽¹⁶⁾

Kaplan et al. konnten demonstrieren, dass endogen produziertes IFN γ die Basis eines Tumor-Überwachung-Systems bildet, das die Entwicklung, sowohl chemisch induzierter, als auch spontaner Tumorentwicklung, in Mäusen kontrollieren kann. Mäuse mit einer Insensitivität gegenüber IFN γ entwickelten chemisch-induzierte Tumoren viel schneller und mit höherer Frequenz. Diese Theorie wurde durch den Nachweis inaktiver Mutationen im IFN γ -pathway, der in Melanomen und Adenokarzinomen der Lunge gefunden wurde, untermauert.⁽¹⁷⁾

Im Jahre 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg in ihren "Hallmarks of Cancer" weitere Mechanismen, die zu einer Tumorentstehung führen können. Dazu gehören das Aufrechterhalten proliferativer Signale, das Ausweichen wachstumshemmender Prozesse in der Zelle, die Invasion und Metastasierung von Tumoren, die Resistenzmechanismen gegen den Zelltod, die Induktion der Angiogenese und die Befähigung zur replikativen Unsterblichkeit. Im Jahre 2011 erweiterten Hanahan et al. ihre "Hallmarks of cancer-the next generation" um weitere Mechanismen wie die Genom-Instabilität, eine das Tumorstadium unterhaltende Entzündungsreaktion, das Entkommen einer Immunreaktion und die Veränderung des Zellmetabolismus. Des Weiteren untersuchten auch sie das „Tumormikromilieu“, welches eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung zu haben scheint.^{(18) (19) (20)}

3.1.4 Regulatorische Zellelemente und Oberflächenproteine und ihre Rolle in der Tumorentstehung und der Hemmung der Immunantwort

MDSCs (myeloid derived suppressor cells) haben die Fähigkeit, sowohl das angeborene, als auch das adaptierte Immunsystem zu unterdrücken und somit das Tumorwachstum zu fördern. In einer Studie zum Multiplen Myelom konnte gezeigt werden, dass MDSCs bidirektionale Interaktionen mit dem Tumor im Tumormikromilieu haben. Die MDSCs unterstützen das Tumorwachstum und induzieren eine Immunsuppression. Die Zellen des Multiplen Myeloms wiederum induzieren die Entwicklung der MDSCs und ihr Überleben. ⁽²¹⁾ Vuk-Pavlovic et al. konnten 2010 in einer Studie zum Prostatakarzinom zeigen, dass MDSCs von Prostatakarzinom-Patienten die autologe T-Zellproliferation im Vergleich zu der gleichaltrigen gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant inhibieren konnten. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die MDSCs der Karzinompatienten fehlerhaft in ihrer Fähigkeit der Zelldifferenzierung in phänotypisch reife dendritische Zellen waren. Isolierte CD14⁺HLA-DR_{low}/⁻ Zellen exprimierten höhere Levels an intrazellulärem IL-10 und unterdrückten die T-Zellproliferation effektiver als CD14⁺HLA-DR⁺ Zellen. ⁽²²⁾

T_{regs} (regulatorische T-Zellen) infiltrieren diverse Tumoren und sind oft mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert. Sie unterstützen das Tumorwachstum durch eine direkte Hemmung der Antitumor-Effekte von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mithilfe inhibitorischer Zytokine und Zytolyse. In hypoxischen Arealen sind T_{regs} in der Lage, durch Produktion von VEGF die Angiogenese direkt zu stimulieren. ⁽²³⁾ T_{regs} spielen auch eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort, weswegen Autoimmunerkrankungen ein weiteres Beispiel der Dysfunktionalität der T_{regs} darstellen. ⁽²⁴⁾

In der normalen Zellphysiologie spielen PD-1 (CD 279) und der Ligand PD-L1 (CD 274) eine Rolle in der Immunoregulation der T-Zell-Aktivierung, der Toleranz und der immunvermittelten Schädigung des Gewebes. Der PD-1/PD-L1-Signalweg spielt auch eine kritische Rolle bei Tumor-Escape-Mechanismen und korreliert häufig mit einer schlechten Prognose. ⁽²⁵⁾ Das immunsuppressive Oberflächenprotein PD-1 (programmed death-1) ist in aktivierten T-Lymphozyten hochreguliert und inhibiert die T-Zellfunktion durch Bindung an seine Liganden PD-L1 und PD-L2. Die Hemmung dieses Signalweges bzw. der sog. Immuncheckpoint-Inhibitoren hat in den letzten Jahren zu bemerkenswerten klinischen Erfolgen in der Therapie von soliden Tumoren geführt. Neben dem PD-1/PD-L1-Signalweg existieren noch andere inhibitorische T-Zell-Rezeptoren, deren klinische Relevanz sich in den nächsten Jahren sicher zeigen wird. Eine biologisch und klinisch relevante Frage bleibt

jedoch, ob die Effektorfunktion tumorreaktiver TILs durch den Angriff eines einzigen Rezeptors möglich ist, oder ob die Kombination mehrerer Checkpoint Blockaden für den anhaltenden Schutz vor der Tumorentstehung bzw. den -progress notwendig ist. Die Kombination von z.B. anti-CTLA4 mit anti-PD-1 ist in der Lage, auf unterschiedlichen Ebenen die T-Zellaktivierung anzuregen: CTLA4 bei der Proliferation und PD-1 in der Effektorfunktion.^(26, 27)

3.1.5 Rolle der T-Zellen: Klassifikationen und T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene

Alle Immunzellen haben ihren Ursprung als unreife Stammzellen im Knochenmark. In der Anwesenheit von Zytokinen differenzieren sie entweder in B- oder T-Zellen bzw. Fresszellen. Das humorale Immunsystem umfasst v.a. die B-Zellen. B-Zellen sind in der Lage (Tumor-) Antigene in der Blutbahn zuerkennen und können entweder zu B-Gedächtniszellen oder Plasmazellen differenzieren. Plasma-Zellen produzieren Antikörper, die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, die entweder in der Milz zerstört werden oder mithilfe von MHC-Komplexen von Antigen-präsentierenden Zellen gezeigt werden können. T-Zellen, die weitestgehend anhand ihrer Oberflächenexpression von CD8 bzw. CD4 unterteilt werden, erkennen Peptid-Antigene, die ihnen von MHC-I oder MHC-II-Proteinen (engl. Major Histocompatibility Complex I und II) präsentiert werden. Klassische Tumor-Antigene werden über MHC-I Proteine präsentiert, wohingegen MHC-II-Proteine überwiegend Peptide exogener Proteine präsentieren. Die initiale Aktivierung naiver T-Zellen (CD4 und CD8) geschieht fast ausschließlich durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen.⁽²⁸⁾

MHC-Klasse-II Moleküle werden von CD4+ T-Zellen erkannt. CD4+ T-Zellen helfen bei der Differenzierung von B-Zellen in Plasma-Zellen und in B-Gedächtniszellen.⁽²⁹⁾

Mithilfe der Ausschüttung von Zytokinen sind sie in der Lage, zusätzliche Immunzellen anzulocken. Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden von CD8+ -T-Zellen erkannt. Nachdem die CD8+ -T-Zelle ein passendes Antigen präsentiert bekommen hat, transformiert sie unter Einfluss von IFN γ zu einer zytotoxischen T-Zelle. Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen auf MHC-I-Komplexen präsentierte Antigene v.a. auf viral infizierten Zellen oder Tumorzellen. Sie sind in der Lage, über mindestens drei verschiedene Wege die Zielzelle zu töten; zwei

von ihnen beinhalten direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Effektor und Zielzelle: I) Induktion der Apoptose durch die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor und der damit verbundenen Auslösung der Kaspase-Kaskade, II) Direkter Angriff der Zielzelle über die Freisetzung von Granzym B und Perforin in den Interzellularraum zwischen CTL und Zielzelle. Der dritte Weg wird durch Zytokine (Bsp: IFN γ and TNF α) vermittelt, die über die Dauer der T-Zellrezeptorstimulation ausgeschüttet werden. TNF α kann durch die Aktivierung seines Rezeptors auf der Zielzelle ebenfalls die Kaspase-Kaskade triggern, IFN γ induziert hingegen auf transkriptioneller Ebene die Aktivierung der MHC-Klasse-1-Antigen-Präsentation und Fas in der Zielzelle, was zu einer gesteigerten Präsentation endogener Peptide durch MHC-Klasse-I und einer gesteigerten Zellyse durch die Fas-Aktivierung führt.^(30, 31)

3.2 Tumor-Antigene als Zielstruktur für Immuntherapien und Prädiktoren für das Therapieansprechen

In den späten 70er Jahren entdeckte die Forschungsgruppe um Lloyd J. Old am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center das erste humane Krebs-Antigen und nannte diesen Ansatz „autologe Typisierung“.⁽³²⁾ Tumor-Antigene sind Antigene (engl. ag Antibody generating), die von Krebszellen exprimiert werden und eine Immunantwort auslösen können. Daher eignen sie sich sowohl als Tumormarker in der Verlaufskontrolle bei malignen Erkrankungen sowie als Zielstruktur für Immuntherapien.⁽³³⁾ Üblicherweise exprimieren Tumorzellen Tumor-assoziierte Antigene (TAAs), Tumor-spezifische Antigene (TSA) oder Neoantigene (mutation-derived antigens), die als Fremdartig angesehen werden und Immunantworten hervorrufen können.⁽³⁴⁾ Tumor-spezifische Antigene werden ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert, wohingegen Tumor-assoziierte Antigene auch auf gesunden Zellen zu finden sind. Tumor-Antigene sind in der Regel keine tumorspezifischen Strukturen, sondern ihre Expression entsteht während ihrer malignen Transformation.⁽³⁵⁾

Zwischen 1992-1995 gelang der Arbeitsgruppe um Boon die Charakterisierung der ersten Tumor-Antigene mithilfe zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL) -Klonen und cDNA-transfizierten COS (CV-1 in Origin)-Zellen.^{(36) (37)} Durch die Etablierung neuer Methoden wie

a) der Weiterentwicklung von cDNA-Expressionssystemen mit Hilfe von Retroviren und autologen Fibroblasten⁽³⁸⁾, b) der SEREX-Technik (=serological screening of cDNA expression library)⁽³⁹⁾, c) biochemische Ansätze mit Peptid-Elution und anschließender Massenspektrometrie sowie d) der reversen Immunologie (reverse immunology), bei der immunogene Peptide aus der Sequenz eines Genprodukts herausgefiltert werden können. Hierdurch gelang die Identifizierung zahlreicher neuer TAAs.^(40, 41)

Mithilfe von Software-Programmen wie BIMAS und SYFPEITHI können von bereits bekannten Tumor-Antigenen, für die keine spontane T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte, Epitop-Vorhersagen getroffen werden. Die Kandidaten-Peptidsequenzen für einen bestimmten HLA (humanes Leukozyten-Antigen)-Typ werden synthetisiert und Peptide, die sich an HLA-Moleküle binden, können von Antigen-präsentierenden Zellen gezeigt werden und auf die Induktion einer zytolytischen Reaktion von CTLs getestet werden.⁽³⁵⁾ Die gleiche Strategie wird bei der Herstellung einer cDNA-Bibliothek mittels einer repräsentativen Differenz-Analyse (RDA) angewendet.⁽⁴²⁾ Weitere Tumor-Antigene konnten durch vergleichende Proteasom-Analysen und Gen-Expressions-Analysen identifiziert werden.⁽³⁵⁾

Diverse genetische Ereignisse und die darauffolgende klonale (Weiter-) Entwicklung steuern die Kanzerogenese und machen die Krankheitsbekämpfung mit einem "single-target" Medikament sehr schwierig. Die Vielfalt der Genmutationen entsteht aus klonaler Heterogenität und stellt daher ein ideales Setting für die multiepitope Tumorstimmung dar.

Die Fähigkeit des "next generation sequencing" (NGS) mit der Herstellung einer umfassenden Abbildung somatischer Mutationen in Tumoren („Mutanom“) stellt ein starkes Hilfsmittel in der Krebstherapie dar. Castle et al. konnten 2012 im Mausversuch mithilfe des "next generation sequencing exome resequencing" vielfach nicht-synonyme somatische Punktmutationen in Melanomzellen nachweisen. Potenzielle „Driver-Mutationen“ tauchten sowohl in klassischen Tumorsuppressorgenen als auch in Genen, die in protoonkogenen Signalwegen die Zellproliferation, -adhäsion, -migration und Apoptose regulieren, auf. Die Möglichkeit mit "deep sequencing" systematisch Mutationen der Immunogenität zu

analysieren, stellt einen Ansatz der individualisierten Immuntherapie dar.⁽⁴³⁾ Die Rolle des „deep sequencing“ als Prädiktor für das Therapieansprechen mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist weiterhin nicht vollständig geklärt, es weist aber vieles darauf hin, dass der sogenannte „Tumor mutational burden“ (TMB) einer der wichtigsten Prädiktoren für das Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist.⁽⁴⁴⁾

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist eine klonale Veränderung in der Anzahl der DNA-Nukleotide in Mikrosatelliten. Es tritt in Tumoren mit fehlerhaften „mismatch“-Reparaturmechanismen durch eine Inaktivierung einer der vier „mismatch“-Reparaturgene, MSH2, MLH1, MSH6 und PMS2, auf. Um den MSI-Status eines Tumors zu bestimmen, bedarf es PCR-basierter Detektionsmechanismen.⁽⁴⁵⁾ Die Mikrosatelliteninstabilität kann sowohl vererbt werden, als auch spontan (somatisch) entstehen. Die Testung des MSI-Status kann durch NGS erfolgen. Durch die Testung kann man somit Patienten identifizieren, die von einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren profitieren können.⁽⁴⁶⁾

Le et al. konnten 2017 in mehreren Studien zeigen, dass es bei Therapieansprechen zu einer in-vivo Expansion Neoantigen-spezifischer T-Zell-Klone gekommen war, die mutierten Neopeptiden im Tumor gegenüber reaktiv waren. Diese Daten konnten die Hypothese untermauern, dass der Großteil an mutierten Neoantigenen in Tumoren mit fehlerhaften „mismatch“-Reparaturmechanismen sensitiver gegenüber der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren ist.⁽⁴⁷⁾

3.2.1 Tumor-Antigene Subgruppen (Klassifikation)

Durch die genetische Instabilität maligner Zellen ist eine große Heterogenität bei der Expression von HLA-Molekülen und Tumor-Antigenen möglich.⁽⁴⁸⁾

Es lassen sich verschiedene Gruppen von Tumor-Antigenen unterscheiden. Eine Gruppe umfasst die sogenannten Aktivierungsantigene. Hierzu gehören die Cancer/Testis-Antigene wie z.B. MAGE, PAGE, GAGE, RAGE und SPANX. Sie sind u.a. auf den Zellen von Melanomen, von Brust-, Lungen- oder Leberzellkrebs zu finden.⁽⁴⁹⁾ Von einigen Autoren werden zusätzlich die Muzine zu dieser Gruppe gezählt, die vor allem als Oberflächenproteine beim Mamma-, Ovarial- oder Pankreaskarzinom zu finden sind.⁽⁵⁰⁾

Eine weitere Gruppe umfasst die onkofetale Antigene. Hierzu gehören z.B. das Karzinoembryonale Antigen (CEA), das u.a. bei kolorektalen Karzinomen auftritt, das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostata-Karzinom oder das Alpha-Fetoprotein (AFP) beim Leberzellkarzinom.⁽⁵¹⁾ Onkofetale Antigene sind nicht tumorspezifisch.

Zudem existieren Antigene, die zwar auch auf gesunden Zellen exprimiert werden, jedoch auf Tumorzellen überexprimiert werden. Hierzu gehören u.a. Her-2/neu⁽⁵²⁾, p53, Ep-CAM (epithelial cell adhesion molecule), Cyclin-B1 sowie der Transkriptionsfaktor Wilms-Tumor-Protein1(WT1).⁽⁵³⁾ Transkriptionsfaktoren stellen aufgrund ihrer funktionellen Relevanz für den Tumorprogress interessante Zielstrukturen für Immuntherapien dar. Viele Onkogene und Tumorsuppressorgene kodieren für Transkriptionsfaktoren. Sowohl die Expression, als auch die Aktivierung und Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung.

Eine weitere Gruppe umfasst die viralen Antigene. Hierzu gehören u. a. die Humanen Papilloma-Viren (HPV), von denen vor allem HPV-16 und -18 an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt sind⁽⁵⁴⁾, das Epstein-Barr-Virus (EBV), das bei der Entstehung von Burkitt-Lymphomen eine Rolle spielt⁽⁵⁵⁾ sowie Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C (HCV), die von großer Relevanz bei der Entstehung von Leberzellkarzinomen sind.⁽⁵⁶⁾

Tumor-spezifische Antigene, die durch Punktmutation, Deletion oder Translokation von Genen entstehen, sind individuenspezifisch und eignen sich daher eher schlecht für Standard-Immuntherapien. Allerdings ließen sich innerhalb einiger Antigene dieser Gruppe bei verschiedenen Individuen die gleichen Mutationen finden. Hierzu gehören u.a. CDK4 (cyclin-dependent kinase-4), das auf verschiedenen Tumorzellen und u.a. Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen exprimiert wird^(57, 58), BRCA1/2, das v.a. bei der Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen eine Rolle spielt, MUM-1 in diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen⁽⁵⁹⁾, bcr/abl bei der chronisch myeloischen Leukämie⁽⁶⁰⁾, p53⁽⁶¹⁾ und das ras-Onkogen.

ANXAA2 (Annexin A2), ein embryonales, pleiotropes Protein, welches bei der Entstehung von Ovarial-, Zervix- und Mammakarzinomen eine Rolle zu spielen scheint, gilt als eine attraktive neue Zielstruktur für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern.⁽⁶²⁾

Das L1 cell adhesion molecule (L1cam) wird abweichend in verschiedenen Tumoren exprimiert. Die ektope Expression von L1cam in Magenkarzinom-Zelllinien erhöhte in Studien signifikant die Zellproliferation, -migration und -invasion, wohingegen das "knockdown" von L1cam sowohl die o.g. Prozesse in vitro, als auch die Tumorgenese und die Metastasierung in vivo hemmte.⁽⁶³⁾ Darüber hinaus spielt die Überexpression von L1cam womöglich eine Rolle in der Wandlung von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe (epithelial to mesenchymal transition = EMT) und der Entstehung von Krebszellen (cancer initiating cell formation = CIC) in HEC-1A Endometriumkarzinomen spielt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass L1cam Apoptoseresistenzen in HEC-1A-Zellen fördert. Die Verbindung zwischen L1cam und EMT/CICs könnte bei der Identifizierung neuer targets in der Behandlung von Endometriumkarzinomen hilfreich sein.⁽⁶⁴⁾ Auch Splice-Varianten, neue offene Leserahmen, Pseudogene oder Antisense-Strangprodukte der DNA können Zielstrukturen darstellen.^{(65) (66)}

3.3 Targeted Therapy: Gezielte Krebstherapie

3.3.1 Entstehung und Fortschritte

Der Begriff "targeted therapy" oder auch „gezielte Krebstherapie“ bezeichnet die Behandlung von Krebserkrankungen mit Arzneistoffen, die bestimmte biologische und/oder zytologische Eigenarten der Krebszellen „ausnutzen“. Dazu gehören z. B. gentechnisch hergestellte monoklonale Antikörper oder sog. "small molecules".

Bereits in den frühen 1980er Jahren wurde der Wunsch nach einer gezielten Tumorthherapie immer größer. Die größte Schwäche der bis dahin angewandten Tumorthérapien war ihre fehlende Spezifität im direkten Angriff der Tumorzellen. Mit dem Aufkommen monoklonaler Antikörper wurde diese Möglichkeit der zielgerichteten Therapie erstmalig in Betracht gezogen. Die ersten experimentellen Studien mit monoklonalen Antikörpern in Tieren und

Menschen zeigten die Fähigkeit der Antikörper, spezifische Tumorzellen, die Antigene am oder um den Tumor herum zeigten, gezielt anzugreifen.⁽⁶⁷⁾ Der erste Patient, der in den Vereinigten Staaten mit einem monoklonalen Antikörper behandelt wurde, war ein Patient mit einem Non-Hodgkin-Lymphom. Obwohl die Behandlung mit AB 89 nicht in dem Sinne erfolgreich war, als dass ein signifikantes klinisches Ansprechen hätte verzeichnet werden können, so konnte zumindest erstmalig im Menschen gezeigt werden, dass ein monoklonaler Antikörper ein vorübergehendes Sinken der zirkulierenden Tumorzellen und die Komplexbildung mit zirkulierenden Antigenen bewirken konnte. All das mit einer nur minimalen Toxizität für den Patienten. Die Antikörper konnten auf der Zelloberfläche zirkulierender Lymphomzellen detektiert werden, und die freien Antigene im Serum sanken mit jeder erneuten Antikörper-Infusion.⁽⁶⁸⁾ Nur 25 Jahre später hat die FDA (U.S. Food and Drug Administration) bereits 21 monoklonale Antikörper (darunter sechs spezifisch für die Krebstherapie) zugelassen.⁽⁶⁹⁾

3.3.2 Krebsimmuntherapie

Die Krebsimmuntherapie hat das Potenzial einer noch gezielteren Krebstherapie, die sich die Fähigkeit des Immunsystems im Angriff auf die Tumorzellen zunutze macht. Es gibt verschiedene Ansätze, um die Immunantwort gegenüber Krebszellen zu verstärken.

3.3.2.1 Checkpoint-Inhibitoren

Checkpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper gegen spezifische Rezeptoren (Immun-Checkpoints = IC) auf T-Lymphozyten, die die Immunantwort im Sinne einer Dämpfung (anti-inflammatorische IC) oder einer Steigerung (pro-inflammatorische IC) modulieren. Krebszellen überexprimieren diese Rezeptoren, um der Erkennung und der Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen.⁽⁷⁰⁾

3.3.2.2 Kombinierte Immuntherapie

Kombinierte Immuntherapien stellen entweder eine Kombination traditioneller Krebstherapien (z.B. Chemotherapien, Strahlentherapien oder zielgerichtete Therapien) oder die Kombination monoklonaler Antikörper mit anderen Checkpoint-Inhibitoren oder -

Signalwegen dar. Ein Beispiel hierfür ist die CTLA-4-Blockade in Kombination mit einer PD-1/PD-L1-Blockade für einen synergistischen Effekt, die inzwischen sowohl für die Behandlung des metastasierten Melanoms, als auch für die des Nierenzellkarzinom zugelassen wurde. Derzeit gibt es eine Vielzahl von klinischen Studien, die den Stellenwert und die klinische Effektivität von Kombinationstherapien evaluieren und versuchen, ein sog. „Immunprofil“ zu erstellen, das möglicherweise ein Therapieansprechen voraussagen kann.⁽⁷¹⁾ Für das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist die Kombinationstherapie bestehend aus einem Chemotherapeutikum in Kombination mit einem Antikörper in der Standardtherapie bereits angekommen. Ein weiteres Beispiel für die kombinierte Immuntherapie ist die Kombination von Abemaciclib (CDK4/6-Inhibitor) mit einer PD-L1-Checkpoint-Blockade. In einer 2017 durchgeführten Studie von Schaer et. al konnte gezeigt werden, dass die Monotherapie von Abemaciclib in der Behandlung von Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen mit einem verzögerten Tumorwachstum und einer gleichzeitigen Erhöhung von T-Zellen im Tumor einherging. Die Kombination mit einem PD-L1-Antikörper führte zu einem kompletten Tumorregress und einem immunologischen Gedächtnis, begleitet von einer verbesserten Antigen-Präsentation und einer verbesserten Zellzyklus-Kontrolle.⁽⁵⁸⁾

3.3.2.3 Adoptive T-Zelltherapie / CAR-T-Zellen

Die adoptive T-Zelltherapie stellt eine Anpassung der tumorspezifischen T-Zellen im Sinne einer Sensibilisierung gegenüber der Tumorzellen ex vivo (z.B. durch Ausstattung mit einem tumorantigenspezifischen T-Zellrezeptor) dar. Durch den Rücktransfer erhält der Organismus die Fähigkeit, mithilfe des Immunsystems den Tumor zu bekämpfen.^(72, 73) Die Immuntherapie mit CAR-T-Zellen (chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen) führte in der klinischen Anwendung bei der Therapie von therapierefraktären B-Zelllymphomen bisher zu vielversprechenden Ergebnissen, weswegen bislang bereits zwei anti-CD19 CAR-T-Therapien von der FDA zugelassen wurden. Nach der Entnahme der T-Lymphozyten mittels Leukapherese, der ex-vivo-Aktivierung und der genetischen Modifikation eigener T-Zellen erfolgt die Infusion individuell zugeschnittener CAR-T-Zellen in den Patienten. CAR-T-Zellen erkennen über den spezifischen Rezeptor Tumorzellen und binden als zytotoxische Zellen an diese, zerstören den Tumor und haben gleichzeitig das Potenzial zur Proliferation. Durch

diese Fähigkeit können die Zellen als sog. "living drug" a) zu einer Wirkstoffakkumulation über die Zeit führen und b) im Patienten persistieren und bei einem Wiederauftreten des Tumors erneut angreifen. CAR-T-Therapien tragen derzeit jedoch noch ein hohes Risiko schwerer Nebenwirkungen, v.a. eines Zytokin-Freisetzungssyndrom, einer potenziell fatalen Inflammationsreaktion.⁽⁷⁴⁾

3.3.2.4 Tumorvakzinierung

Im Prinzip ist das Ziel aller Vakzinierungsansätze die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) und die Stimulation einer durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelten Immunantwort. Im Idealfall sollten neben Effektor-T-Zellen auch Memory-T-Zellen induziert werden, um eine langanhaltende Immunität zu vermitteln. Tumorvakzinierungen gehören zu einer Substanzklasse, die als Biologika-Therapie bekannt ist. Biologika-Therapeutika arbeiten mit der Anwendung von Neoantigenen oder anderen Antigenen, die von den T-Zellen angegriffen werden können. Es entsteht somit durch die Stimulation oder der Wiederherstellung des Immunsystems die Fähigkeit, Infektionen und Krankheiten zu bekämpfen.⁽⁷⁵⁾

Zwei große Gruppen der Tumorvakzinierung werden hierbei unterschieden: a) Präventive (oder prophylaktische) Vakzinierungen, welche die Entstehung von Krebs im gesunden Menschen verhindern sollen und b) Therapeutische Vakzinierungen, welche einen bereits bestehenden Krebs durch eine Stärkung der körpereigenen Immunantwort bekämpfen sollen. Die Therapeutische Vakzinierung stellt eine Form der Immuntherapie dar.

In den letzten Jahren konnten sowohl durch die Entwicklung von Vakzinierungen gegen HBV-assoziierte hepatozelluläre Karzinome als auch in der Prävention von HPV-assoziiertem Zervix-, Vulva-, Vagina- und Analkrebs (sowie ihren Präkanzerosen und Genitalwarzen) zwei große Erfolge in der präventiven Krebsvakzinierung erzielt werden.^(76, 77) Der Erfolg von Vakzinierungen mit dem Ziel der Induktion einer Immunantwort ist bisher größtenteils noch unbefriedigend. Eine Ausnahme bildet hier die erste von der FDA im April 2010 zugelassene Tumorvakzinierung Provenge® (Sipuleucel-T) für die Anwendung bei Männern mit metastasiertem Prostatakarzinom. In klinischen Studien konnte eine

Verlängerung des Überlebens der Patienten von durchschnittlich vier Monaten gezeigt werden⁽⁷⁸⁾. Die im Zusammenhang mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erlangten Erkenntnisse stellen hier einen möglichen Erklärungsansatz dar, da T-Zellen zwar induziert werden konnten, möglicherweise aber durch inhibitorische T-Zell-Rezeptoren in ihrer Wirksamkeit gehemmt werden. Kombinationstherapien aus Vakzinierungen und Immun-Checkpoint-Inhibitoren stellen daher vielversprechende therapeutische Ansätze dar.

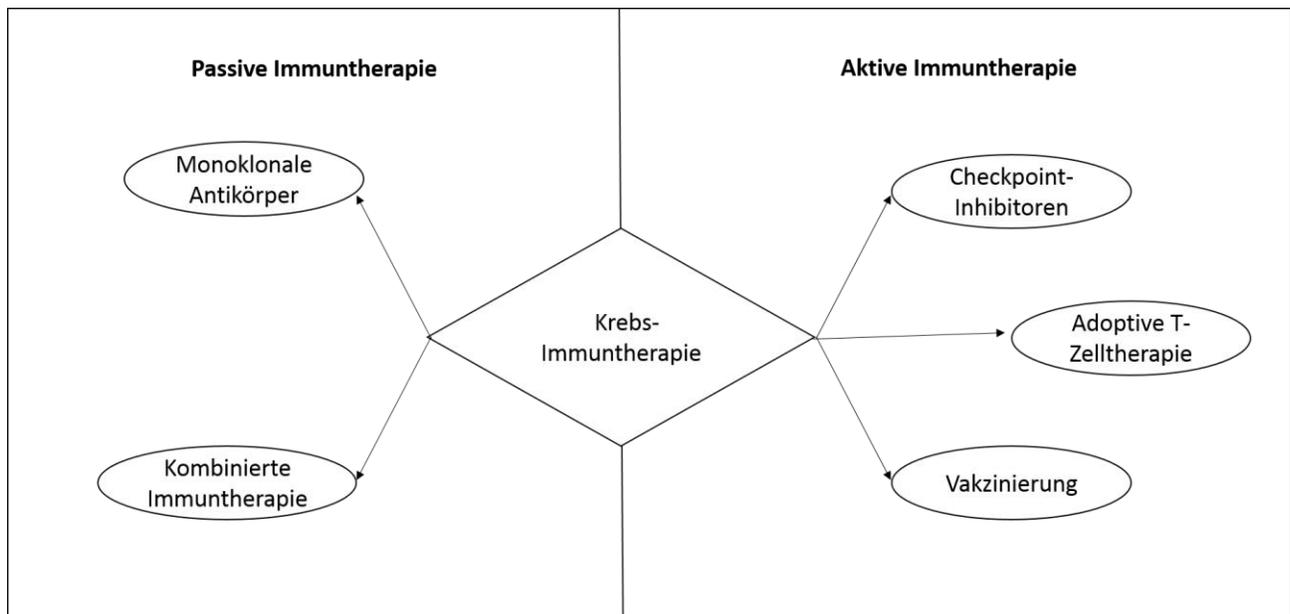


Abbildung 2: Immuntherapieansätze und mögliche Kombinationstherapien

3.3.3 Peptid-basierte Tumor-Vakzinierung

Peptid-basierte Tumor-Vakzinierungen erhöhen die Kontrolle über die Immunantwort und die Sicherheit der Vakzine durch die Reduktion der "off-target-responses". Die Immunogenität der Peptide ist jedoch meist niedrig. Peptid-Nanocluster (PNC) als Transportmedium, bestehend aus cross-linked Peptidantigenen, könnten die Immunogenität der Peptidvakzinierung verbessern. Während die PNCs alle Vorteile üblicher Nanopartikel wie die gesteigerte DC (Dendritische Zellen)-Erkennung, langsamere Diffusion und das Potenzial für Zellinteraktionen haben, können sie darüber hinaus die Anzahl an transportierten Antigenen pro Partikel erhöhen.⁽⁷⁹⁾

3.4 WT1 als therapeutisches Ziel

Der Wilms-Tumor-Gen-1-Transkriptions-Faktor(WT1) wurde zuerst als Tumorsuppressorgen in Wilms Tumoren identifiziert^(80, 81) und ist eines der am häufigsten exprimierten Tumor-assoziierten Antigene in verschiedensten Tumorentitäten.⁽⁸²⁾ 2012 wurde WT1 auf einer Rangliste von insgesamt 75 Antigenen im Rahmen eines "National Cancer Institute Prioritization" – Projekts, unter Berücksichtigung potenziell wichtiger Eigenschaften eines „idealen“ Tumorantigens, auf den ersten Platz gewählt. Im gleichen Jahr werteten Van Driessche et al. alle bis dato verfügbaren klinischen Studien zu WT1-Vakzinierungen bei Patienten mit soliden Tumoren oder hämatologischen Erkrankungen aus. In allen klinischen Studien konnte ein impfinduziertes immunologisches Ansprechen gezeigt werden.⁽⁸³⁾

1997 konnte die Arbeitsgruppe um Inoue zeigen, dass WT1 in hämatologischen Erkrankungen wie dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) sowie Leukämien überexprimiert wird. WT1 wurde bereits zu dem Zeitpunkt eine onkogene Funktion und eine Rolle in der Proliferation von Leukämiezellen zugeschrieben.⁽⁸⁴⁾ Die WT1-Expression im peripheren Blut wird auch als Marker für die minimale Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) bei akuten myeloischen Leukämien (AML) oder myelodysplastischen Syndromen benutzt.^(85, 86) Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die WT1-Expression in AML-Stammzellen oder Tumorgefäßen weitere Angriffsziele für WT1-Peptidvakzinierungen darstellen.^(87, 88)

Im Jahre 2012 bestimmte die Forschungsgruppe um Oji in 34 verschiedenen Tumorentitäten mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) die WT1-Expression in unterschiedlichen Zelllinien, um die Rolle des Wilms Tumor Gen 1 in der Tumorgenese besser zu verstehen. Insgesamt zeigten 28 der 34 untersuchten Zelllinien eine WT1-Expression. Wurden die Zelllinien im Anschluss mit einem WT1-Antisense-Oligomer behandelt, wurde das Zellwachstum signifikant inhibiert, und es kam zu einer gleichzeitigen Reduktion des WT1-Proteinlevels. Zusätzlich inhibierte das eingeschleuste WT1-Gen in den Krebszellen den Antisense-Effekt von WT1 in Bezug auf das Zellwachstum. Diese Ergebnisse konnten dem WT1-Gen eine essentielle Rolle im Tumorwachstum und eine onkogene Rolle beimessen.

⁽⁸⁹⁾

Im Jahr 2002, als unsere Studie konzipiert und initiiert wurde, stellte WT1, insbesondere WT1₁₂₆₋₁₃₄ ein attraktives Impfpeptid dar. Im Jahre 2009 evaluierte das NIH erfolgreiche Tumorantigene für Vakzinierungsstudien nach diversen Kriterien, u.a. a) der therapeutischen Funktion, b) der Immunogenität, c) der Spezifität und d) des Expressionslevels. WT1 gelangte in dem Ranking auf Platz 1 und wurde als ein „ideales Krebs-Antigen“ bewertet⁽⁹⁰⁾.

Die in unserer Studie verwendete Stimulation mit nur einem Klasse-I-Epitop weist jedoch klare Limitierungen auf. Stimulationen mit mehreren Epitopen, u.a. auch Klasse-II bindenden Epitopen, einem Peptidpool oder WT-1-exprimierenden Tumorzellen sind eine logische Weiterentwicklung dieser Proof-of-Concept-Studie. Dies zeigen zahlreiche Studien, die verschiedene Ansätze zur T-Zellstimulation evaluiert haben und möglicherweise der Stimulation mit einem singulären HLA-Klasse-I bindenden Epitop überlegen sind. So konnte z.B. eine Stimulation mit einem aus überlappenden 15mer Epitopen bestehenden „WT1-Pool“ ein deutlich breiteres Spektrum an Epitopen induzieren⁽⁹¹⁾.

3.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In der von uns durchgeführten Phase-IIa-Studie wurden insgesamt 14 auswertbare Patienten mit einem Wilms-Tumoren (WT)-1-exprimierenden Karzinom mit WT1-Peptid plus GM-CSF und KLH als Adjuvantien vakziniert. Das primäre Studienziel war die Bestimmung der immunologischen Effektivität im Sinne einer systemischen induzierbaren T-Zellantwort gegenüber WT1. Der funktionelle Nachweis von peptidspezifischen T-Zellen wurde mit der intrazellulären Zytokinfärbung in der Durchflusszytometrie ermöglicht, die die Analyse von spezifischen T-Zellen durch Antigen-induzierte Zytokinproduktion auf Einzellzellniveau erlaubt. Mithilfe der Tetramertechnologie erfolgte darüber hinaus die Untersuchung aneuger/areaktiver Zellen. Hinsichtlich potenzieller immunsupprimierender Faktoren, die eine Immunantwort einschränken bzw. unterdrücken könnten, wurden zudem immunsuppressive Faktoren in Form von T_{regs} und MDSCs bestimmt. Wir untersuchten sowohl Patienten mit, als auch ohne nachweisbaren Tumor, um herauszufinden, welche klinische Situation für die Induktion einer systemischen T-Zellantwort günstiger ist.

Das sekundäre Studienziel war die Ermittlung möglicher Nebenwirkungen und eine orientierende Abschätzung der klinischen Wirksamkeit.

4 Material und Methoden

4.1 Studiendesign und Studienpopulation

4.1.1 Patienten-Charakteristika, Ein- und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien für die Studie waren ein histologisch gesichertes Karzinom verschiedener Entität ohne kurative oder lebensverlängernde Therapieoption sowie eine durch serologische Typisierung nachgewiesene HLA-A2-Positivität und der Nachweis einer WT1-Expression (durch PCR oder Paraffin-Färbung) im Tumor. Die HLA-Typisierung der Patienten erfolgte im zentralen HLA-Labor der Charité-Universitätsmedizin Campus Rudolph Virchow. Ein weiteres Einschlusskriterium waren ein Karnofsky-Index von 70-100% sowie eine Lebenserwartung >3 Monate. Ausschlusskriterien waren eine aktive Infektion, eine instabile oder Crescendo-Angina pectoris, maligne Rhythmusstörungen, ein frischer Myokardinfarkt oder eine dekompensierte Herzinsuffizienz (NYHA III oder IV). Darüber hinaus durfte bei den Patienten kein aktives Zweitmalignom bestehen, und die Patienten durften zeitgleich keine Zytostatika bzw. andere immunmodulatorische Therapien erhalten. Nach mündlicher Aufklärung über die Ziele und Inhalte der Studie, des Studienablaufs, der möglichen Risiken und der schriftlichen Einverständniserklärung wurde von insgesamt 14 Patienten heparinisiertes Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen. Für die Durchführung dieser Phase II-Studie lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin vor. Die Studie wurde entsprechend der Richtlinien der Good-Clinical-Practice (GCP) durchgeführt. Die Daten der Patienten wurden nur anonymisiert weitergegeben und ausgewertet.

4.1.2 Studienprotokoll

Die Patienten erhielten entweder 4 oder 12 Vakzinierungen im Abstand von jeweils 2 Wochen. Danach erfolgte die Fortsetzung der Vakzinierung bis zu achtmal im 4-wöchigen Abstand. Insgesamt waren jeweils 12 Vakzinierungszyklen geplant. Bei allen Patienten erfolgte dann ggf. eine Fortsetzung der Vakzinierung bis zum Krankheitsprogress. Die Zuteilung der Patienten in das jeweilige Impfschema (4x2 bzw. 12x2) erfolgte abwechselnd in der Reihenfolge der Aufnahme in die Impfstudie.

Die Vakzinierung wurde immer am proximalen, ventralen rechten Oberschenkel in der Nähe der Leistenlymphknoten injiziert. Dazu wurde die Hälfte des GM-CSF intradermal injiziert (Quaddel-Bildung) und der Rest subkutan appliziert. Das WT1-Peptid wurde mit KLH in eine Spritze aufgezogen und in direkter Nähe der GM-CSF-Injektionsstelle (in das Erythem) injiziert.

Aktive Bestandteile	WT1.A2-Peptid	GM-CSF (Leukine®)	KLH (Vacmune®)
Dosierung	200 µg	75 µg	1 mg
Applikation	i.d./s.c. Tag 3	i.d./s.c. Tag 1-4	i.d./s.c. Tag 3

Tabelle 1: Vakzinierungsbestandteile

Zur Evaluation der immunologischen Effektivität wurde den Patienten in Woche 0 (vor Beginn der Studie) sowie in Woche 6 (Zeitpunkt 1) und Woche 10 (Zeitpunkt 2) jeweils 80 ml heparinisiertes Blut abgenommen.

4.1.3 Beurteilung des Behandlungserfolges

Primärer Endpunkt der WT1-Vakzinierungsstudie war die Bestimmung der immunologischen Effektivität, d.h. der Anteil der Patienten mit einer systemischen, induzierbaren T-Zellantwort. Zwei Wochen nach dem 4. und 6. Vakzinierungszyklus sowie danach alle 3 Monate wurde ein Re-Staging (bildgebendes Verfahren, ggf. Tumormarker) gemäß der Standardnachsorge durchgeführt. Die Remissionsbeurteilung wurde gemäß der RECIST-Kriterien (Version 1.1) bestimmt.

Komplette Remission (CR)	Kein Nachweis von Tumormanifestation mit bildgebenden Verfahren über einen Zeitraum von mind. 4 Wochen.
Partielle Remission (PR)	Rückgang der Summe der größten Tumordurchmesser um mind. 30%. Kein Auftreten neuer Tumormanifestationen.
Stabile Erkrankung (SD)	Rückgang der Summe der größten Tumordurchmesser um weniger als 30% oder Zunahme um weniger als 20%. Kein Auftreten neuer Tumormanifestationen.
Progress (PD)	Zunahme der Summe der größten Tumordurchmesser um mehr als 20% oder Auftreten neuer Metastasen.

Während der ersten sechs Impfungen war eine Weiterführung der Impfung bei Tumorprogress erlaubt, solange es keine Indikation für einen Therapiewechsel gab. Für die Einschätzung der Toxizität der Vakzinierung wurden vor jeder erneuten Gabe der Prüfsubstanz eine körperliche Untersuchung sowie eine Blutentnahme und eine Urinanalyse durchgeführt. Aufgetretene Toxizitäten wurden schriftlich festgehalten und mittels CTCAE-Kriterien (Common Toxicity Criteria version 2.0, Bethesda, MD) bewertet. Sekundäre Endpunkte waren die orientierende Abschätzung der klinischen Wirksamkeit durch die Ermittlung des progressionsfreien Überleben (progression-free survival; PFS) und des Gesamtüberlebens (overall survival; OS). Das PFS war definiert als die Periode von Beginn der WT1-Vakzinierung bis hin zum klinischen oder in der Bildgebung bestätigten Progress bzw. des Datums des letzten follow-ups (FUP)/ Abbruchs der Studie.

4.2 Probenaufarbeitung

4.2.1 Extraktion von MNCs aus Heparin-Vollblut

Nach Verdünnung des heparinisierten Vollblutes 1:2 mit sterilem PBS (sterile Phosphat-gepufferte Saline, Biochrom AS, Berlin, Deutschland) wurden jeweils 35 ml vorsichtig über 15 ml sterile Ficoll-Lösung (Biochrom AS, Berlin, Deutschland) in 50 ml Falcon® tubes (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) geschichtet und anschließend für 15 Minuten bei 850 g (~2000 rpm) und 20° C ohne Unterbrechung zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden der Röhrchen, während mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) als Interphase auf der Ficoll-Hypaque-Phase unter der PBS-Plasma-Phase verblieben. Anschließend wurden die mononukleären Zellen vorsichtig aus der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Lösung (Biochrom AS, Berlin, Deutschland, Dichte 1,0077) abpipettiert und die MNC-Bande aus den 4 Falcon® tubes in zwei 50 ml Falcon® tubes überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (Biochrom AS, Berlin, Deutschland) gewaschen und in Portionen von 1-2 x 10⁷ Zellen in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 40% fötalem Kälberserum (Biochrom AS, Berlin,

Deutschland), 10% DMSO (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 50% RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biochrom AS, Berlin, Deutschland) in speziellen Boxen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bei -80° C eingefroren.

4.3 FACS-Analyse (fluorescence activated cellscanning) / Durchflusszytometrie

In einer FACS-Analyse kann man Zellen in einem Ansatz auf unterschiedliche Eigenschaften untersuchen. So kann die Größe der Zellen (FSC), ihre Granularität (SSC) und weitere unterschiedliche individuelle Eigenschaften durch Anfärben mit markierten Antikörpern gezeigt werden. Als FACS-Puffer wurde eine Lösung aus PBS (Biochrom AS, Berlin, Deutschland) und 0,5%igem BSA (bovines Serum-Albumin, Serva, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

4.3.1 Reagenzien, Positiv- und Negativkontrolle

4.3.1.1 Golgi-Stop

Durch Zugabe des Golgi-Stop™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), bestehend aus Monsenin, einem Polyether-Antibiotikum isoliert aus *Streptomyces cinnamomensis*, wurden die intrazellulären Protein-Transport-Prozesse der Zellen blockiert. Dies führte zu einer Akkumulation von Zytokinen im Golgi-Apparat. Der Anstieg der akkumulierten Zytokine in der Zelle erhöhte die Detektierbarkeit der Zytokin-produzierenden Zellen in der Durchflusszytometrie.

4.3.1.2 Fixations-/Permeabilisierungs-Kit

Durch Zugabe des Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurde die Fixierung und Permeabilisierung von Zellen ermöglicht, das für die Färbung der intrazellulären Zytokine mit Fluorochrom-markierten Anti-Zytokin-Antikörpern nötig war.

4.3.1.3 Positiv-Kontrolle-PMA

Als Stimulanz in der Positiv-Kontrolle wurde Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 500x, Ebioscience, Frankfurt am Main, Deutschland), ein potenter Aktivator der Proteinkinase C,

der an die C1-Domäne der Proteinkinase C bindet und die Membran-Translokation sowie die Enzymaktivierung induziert, verwendet.

4.3.1.4 *Negativkontrolle-HIV*

Als Negativkontrolle benutzten wir ein irrelevantes HLA-A*0201-bindendes HIV-Peptid.

4.3.1.5 *WT1-Peptid* 126-134

Die Sequenz RMFPNAPYL des WT1-Peptids entspricht dem als T-Zellepitop des Genprodukts des Wilms-Tumoren-1-identifizierten HLA-A*0201 bindenden Peptids. Bezogen wurde das WT1-Peptid (Clinalfa®) von der Bachem AG, Bubendorf, Schweiz.

Das Peptid ist als Lyophilisat in Ampullen in einer Konzentration von 200µg pro Ampulle abgefüllt. Das Peptid wird in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst.

4.3.1.6 *GM-CSF (Leukine®)*

GM-CSF (Leukine® Essex Pharma, Deutschland) verstärkt die Immunogenität des WT1-Peptids und dient ebenfalls als Adjuvant zur Induktion einer schnelleren Immunantwort.

4.3.1.7 *KLH (Vacmune®)*

KLH (Keyhole limpet hemocyanin *Megathura crenulata*, Vacmune®, Biosyn, Salzburg, Österreich), ist ein hochmolekulares Glykoprotein und dient als Trägermolekül für Antigene. KLH ist hoch immunogen und stimuliert die Migration und Aktivierung von dendritischen Zellen, ohne eine unerwünschte Immun-Antwort zu induzieren.

4.3.2 FACS-Antikörper

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Antikörper nutzten wir überwiegend von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland (alternative Anbieter werden explizit benannt).

Tabelle 3: Panel 1. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ und Zytokine

Antikörper	Menge in µl	Konjugat
CD3	4	PerCP
CD8	4	PE
CD4	1,5	APC-H7
IL-2	8	FITC
TNF alpha	1	Pe-Cy7
IFN gamma	1,5	APC

Tabelle 4: Panel 2. T_{reg} , PD-L1, PD-1, TNFRSF9

Antikörper	Menge in μ l	Konjugat
CD3	2	Amcyan
CD25	5	PE
CD4	2	APC-H7
CD137	5	PerCP-Cy5
CD127	5	FITC
CD279	2	Pe-Cy7
Cd274	3,5	APC

Tabelle 5: Panel 3. MDSCs

Antikörper	Menge in μ l	Konjugat
CD11b	2	Pe-Cy-7
HLA-DR	5	PE
CD14	5	APC
CD19	5	FITC
CD3	5	FITC
CD56	2	FITC

Tabelle 6: Panel 4. WT1-Peptid-Mix

Antikörper	Menge in μ l	Konjugat
WT1-Tetramer	1	APC
CD3	4	PerCp
CD8	4	PE

4.3.3 Panel 1

Die Zellen wurden einen Tag vor der FACS-Analyse schonend aufgetaut. Sieben Stunden nach Auftauen der Zellen im Kulturmedium im Brutschrank mit 5% CO₂ und bei 37° C folgte die Stimulation der Zellen in drei verschiedenen Ansätzen mit 1.) PMA 1:10 00 als Positivkontrolle, 2.) HIV 100 μ g/ml (1:10 Endverdünnung von der Stammlösung ~ 10 μ g/ml) als Negativkontrolle und 3.) dem WT1-Peptid (10 μ g/ml). Eine Stunde später erfolgte die Zugabe des Golgi-StoppsTM (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) 1:1500 und eine Inkubation

für eine Stunde. Am darauffolgenden Tag wurde die Zellen für das Panel 1 (siehe Materialteil), die mit PMA, HIV und WT1 stimuliert wurden, auf eine 96er Wellplatte aufgetragen. Die Zellsuspension wurde mit dem entsprechenden Antikörper/PBS-Gemisch (siehe Materialteil) versetzt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von Cytofix/Cytoperm 50 µl (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zur Permeabilisierung und die Proben wurden für 20 Minuten dunkel und auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 50 µl Perm/Wash Puffer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) versetzt und im Anschluss bei 300 g für 6 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl Antikörper/PBS-Gemisch auf die Zellpallets pro Well gegeben und für 20 Minuten dunkel und auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 300 g für 6 Minuten zentrifugiert und im Anschluss wurden 200 µl PBS/BSA appliziert. Danach folgte die sofortige FACS-Analyse.

4.3.4 Panel 2-3

Die in Kulturmedium gelagerte Zellsuspension wurde wie bereits für das Panel 1 beschrieben aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Well wurden 50 µl Antikörper/PBS-Gemisch (siehe Materialteil) auf die Zellen gegeben, anschließend für 20 Minuten dunkel auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 300 g für 6 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl PBS/BSA und die sofortige FACS-Analyse.

4.3.5 WT1-Panel

Die in Kulturmedium gelagerte Zellsuspension wurde wie bereits für das Panel 1 beschrieben aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Well wurden zunächst 0,7 µg WT1-Tetramere zu der Zellsuspension hinzugefügt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension für 20 Minuten dunkel auf Eis inkubiert und im Anschluss erneut bei 300 g für 6 Minuten zentrifugiert. Danach folgte die Zugabe von 200 µl PBS/BSA und die sofortige FACS-Analyse.

4.3.6 Messung und Daten-Analyse

Bei allen Versuchen erfolgte die Messung noch am selben Tag mit dem BD FACS Canto™ Flow Cytometer mit der BD FACS Diva Software Version 6.1.3. Die Daten-Analyse erfolgte mit der FlowJo-Software (Ashland, Oregon, USA). Die Validierung der FACS-Methode erfolgte im inter- und intraindividuellen Vergleich sowie anhand der Positiv- und Negativkontrolle. Zur Auswertung der Probe wurde die folgende Auswertungsstrategie angewandt (siehe Abbildung 3): Zunächst wurden nur kleine Lymphozyten (Gate I) nach Ausschluss toter Zellen berücksichtigt. Von dieser Population wurden dann die CD3⁺CD8⁺ T-Zellen herausgefiltert (Gate II). WT1-spezifische T-Zellen wurden als CD8⁺Tetramer⁺T-Zellen, bezogen auf CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (Gate III), kalkuliert.

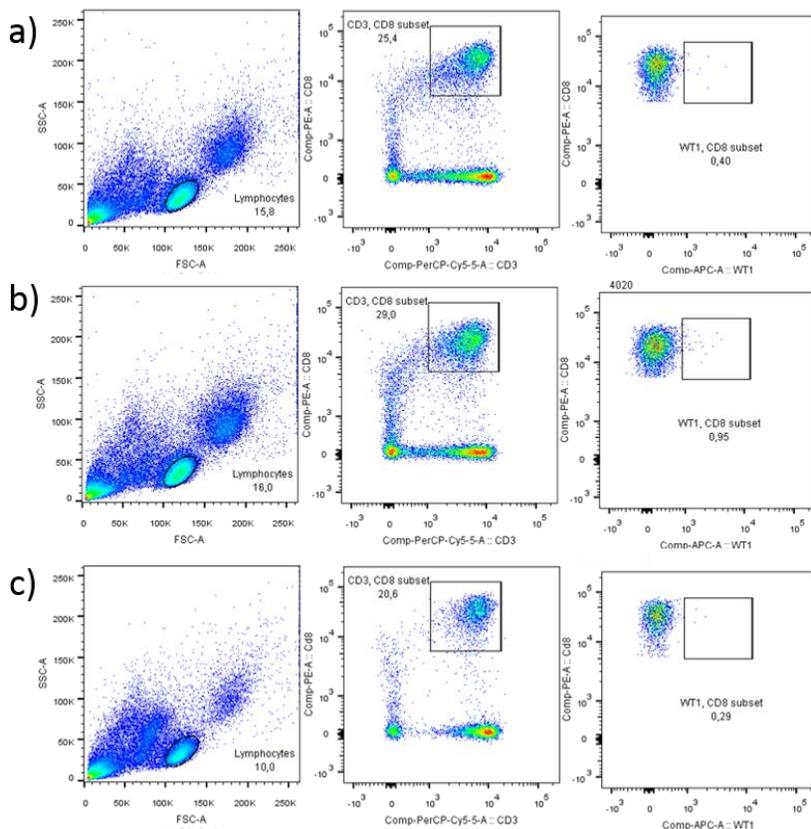


Abbildung 3: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der CD8⁺WT1-spezifischen T-Zellen; I) Lymphozyten gate, II) CD3⁺CD8⁺, III) CD8⁺WT1⁺, a) Baseline, b) Zeitpunkt 1, c) Zeitpunkt 2

Für die Auswertung der Zytokin-Antworten wurden kleine Lymphozyten nach Herausfilterung toter Zellen und „gaten“ auf CD3⁺ T-Zellen herausgefiltert. Daraufhin wurde

diese Population in CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen und in CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen eingeteilt .Als letzter Schritt wurden von CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen und von den CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen die Zytokin-Antworten (TNF α , IFN γ und IL-2) gemessen.

4.4 Statistische Methoden

Es erfolgte ein statistischer Vergleich aller Patienten bezüglich der Induzierbarkeit der T-Zellantworten. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Student T-Test (bei Normalverteilung) für den Vergleich der Baseline-Werte mit den ermittelten Werten zum Zeitpunkt 1 (Woche 6) und Zeitpunkt 2 (Woche 10) gewählt. Erhobene Werte ohne Normalverteilung wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests ausgewertet. Alle anderen statistischen Vergleiche müssen als rein deskriptiv angesehen werden. Die statistische Analyse wurde mithilfe der SigmaStat 3.5 Software (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Daten

5.1.1 Patienten-Charakteristika

Zwischen Februar 2005 und November 2015 wurden insgesamt 14 Patienten in die WT1-Vakzinierungsstudie eingeschlossen. Alle Patienten hatten eine solide Tumorerkrankung und 13/14 Patienten hatten vor Eintritt in die Studie mindestens eine vorherige Chemotherapie erhalten. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 57 Jahre.

Weitere Patienten-Charakteristika sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Pat.Nr.	Alter (J)	Geschlecht	Tumor-Entität	Metastasen	Therapielinie	Vortherapien
1	49	w	Th-CA	P, ZNS	2 L	Op, Rj
2	47	w	BC-CA	Cu, L	>5 L	E, Do, Her, 5-FU, To, Cp, Vi, Vacc
3	60	w	OV-CA	L	5 L	Cap/Pa, To, Do, Cp, Mi
4	45	w	OV-CA	Pe	4 L	C/Cp, Cp, To, other
5	63	w	OV-CA	O, L, He	>5 L	Cap/Pa(2x), Ge, Tr, Do, Cp/C, To
6	64	w	Th-CA	P, L	1 L	Do
7	53	w	OV-CA	Pe	3 L	E/Cp, Cap/Pa(2x), Do
8	52	w	OV-CA	Pe, Cu	2 L	Cap/Pa (2x), DMXAA
9	52	w	Astrozytom	keine	2 L	St, Te
10	66	w	OV-CA	Pe, L	1 L	Cap/Pa
11	64	w	OV-CA	Pe	3 L	Cap/Pa, Cap/Ge, HIPEC
12	72	m	Pleura-Mes	keine	keine	keine
13	60	m	Pleura-Mes	keine	2 L	Vi, Cap
14	52	w	Pleura-Mes	keine	3 L	Cp/Vi, Cap/Pe, Vi

Tabelle 7: Patienten-Charakteristika

J = in Jahren, NA = nicht angegeben; Tumor-Entität: BC-CA = Mamma-Ca, OV-CA = Ovarial-Ca, Pleura-Mes = Pleura-Mesotheliom, Th-CA = Schilddrüsen-CA

Metastasen: P = pulmonal, ZNS = zentrales Nervensystem, Cu = kutan, L = lymphogen, O = ossär, He = hepatisch, Pe = peritoneal

Therapielinie und Vortherapien: L = Anzahl der vorherigen Therapielinien, E = Epirubicin, Pa = Paclitaxel, Do = Doxorubicin, Her = Herceptin, 5-FU = 5-Fluorouracil, Vacc. = Vakzinierung, Cap = Carboplatin, Ge = Gemcitabine, Tr = Treosulfan, Cp = Cisplatin, To = Topotecan, other = andere Therapieform, HIPEC = hypertherme intraperitoneale Chemoperfusion, Vi = Vinorelbine, Pe = Pemetrexed, Rj = Radiojodtherapie, Mi = Mitoxantron, C = Cyclophosphamid, Te = Temozolomid, St = Strahlentherapie, Op = Operation

5.1.2 Impfprotokoll und Toxizität

Die Anzahl der Vakzinierung betrug im Median 10 Impfungen mit einer Spanne von 2 bis 35 Impfungen. Ein Patient mit Pleuramesotheliom ist seit 2008 bis zum heutigen Zeitpunkt unter Therapie mit WT1-Vakzinierung. Sechs Patienten erhielten weniger als 10 Impfungen aufgrund eines schnellen Krankheitsprogresses. Bei einer Patientin mit Ovarialkarzinom musste die Therapie nach zweimaliger Gabe aufgrund eines schnellen Krankheitsprogresses mit einem PFS von nur 20 Tagen abgebrochen werden. Die am häufigsten beobachteten Toxizitäten waren Injektionsreaktionen, vor allem vorübergehende Erytheme und knotige Verhärtungen an der Einstichstelle. Weitere Nebenwirkung waren grippeähnliche Symptome und ein allgemeines Schwächegefühl. Darüber hinaus traten Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Fieber, Urtikaria, Diarrhoe, eine oberflächliche Beinvenenthrombose, Gewichtsverlust und ein Harnwegsinfekt auf. Unter allen Patienten traten weder hepatische noch renale Toxizitäten auf.

5.1.3 Assoziation zwischen Immunologischen Analysen und klinischen Verläufen

Analyse des potenziellen Zusammenhangs der (chemotherapeutischen) Vorbehandlung zur Tumorlast und zur Tumorentität im klinischen Zusammenhang.

Von den 14 Patienten, die im Rahmen der Studie mit WT1-Peptid behandelt wurden, hatten 3 Patienten bei Studieneinschluss eine komplette Remission (CR), 3 Patienten eine partielle Remission (PR), 2 Patienten eine stabile und 6 Patienten eine progrediente Tumorerkrankung.

Gemäß der klassischen Bewertungskriterien konnte ein durchschnittliches progressionsfreies Überleben von 359 Tagen bei den Patienten beobachtet werden. Das progressionsfreie Überleben der Patienten ist in Abbildung 4 dargestellt.

Progressionsfreies Überleben

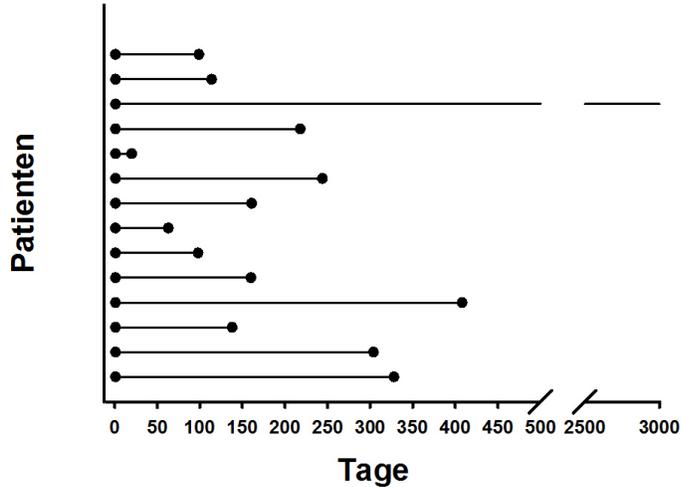


Abbildung 4: Progressionsfreies Überleben in Tagen; Patienten aufsteigend geordnet nach Eintritt in die Studie

Da es sich bei unseren Patienten um eine heterogene Gruppe an Entitäten handelte, berichten wir getrennt über die einzelnen Patientengruppen.

Patientinnen mit Ovarialkarzinom:

Insgesamt wurden sieben Patientinnen mit Ovarialkarzinom in die Vakzinierungsstudie mit WT1 eingeschlossen.

Pat. 3: Eine 60jährige Patientin mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss und lymphogener Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor 3 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Unter der Vakzinierung zeigte sich eine stabile Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 138 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 rückläufig waren.

Pat. 4: Eine 45jährige Patientin mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss mit Peritonealkarzinose, pararektalen Metastasen und malignem Pleuraerguss. Die Patientin hatte zuvor vier Therapielinien erhalten. Es kam unter der Vakzinierung zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 408 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT-1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1

rückläufig waren.

Pat. 5: Eine 63jährige Patientin mit ossärer, lymphogener und hepatischer Metastasierung bei Studieneinschluss. Die Patientin hatte zuvor mehr als 5 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Es kam es zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 160 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos.T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 rückläufig waren.

Pat. 7: Eine 53jährige Patientin mit geringer Tumorlast und peritonealer Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor 3 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Es kam zu einem Krankheitsprogress mit einem progressionsfreien Überleben von 63 Tagen. Vor der Vakzinierung waren keine WT1-pos.T-Zellen nachweisbar.

Pat. 8: Eine 52jährige Patientin mit peritonealer und kutaner Metastasierung bei Studieneinschluss. Die Patientin hatte zuvor 2 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Es kam zu einem Krankheitsprogress mit einem progressionsfreien Überleben von 161 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos.T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 zunächst rückläufig waren, zum Zeitpunkt 2 allerdings anstiegen.

Pat. 10: Eine 66jährige Patientin mit geringer Tumorlast und peritonealer und lymphogener Metastasierung bei Studieneinschluss. Die Patientin hatte zuvor 1 Therapielinie erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Unter der Vakzinierung mit WT1 kam es zu einem Krankheitsprogress mit einem progressionsfreien Überleben von nur 20 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Therapie nahezu stabil blieben.

Pat. 11: Eine 64jährige Patientin mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss und peritonealer Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor 3 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss eine partielle Remission. Es kam es zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 218 Tagen. Vor der Vakzinierung waren keine WT1-pos. T-Zellen nachweisbar.

Patienten/-innen mit Pleuramesotheliom:

Pat. 12: Ein 72jähriger Patient mit postoperativem residuellen Tumornachweis bei Studieneinschluss. Der Patient hatte zuvor keine medikamentöse Therapie erhalten. Bei Studieneinschluss bestand eine partielle Remission. Es kam zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben bis zum jetzigen Zeitpunkt, damit zu einer anhaltenden Krankheitsstabilisierung von >130 Monaten. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar. Abbildung 5 zeigt den kontinuierlichen Anstieg der WT1-Tetramere die unter der Vakzinierungstherapie ab Zeitpunkt 2 kontinuierlich anstiegen.

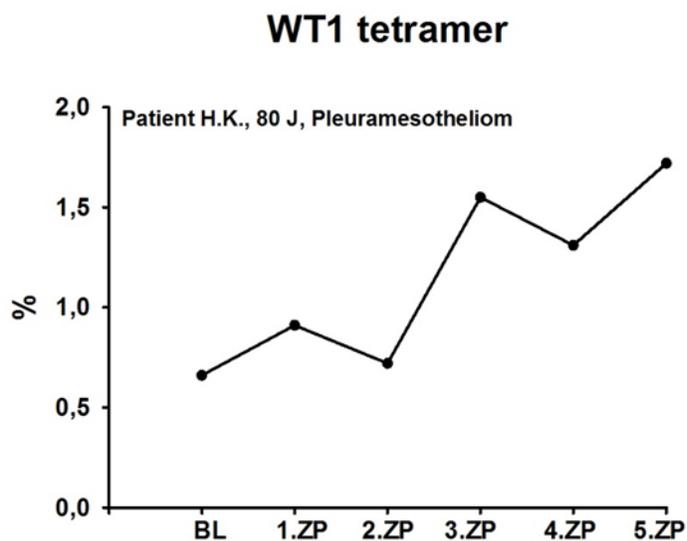


Abbildung 5: WT1-Tetramer-Verlauf des Patienten H.K. BL = Baseline, ZP = Zeitpunkt

Pat. 13: Ein 60jähriger Patient mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss ohne Angabe von Metastasierung. Der Patient hatte zuvor 2 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss eine komplette Remission. Es kam zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 114 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zunächst anstiegen, zum Zeitpunkt 2 jedoch sanken.

Pat. 14: Eine 52jährige Patientin mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss ohne Angabe von Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor 3 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss eine stabile Erkrankung. Es kam zu einer stabilen Erkrankung mit einem progressionsfreien Überleben von 99 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos.

T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 zum Zeitpunkt 1 stabil waren und zum Zeitpunkt 2 anstiegen.

Patienten/-innen mit Schilddrüsenkarzinom:

Pat. 1: Eine 49jährige Patientin mit pulmonaler und zerebraler Metastasierung bei Studieneinschluss. Die Patientin war Z.n. Thyreoidektomie und Radiatio und hatte unter der Vakzinierungstherapie eine PR, die in in einem progressionsfreien Überleben von 328 Tagen resultierte. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 rückläufig waren. Abbildung 6 zeigt den Rückgang der pulmonalen Metastasen der beschriebenen Patientin vor Beginn der Therapie und nach 6 Impfungen.

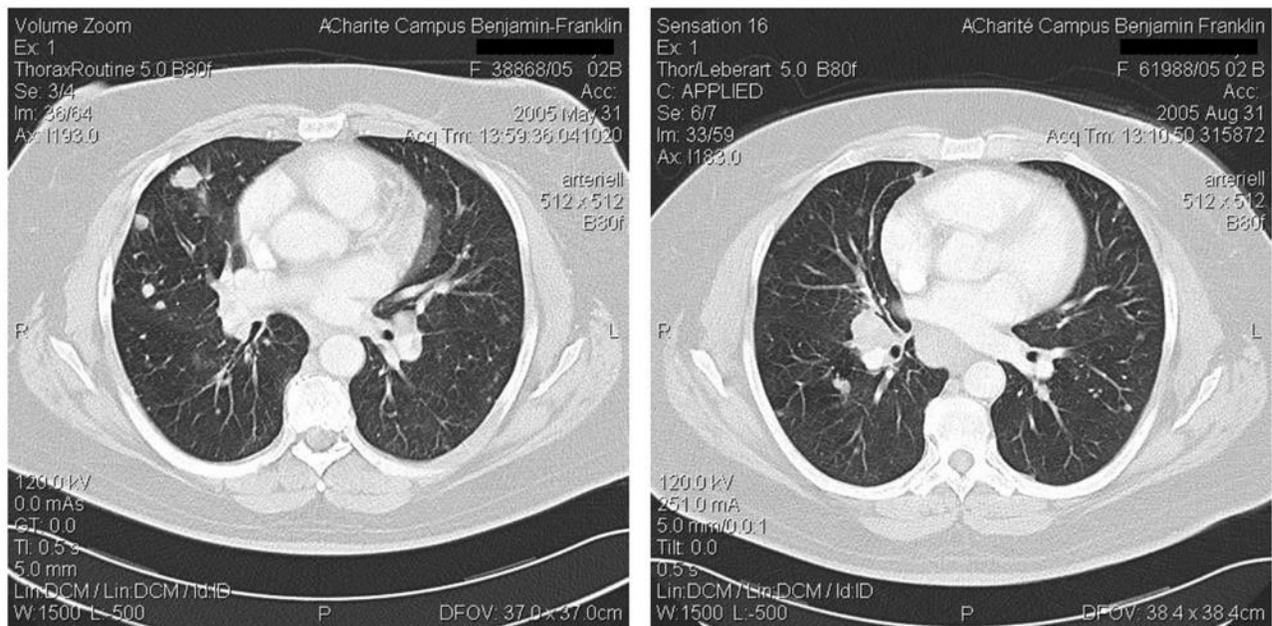


Abbildung 6: CT-Thorax des Patienten 1. Links: vor der WT1-Vakzinierung; rechts: Therapieansprechen nach 6 Impfungen

Pat. 6: Eine 64jährige Patientin mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss mit pulmonaler und lymphogener Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor 1 Therapielinie erhalten und bei Studieneinschluss einen Krankheitsprogress. Es kam zu einem Krankheitsprogress mit einem progressionsfreien Überleben von 98 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 rückläufig waren.

Patientin mit Mammakarzinom:

Pat. 2: Eine 47jährige Patientin mit kutaner und lymphogener Metastasierung bei Studieneinschluss. Die Patientin hatte zuvor mehr als 5 Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss eine stabile Erkrankung. Unter der Vakzinierung hielt die stabile Erkrankung zunächst an. Das progressionsfreie Überleben lag bei 304 Tagen. Bereits vor der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 kontinuierlich anstiegen.

Patientin mit Astrozytom:

Pat. 9 : Eine 52jährige Patientin ohne nachweisbare Tumorlast bei Studieneinschluss und ohne Angabe von Metastasierung. Die Patientin hatte zuvor zwei Therapielinien erhalten und bei Studieneinschluss eine komplette Remission. Es zeigte sich eine anhaltende CR mit einem progressionsfreien Überleben von 244 Tagen. Bereits vor Beginn der Vakzinierung waren WT1-pos. T-Zellen nachweisbar, die unter der Vakzinierung mit WT1 rückläufig waren.

5.2 Immunologischer Status nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptidmix

5.2.1 Analyse der T-Zell-Antwort nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid

Von 12 der insgesamt 14 Patienten konnten wir die Analyse der WT1-Tetramer⁺-T-Zell-Antwort sowohl zur Baseline als auch zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 durchführen. Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie konnten bei allen Patienten WT1-Tetramer⁺-T-Zellen mit einem Mittelwert von 0,73% nachgewiesen werden. Die WT1-Tetramer-Analyse ist in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Eine Induktion der T-Zellantwort im Laufe der WT1-Vakzinierung werteten wir dann als positiv, wenn es mindestens zu einem zweifachen Anstieg der Frequenzen im Vergleich zur Baseline kam. Dies war der Fall bei folgenden Patienten: Patienten 11 und 13 zeigten bereits zum Zeitpunkt 1 einen Anstieg der WT1-Tetramer⁺-T-Zellen von 0,19% auf 0,93% und von 0,40% auf 0,95% respektive.

Bei Patienten 2, 11 und 14 kam es zum Zeitpunkt 2 zu einem Anstieg der WT1-Tetramer⁺-T-Zellen von 0,30% auf 0,61%, von 0,19% auf 0,49% und von 0,59% auf 1,31%. Zu Zeitpunkt 2 war das Therapieende für 2 Patienten bereits erreicht.

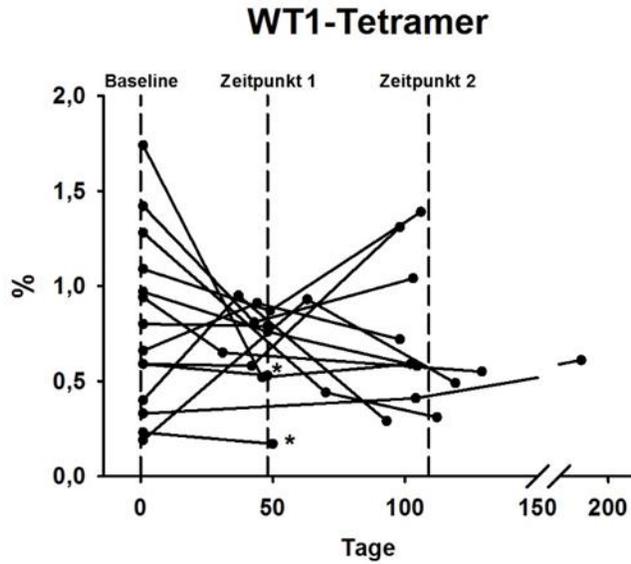


Abbildung 7: WT1-Tetramer-Analyse in Prozent (%) zu Baseline, Zeitpunkt 1 und 2

* = Behandlungsende

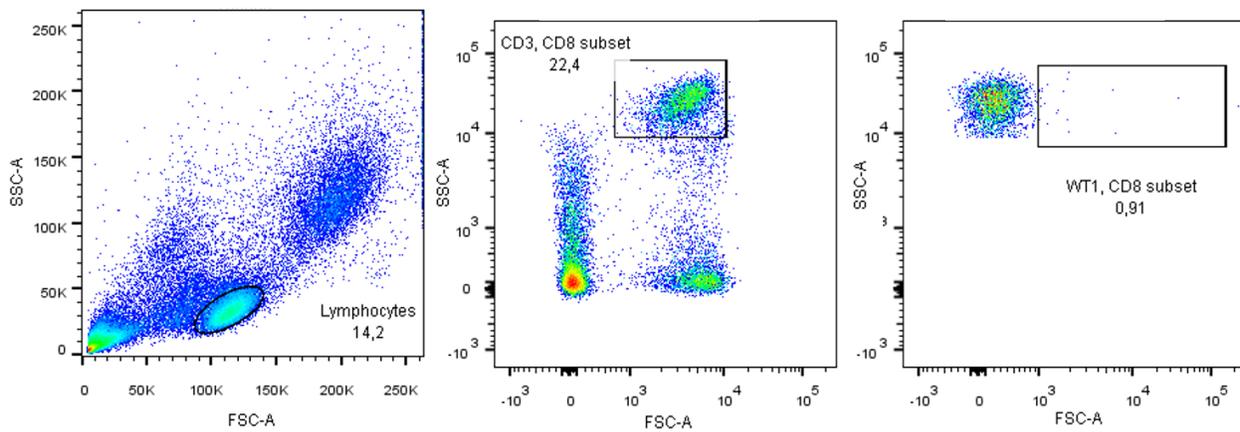


Abbildung 8: Tetrameranalyse im peripheren Blut

Repräsentative Durchflusszytometrie-Analyse in Patient 12. Lymphozyten wurden auf CD3⁺ und CD8⁺T-Zellen gated. WT1-spezifische T-Zellen wurden als CD8⁺Tetramer⁺T-Zellen (Prozent) kalkuliert. FSC-A: Forward Scatter Analyse; SSC-A: Sideward Scatter Analyse

5.2.2 Frequenzen WT1-spezifischer zytokinproduzierender CD8⁺T-Zellen (Panel 1)

Die Immunantwort werteten wir dann als positiv, wenn der Prozentsatz an WT1-Peptid-spezifischen Zytokin-produzierenden CD3⁺ und CD8⁺T-Zellen mindestens doppelt so hoch wie der in der HIV-stimulierten Negativ-Kontrolle war.

5.2.2.1 TNF α

Wir untersuchten sowohl zur Baseline, als auch zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 die intrazelluläre Freisetzung von TNF α nach WT1-Peptidvakzinierung. Bei insgesamt 3/14 Patienten konnten wir bereits zur Baseline in 0,52 %, 2,55 % und 5,02% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellpopulation eine Freisetzung von TNF α nachweisen.

Zum Zeitpunkt 1 zeigte sich bei 3/14 Patienten in 0,64%, 0,90% und 2,21% (Mittelwert 0,90%) der CD3⁺CD8⁺-T-Zellpopulation eine Freisetzung von TNF α .

Zum Zeitpunkt 2 konnte bei 1/14 Patienten in 0,26% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellpopulation eine Freisetzung von TNF α nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Freisetzung von TNF α in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen ist in der Abbildung 9 dargestellt.

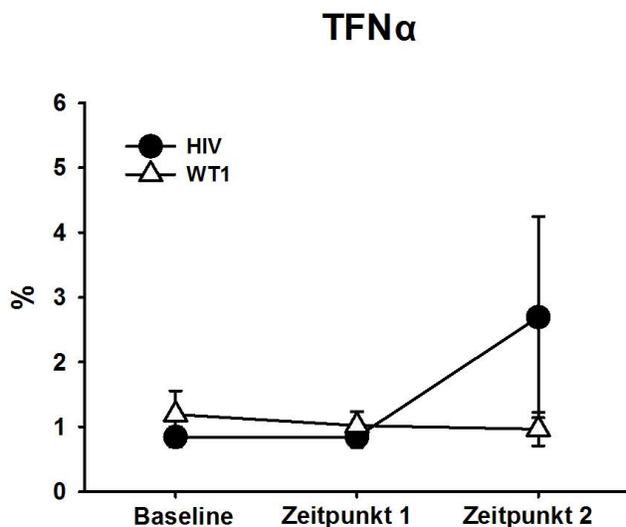


Abbildung 9: Mittelwerte der intrazellulären Freisetzung von TNF α nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2; HIV = Negativkontrolle

5.2.2.2 IL-2

Wir untersuchten zur Baseline, zu Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 die intrazelluläre Freisetzung von IL-2 nach WT1-Peptidvakzinierung.

Zur Baseline konnten wir bei 6/14 Patienten in 0,08%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,68% und 47,00% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellpopulation eine Freisetzung von IL-2 nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt 1 konnte bei 6/14 Patienten in 0,13%, 0,20%, 0,26%, 0,33%, 0,38%, und 0,69% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen eine Freisetzung von IL-2 nachgewiesen werden. Bei 3 dieser Patienten persistierte dabei die Zytokin-Antwort von Zeitpunkt 1, bei 3 Patienten zeigte sich eine neue Induktion einer IL-2-Antwort. Zum Zeitpunkt 2 konnte lediglich noch bei 2/14 Patienten in 0,28% und 0,33% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellpopulation eine positive Zytokinantwort festgestellt werden, die bereits zur Baseline und an Zeitpunkt 1 vorhanden war. Die Einzelwerte des prozentualen Anteils der intrazellulären Freisetzung von IL-2 der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen zu drei Zeitpunkten sind in Abbildung 10 dargestellt.

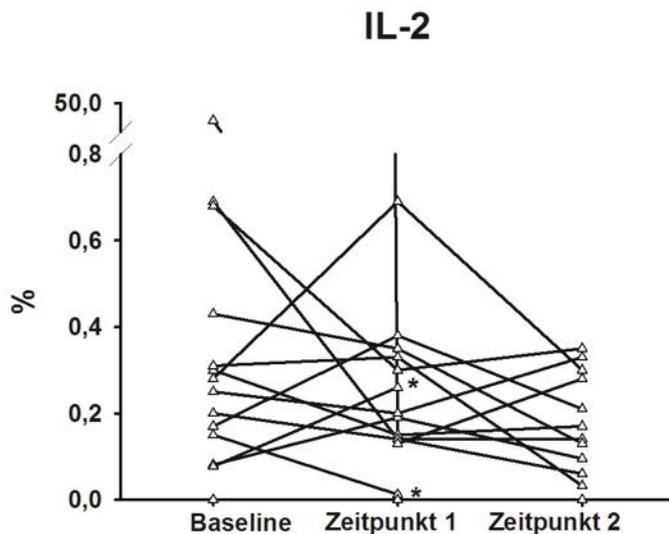


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der intrazellulären Freisetzung von IL-2 nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen zu drei Zeitpunkten: Baseline, Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. * = Behandlungsende

5.2.2.3 IFN γ

Wir untersuchten zur Baseline sowie zu Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 die intrazelluläre Freisetzung von IFN γ nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺T-Zellen. Zur Baseline konnte bei 3/14 Patienten in 0,82%, 2,20% und 4,53% der CD3⁺CD8⁺T-Zellpopulation die Freisetzung von IFN γ nachgewiesen werden.

Zum Zeitpunkt 1 konnten wir bei 2 dieser Patienten in 0,42% und 1,78% (Mittelwert 1,10%) der CD3⁺CD8⁺T-Zellpopulation eine anhaltende positive Zytokin-Antwort nachweisen. Zu Zeitpunkt 1 kam es bei den anderen Patienten zu keiner neuen Induktion der IFN γ -Freisetzung.

Zum Zeitpunkt 2 konnte bei 2/14 Patienten in 0,49% und 2,89% (Mittelwert 1,69%) der CD3⁺CD8⁺T-Zellpopulation die Freisetzung von IFN γ nachgewiesen werden, bei 1 dieser Patienten handelte es sich hierbei um eine anhaltende positive Zytokin-Antwort. Die Mittelwerte der intrazellulären Freisetzung von IFN γ nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺T-Zellen zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 sind in Abbildung 11 dargestellt.

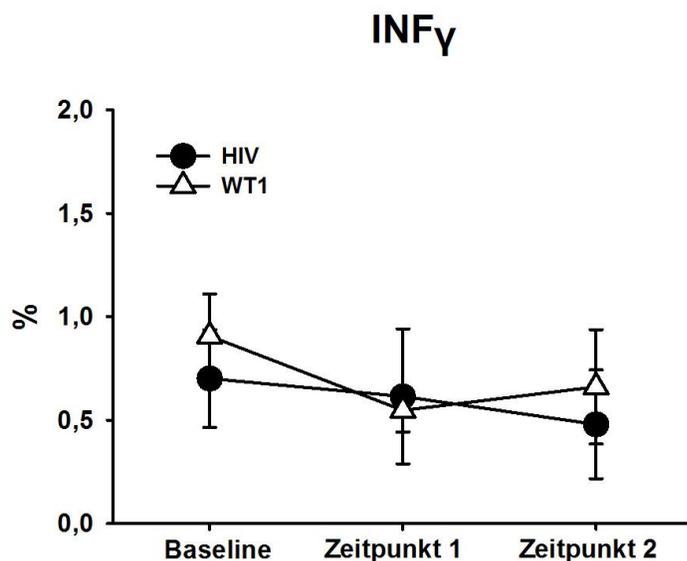


Abbildung 11: Mittelwerte der intrazellulären Freisetzung von IFN γ nach WT1-Peptidvakzinierung in Prozent (%) der CD3⁺CD8⁺T-Zellen zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. HIV = Negativkontrolle

Bei insgesamt 2/14 Patienten (Patienten 6 und 8) sahen wir während der WT1-Vakzinierung eine Induktion sowohl der intrazellulären TNF α -, als auch der IL-2-Ausschüttung. Patient 12 zeigte im Verlauf eine Induktion der intrazellulären IL-2 und IFN γ -Ausschüttung. Bei 2/14 Patienten (Patienten 11 und 14) konnten wir im Verlauf die Induktion und die intrazelluläre Freisetzung aller drei Zytokine aufzeigen. Für die statistische Auswertung wurde jeweils der prozentuale Anteil der CD8⁺IFN γ ⁺/TNF α ⁺ /IL-2⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD8⁺T-Zell-Population verwendet.

5.2.3 Analyse des Aktivierungsmarkers CD137 auf CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻T-Zellen (Panel 2):

Wir untersuchten die CD4⁺ und CD4⁻ (repräsentieren die CD8⁺T-Zellen) T-Zellen auf das Vorkommen des Aktivierungsmarkers CD137 nach den im Methodenteil beschriebenen Färbetechniken.

CD137, ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie wird sowohl auf CD4⁺-, CD8⁺-, aktivierten T-Zellen sowie auf NKs, dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert. Durch die Modulation des Tumormikromilieus ist es in der Lage, die Immunreaktion auf einen Tumor zu verstärken. ⁽⁹³⁾

Die Frequenzen der CD4⁺CD137⁺T-Zellen und CD4⁻CD137⁺T-Zellen werden als Prozent innerhalb der CD3⁺T-Zellpopulation dargestellt.

CD4⁺CD137⁺T-Zellen:

Der prozentuale Anteil der CD4⁺CD137⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zur Baseline, zu Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ist in Abbildung 12 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten bei allen Patienten WT1-spezifische CD4⁺CD137⁺T-Zellen mit einem Mittelwert von 1,31% nachgewiesen werden. Bei 10/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺T-Zellen mit einem Mittelwert von 1,25%. Zum Zeitpunkt 2 kam es bei 8/14 Patienten zu einem Anstieg der WT1-spezifischen

CD4⁺CD137⁺T-Zellen mit einem Mittelwert von 1,54%. Bei 2/14 Patienten war zum Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht.

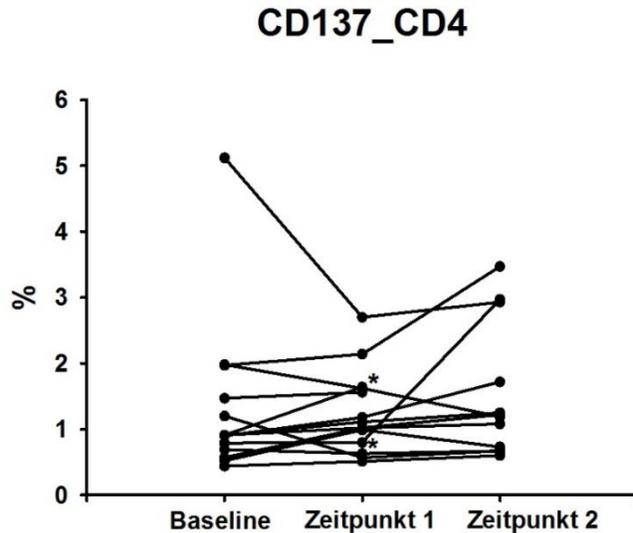


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD137⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 1,31±1,12%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 1,25±0,58%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 1,54±0,93%) * = Behandlungsende

CD4⁺CD137⁺T-Zellen:

Wir analysierten den prozentualen Anteil der CD4⁺CD137⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺T-Zell-Population zur Baseline, zu Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. Das Gating auf CD4⁺-T-Zellen stellte sich hierbei als optimale Darstellung zur Analyse der CD8⁺-T-Zellen dar. Der prozentuale Anteil ist in Abbildung 13 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten bei allen Patienten WT1-spezifische CD4⁺CD137⁺T-Zellen mit einem Mittelwert von 2,28% nachgewiesen werden. Bei 6/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺-T-Zellen mit einem Mittelwert von 2,04%. Bei 7/14 der Patienten kam es zum Zeitpunkt 2 zu einem Anstieg der WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺T-Zellen mit einem Mittelwert von 2,22%.

Bei 2/14 Patienten war zum Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht.

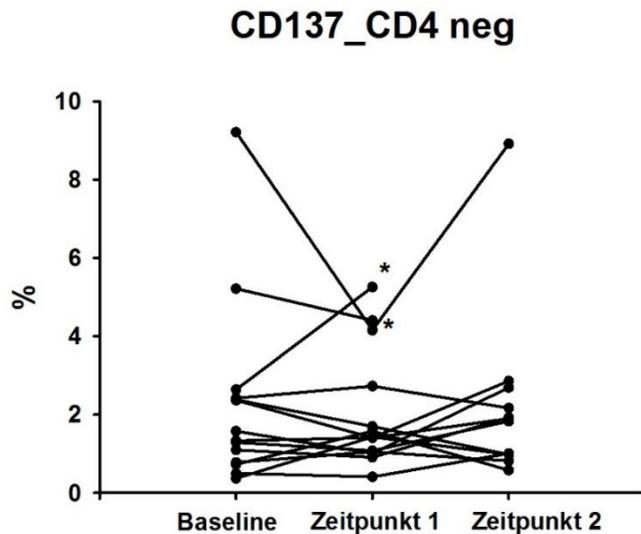


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD137⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 2,28±2,19%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 2,04±1,40%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 2,22±2,06%). * = Behandlungsende

5.2.4 Analyse der T_{reg}-Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2):

Regulatorische CD4⁺T-Zellen spielen eine Rolle in der Balance zwischen Immunität und Toleranz. Eine Dysregulation in der Entwicklung oder ein Funktionsverlust führt zu unkontrollierten Immunantwort, Zellschädigung und Autoimmunität.⁽⁹⁴⁾

Wir analysierten die Frequenzen von CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} im PB der Patienten sowohl zur Baseline, als auch zum Zeitpunkt 1 und 2 nach Vakzination mit dem WT1-Peptid.

Für die statistische Auswertung wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ innerhalb der CD3⁺ T-Zellpopulation verwendet.

CD4⁺CD25⁺CD127⁻T_{regs}:

Der prozentuale Anteil der CD4⁺CD25⁺CD127⁻T_{regs} innerhalb der CD3⁺T-Zell-Population zur Baseline, zu Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ist in Abbildung 14 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten bei allen Patienten CD4⁺CD25⁺CD127⁻T_{regs} mit Frequenzen von 2,49%-8,22% (Mittelwert 5,46±1,53%) der CD3⁺T-Zell-Population nachgewiesen werden. Bei 10/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der CD4⁺CD25⁺CD127⁻

T_{regs} mit Frequenzen von 3,35-10,40% (Mittelwert 6,09±2,13%). Bei 10/14 Patienten kam es zu einem Anstieg der CD4⁺CD25⁺CD127⁻T_{regs} zum Zeitpunkt 2 mit Frequenzen von 3,50% - 11,10 % (Mittelwert 6,51±1,79%). Bei 2 Patienten war zu Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht. Es zeigte sich insgesamt eine trendweise Erhöhung der Frequenzen der CD4⁺CD25⁺CD127⁻T_{regs} (p= 0,06, versus Baseline).

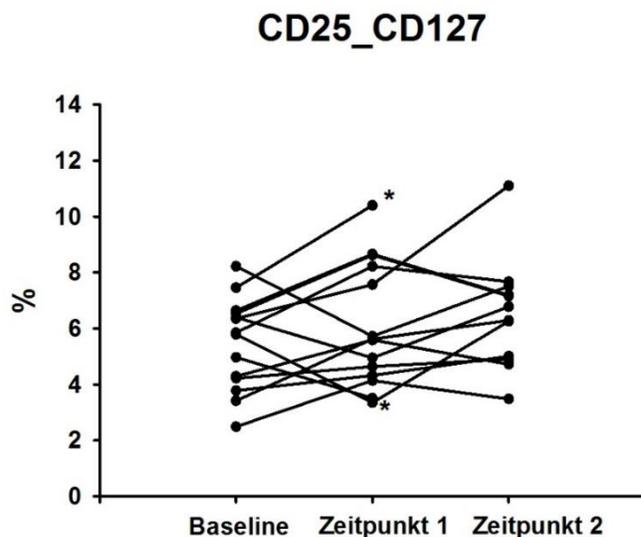


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD25⁺CD127⁻T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 5,46%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 6,09%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 6,51%). * = Behandlungsende

5.2.5 Analyse der CD4⁺CD279⁺-(PD1-)Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2):

PD-1 (programmed death 1 receptor; CD279) wird auf peripheren CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Eine anhaltende Expression induziert eine T-Zellerschöpfung, die mit dem Verlust der Effektorfunktion und der daraus resultierenden Unfähigkeit, zytolytische Moleküle und pro-inflammatorische Zytokine zu sezernieren, einhergeht.⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾

Wir analysierten die Frequenzen der CD4⁺CD279⁺T-Zellen im PB der Patienten nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid. Für die statistische Auswertung wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺CD279⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺T-Zellpopulation verwendet.

CD4⁺CD279⁺T-Zellen:

Der prozentuale Anteil der CD4⁺CD279⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ist in Abbildung 15 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnte bei allen Patienten der CD4⁺CD279⁺T-Zellen mit Frequenzen von 0,81%-13,10% (Mittelwert 3,99%±3,23) der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population nachgewiesen werden. Bei 10/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der CD4⁺CD279⁺T-Zellen mit Frequenzen von 0,83%-8,81% (Mittelwert 4,18±2,29%). Bei 5/14 Patienten kam es zu einem Anstieg der CD4⁺CD279⁺T-Zellen zum Zeitpunkt 2 mit Frequenzen von 0,53%-9,99% (Mittelwert 4,25±2,91%). Bei 2 der 8 Patienten war zu Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht.

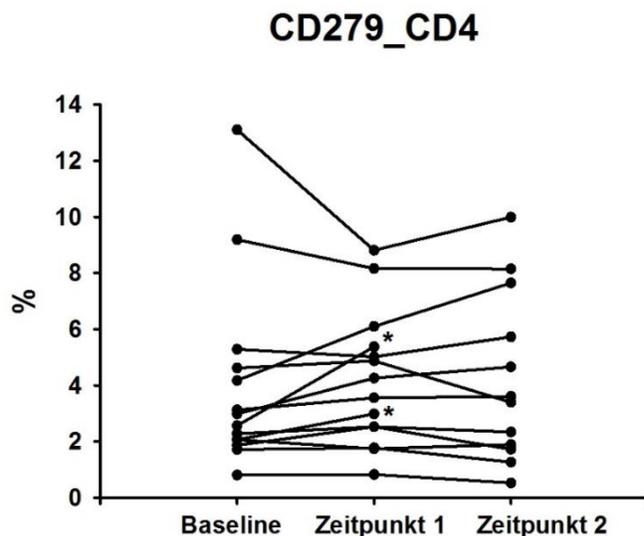


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD279⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 3,99%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 4,18%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 4,25%). * = Behandlungsende

Zur Beurteilung der Baseline-Levels von PD-1 als prognostischen Faktor werteten wir einen Prozentsatz an PD-1⁺ Zellen höher als 2% als niedrige Expression, Werte >2% als hohe Expression. 11/14 Patienten zeigten demnach zur Baseline erhöhte Levels von PD-1, bei insgesamt 10/14 Patienten stieg PD-1 zu Zeitpunkt 1 und bei 1 und bei 5/14 Patienten zu Zeitpunkt 2 an. Von den 3 Patienten mit niedrigen PD-1-Levels zur Baseline hatte eine Patientin mit Schilddrüsenkarzinom eine PR mit einem PFS von 328 Tagen. Eine Patientin mit Ovarialkarzinom hatte eine SD mit einem PFS von 160 Tagen. Eine weitere Patientin mit Ovarialkarzinom hatte ebenfalls eine SD mit einem PFS von 218 Tagen.

5.2.6 Analyse der CD4⁺CD274⁺(PD-L1)T-Zell-Frequenzen im peripheren Blut nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 2):

Der PD-1-Rezeptor und seine Liganden PD-L1 (CD274) und PD-L2, Mitglieder der CD28 und B7-Superfamilie, spielen eine kritische Rolle in der T-Zellinhibition und -erschöpfung. Die Überexpression von PD-L1 und PD-1 auf Tumorzellen und TILs korreliert mit einem schlechteren Outcome in verschiedenen Tumorerkrankungen.⁽⁹⁸⁾

Wir analysierten die Frequenzen der CD4⁺CD274⁺-T-Zellen im PB der Patienten nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid. Für die statistische Auswertung wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺CD274⁺-T-Zellen innerhalb der CD3⁺-T-Zellpopulation verwendet.

CD4⁺CD274⁺-T-Zellen:

Der prozentuale Anteil der CD4⁺CD274⁺-T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺-T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten Baseline, Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ist in Abbildung 16 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten bei allen Patienten CD4⁺CD274⁺-T-Zellen mit Frequenzen von 0,23% - 2,91% (Mittelwert 1,13±0,75 %) innerhalb der CD3⁺CD4⁺-T-Zell-Population nachgewiesen werden. Bei 9/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der CD4⁺CD274⁺-T-Zellen mit Frequenzen von 0,26% - 3,43% (Mittelwert 1,13±0,80%). Bei 6/14 Patienten kam es zu einem Anstieg der CD4⁺CD274⁺-T-Zellen zum Zeitpunkt 2 mit Frequenzen von 0,23% - 3,80% (Mittelwert 1,30±0,98%). Bei 2 Patienten war zu Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht.

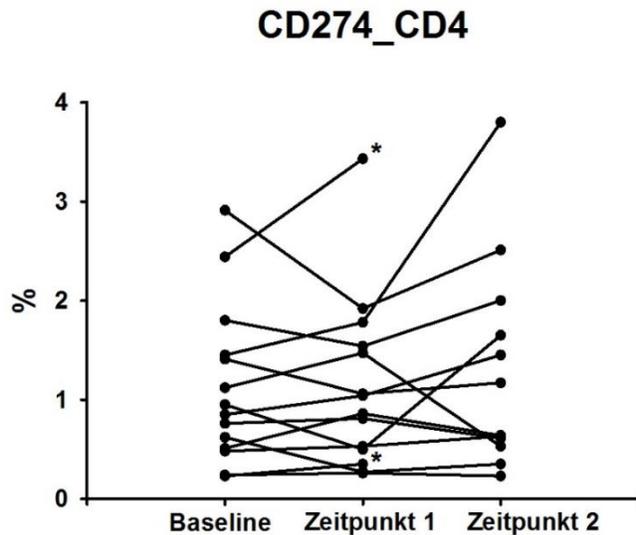


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der CD4⁺CD274⁺T-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺T-Zell-Population zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 1,13%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 1,13%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 1,30%). * = Behandlungsende

Zur Beurteilung der Baseline-Levels von PD-L1 als prognostischen Faktor werteten wir einen Prozentsatz an PD-L1+ Zellen höher als 2% als niedrige Expression, Werte >2% als hohe Expression. 2/14 Patienten zeigten bereits zur Baseline erhöhte Levels von PD-L1. Eine dieser Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte zu Zeitpunkt 1 fast eine Verdoppelung der Baseline-Werte und es kam zu einem raschen Krankheitsprogress mit einem PFS von 63 Tagen. Die andere Patientin mit Pleuramesotheliom hatte im Verlauf nahezu konstante Werte mit einer stabilen Erkrankung und einem PFS von 99 Tagen. Zu Zeitpunkt 1 kam es bei 9/14 Patienten und zu Zeitpunkt 2 bei 6/14 Patienten zu einem PD-L1-Anstieg.

5.2.7 Analyse der CD11b⁺CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSCs im PB nach Vakzinierung mit dem WT1-Peptid (Panel 3):

MDSCs repräsentieren eine heterogene Population myeloider Zellen wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium, deren Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. In einigen therapierefraktären Tumoren ließen sich akkumulierte MDSCs nachweisen, die, vermittelt durch DC-HIL/GPNMB als T-Zell-Inhibitor-Rezeptor, hier eine Suppressor-Funktion erfüllten.^(99, 100) Wir analysierten die Frequenzen der CD11b⁺CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSCs im peripheren Blut der Patienten zur Baseline und nach Impfung mit dem WT1-Peptid zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2. Für die statistische Auswertung wurde der prozentuale Anteil der CD11b⁺CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSCs innerhalb der CD14⁺ Zellpopulation verwendet.

Frequenzen der CD11b⁺CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSCs:

Der prozentuale Anteil der CD11b⁺CD14⁺ HLA-DR^{-/low} MDSCs im PB zur Baseline, zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 ist in Abbildung 17 dargestellt.

Bereits vor Beginn der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten bei allen Patienten CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSCs mit Frequenzen von 0,06% - 24,30% (Mittelwert 8,33%) der CD14⁺Zellen nachgewiesen werden. Bei 8/14 Patienten kam es unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 zum Zeitpunkt 1 zu einem Anstieg der CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSCs mit Frequenzen von 0,05% - 58,30% (Mittelwert 13,25%). Bei 8/14 Patienten kam es zu einem Anstieg der CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSCs zum Zeitpunkt 2 mit Frequenzen von 0,00% - 46,40% (Mittelwert 11,41%). Bei 2 Patienten war zu Zeitpunkt 2 bereits das Therapieende erreicht.

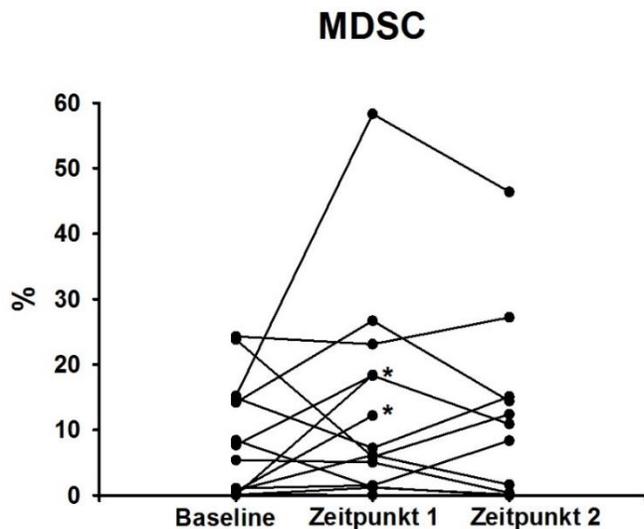


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{/low} MDSCs der CD14⁺Zellen im PB zu drei Zeitpunkten: Baseline (Mittelwert 8,33%), Zeitpunkt 1 (Mittelwert 13,25%) und Zeitpunkt 2 (Mittelwert 11,41%). * = Behandlungsende

5.2.8 Resistenzmechanismen als limitierende Faktoren von Immuntherapien

Bei 3 Patienten konnten wir mindestens drei Resistenzmechanismen (ein Anstieg der Tregs und MDSCs sowie ein Anstieg der Expression von PD-1), die mit einer schlechten Prognose und einem geminderten progressionsfreien Überleben mit einer Spanne zwischen 114 und 161 Tagen assoziiert waren, darstellen. Diese sind in Tabelle 8 farblich hervorgehoben.

Pat.-Nr.	WT1-Tetramer	CD4+ CD137+	CD4-CD137+	T _{regs}	PD-1	MDSC	PFS	BR
10	=n.a	↑n.a	↑n.a	↓n.a	+↑n.a	↑n.a	20	PD
7	↓n.a	↑n.a	↓n.a	↑n.a	+↑n.a	↑n.a	63	PD
6	↓↓	↑↑	↓↑	↑↑	+↓↓	↓↓	98	PD
14	=↑	↓↓	-↓↓	↑↑	+↓↓	↑↓	99	SD
13	↑↓	↑↑	↓↑	↑↑	+↑↓	↑↑	114	SD
3	↓↓	=↑	↑↑	↑↑	+↑↑	↑↑	138	SD
5	↓↓	↓↓	↑↓	↓↓	-↑↑	↓↓	160	SD

8	↓↑	↑↑	↓↑	↑↑	+↑↑	↑↑	161	PD
11	↑↑	↑↑	↓↑	↓↑	-↑↓	↑↑	218	SD
9	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑	+↓↑	↑↓	244	SD
2	↑↑	↑↑	↑↑	↓↑	+↑↑	↓↑	304	SD
1	↓↓	==	↑↓	↑↑	-=↓	↓↓	328	PR
4	==	↓↓	↓↓	↑↑	+↑↓	↓↑	408	SD
12	↑↑	↑↑	↓↓	↑↑	+↓↓	↓↓	>3000	SD

Tabelle 8: Übersicht möglicher Resistenzmechanismen während WT1-Vakzinierung zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2

- = niedrige Expression Baseline, + = hohe Expression Baseline, ↑ = Trendweiser Anstieg, ↓ = Trendweiser Abfall = keine Veränderung, n.a. = not applicable/keine Angabe, PFS = Progressionsfreies Überleben

6 Diskussion

6.1 Klinische Verläufe der Patienten

Das primäre Ziel unserer Studie war die Beurteilung der immunologischen Wirksamkeit der Peptidvakzinierung mit WT1. Hierzu sollten eine Induktion oder eine Verstärkung der Tetramerantwort und die klinischen Verläufe der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern die Tumormasse einen Einfluss auf a) die Wirksamkeit der Vakzinierung im Sinne einer Induktion oder Zunahme der WT1-Tetramerbildung und b) das klinische Ansprechen hat.

Unter den Patienten mit geringer Tumorlast bei Studieneinschluss wurde bei 4 Patienten eine Krankheitsstabilisierung mit einem durchschnittlichen progressionsfreien Überleben von 274 Tagen beobachtet.

Unsere Beobachtung, dass Patienten mit einer geringeren Tumorlast ein besseres Therapieansprechen haben, deckt sich mit den Studienergebnissen von Kim et al., die eine Absorption Vakzine-induzierter Antikörper durch eine erhöhte Tumorlast beschrieben.⁽¹⁰¹⁾

Gulley et al. sprachen daher die Empfehlung aus, mit der Immuntherapie zu beginnen, wenn die Tumorlast noch gering ist, da Immuntherapien im Vergleich zu zytotoxischen Therapien zwar nicht in der Lage seien, dramatische Veränderungen in der Tumorlast innerhalb einer kurzen Zeitspanne zu erreichen, doch durch die Induktion von memory-Zellen (insbesondere bei einem frühen Therapiestart) eine Verlängerung des Langzeitüberlebens (OS) bewirken.

^(102, 103)

Unter den Patienten mit nachweisbarer Tumorlast bei Studieneinschluss kann der Verlauf eines Patienten (Pat. 1) mit pulmonaler und zerebraler Metastasierung besonders hervorgehoben werden, da sich unter der Therapie eine PR beobachten ließ. Bei 5 Patienten konnten wir eine stabile Erkrankung mit einem durchschnittlichen progressionsfreien Überleben von 107 Tagen beobachtet.

Ähnlich waren die Ergebnisse der Studie von Izumoto et al., in der bei insgesamt 21 Patienten mit rezidivierendem Glioblastom bei 2/21 eine partielle Remission und bei 10/21 eine stabile Erkrankung beobachtet werden konnte. Das mittlere progressionsfreie Überleben betrug 20 Wochen.⁽¹⁰⁴⁾

In einer Vakzinierungsstudie bei Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren konnten Ohno et al. bei 3/12 Patientinnen eine stabile Erkrankung und bei 9/12 Patientinnen ein Fortschreiten der Erkrankung beobachten.⁽¹⁰⁵⁾

6.1.1 Klinische Verläufe der Patienten in Bezug auf immunologische Analysen

Unter der Vakzinierungstherapie mit WT1 konnten Hashii et al. bei 5 Patienten mit Sarkomen und nachweisbarem Residualtumor einen Anstieg der WT1+TCs und bei 1/5 Patienten mit Rhabdomyosarkom eine CR beobachten. Bei 1/5 kam es zu einer SD und bei 3/5 zu einer PD. Hashii et al. vermuten auch hier ein insuffizientes Therapieansprechen bei nachweisbaren Residualtumoren bei Studieneintritt.⁽¹⁰⁶⁾

In unserer Studie waren WT1+TCs bei 12/14 Patienten zur Baseline nachweisbar und stiegen im peripheren Blut (PB) bei 2/14 Patienten zum Zeitpunkt 1 und bei 3/14 Patienten zum Zeitpunkt 2 an. Bei insgesamt 4 der 5 Patienten mit steigenden WT1+TCs kam es im Verlauf zu einer Krankheitsstabilisierung. Der klinische Zustand eines Patienten mit zunächst steigenden, dann im Verlauf aber sinkenden WT1+TCs blieb stabil. Dem gegenübergestellt kam es bei einem Patienten mit zunächst fallenden und erst im Verlauf steigenden WT1+TCs zu einem Krankheitsprogress.

Ohta et al. konnten unter der Vakzinierung mit WT1 bei einem Patienten mit Rhabdomyosarkom und einem deutlichen Anstieg der WT1+TCs eine komplette Krankheitsremission beobachten.⁽¹⁰⁷⁾

Wir konnten bei einer Patientin mit Ovarialkarzinom zunächst konstante WT1+TCs, zu einem späteren Zeitpunkt hingegen eine Verdoppelung der WT1+TCs beobachten, die in einer SD und einem PFS von 408 Tagen resultierten.

In der Studie von Oka et al.⁽⁸⁵⁾ konnten immunologische Antworten bei 13/23 Patienten im Sinne eines Anstieges der WT1+TCs und ein klinisches Ansprechen mit Rückgang der Tumormasse und sinkenden Tumormarkern bei 12/23 Patienten beobachtet werden. Iiyama et al. konnten bei zwei Patienten mit Nierenzellkarzinom eine stabile Erkrankung mit einem Anstieg der WT1+TCs beobachten.⁽¹⁰⁸⁾ Zu anderen Ergebnissen kamen Coosemans et al. Sie berichten in einem case report von einer Patientin mit Endometriumkarzinom, die unter der Gabe von mit WT1-mRNA-elektroporierten dendritischen Zellen einen vorübergehenden

Rückgang des Tumormarkers CA 125 und einen Anstieg der WT1⁺TCs beobachten. Trotzdem kam es bei der Patientin zu einem Fortschreiten der Erkrankung.⁽¹⁰⁹⁾

Der klinische Verlauf eines Patienten mit Pleuramesotheliom (Pat. 12) ist besonders hervorzuheben. Der Patient hatte erst nach 45 Wochen einen plötzlichen Anstieg der WT1⁺TCs, der in einer SD bis dato resultierte (>130 Monate). Dem gegenübergestellt stehen die Studienergebnisse von Krug et al., die eine Vakzinierungsstudie an 9 Patienten mit Pleuramesotheliom und 3 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom durchführten. Bei 6/9 mit Pleuramesotheliom konnte eine CD4⁺T-Zellantwort und bei 5/9 Patienten eine CD8⁺T-Zellantwort sowie ein Anstieg der WT1⁺TCs und ein Anstieg der IFN γ -Sekretion beobachtet werden. Ein klinisches Ansprechen im Sinne einer stabilen Erkrankung zeigte sich hingegen nur bei 1/9 Patienten. 8/9 Patienten zeigten unter der Vakzinierung ein Fortschreiten der Erkrankung.⁽¹¹⁰⁾

6.2 Immunologischer Status der Patienten nach Vakzinierung

Die T_{reg} und MDSC-Frequenzen stiegen zu Zeitpunkt 1 und 2 bei 12/14 respektive 7/14 Patienten an. Auch wenn aus unseren Daten kein direkter Zusammenhang zwischen dem Anstieg der T_{regs} und einem fehlenden oder herabgesetzten Therapieansprechen ersichtlich scheint, wissen wir aus anderen präklinischen und klinischen Studien, dass T_{regs} in der Lage sind, die Immunosurveillance und die Entwicklung einer Immunantwort zu hemmen und somit den Tumorprogress zu begünstigen. Daher könnte einer Immuntherapie mit T_{regs} als zusätzliches target noch effektiver sein.⁽¹¹¹⁾

MDSCs sind eine heterogene Gruppe von Zellen myeloiden Ursprungs, die das Potenzial haben, in reife Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zu differenzieren, aber unter dem Einfluss von Tumorfaktoren in einem unreifen Zustand mit potenter immunsuppressiver Funktion verbleiben. Sie sind in der Lage, das Tumor-Mikromilieu durch den Abbau von Aminosäuren, der Auslösung oxidativen Stresses und der gesteigerten Zellantwort von T_{regs} und DCs maßgeblich zu beeinflussen. Bis dato gibt es noch keine von der FDA zugelassene Therapie, die in der Lage wäre, selektiv MDSCs angreifen zu können. Dies wird zusätzlich durch das Fehlen eines spezifischen Markers erschwert. Kürzlich

erhobene Daten aus Mäusestudien und klinischen Studien konnten die MDSC-Plastizität und daraus resultierende Diskrepanzen im Therapieansprechen zwischen Tumordinfiltrierenden MDSCs und peripheren MDSC (z.B. Nachweis in der Milz tumortragender Mäuse vs. peripheres Blut von Krebspatienten) nachweisen. Die tumordinfiltrierenden MDSCs wiesen hierbei eine erhöhte Therapieresistenz auf.^{(112, 113) (114)} In unserer Studie konnten wir bei einigen Patienten interessante Verläufe in Bezug auf die MDSCs beobachten. Eine Patientin mit Schilddrüsen-CA hatte unter der Vakzinierung einen kompletten Rückgang der MDSCs im peripheren Blut. Die Patientin hatte eine partielle Krankheitsremission mit einem PFS von 328 Tagen. Ein Patient mit Pleuramesotheliom hatte zum Zeitpunkt 1 bereits rückläufige, zum Zeitpunkt 2 minimale MDSC-Werte. Der Patient ist bei stabiler Erkrankung bis dato unter Vakzinierungstherapie. Eine Patientin mit Ovarialkarzinom hatte zur Baseline erhöhte MDSC-Werte, die ab Zeitpunkt 2 nicht mehr nachweisbar waren. Sie hatte bei stabiler Erkrankung ein PFS von 160 Tagen. Dem gegenübergestellt ist der klinische Verlauf einer Patientin mit Ovarialkarzinom, die zur Baseline kaum nachweisbare MDSCs hatte, bei der zum Zeitpunkt 1 allerdings ein massiver Anstieg der MDSCs im peripheren Blut nachweisbar war. Die Patientin hatte einen Krankheitsprogress mit einem PFS von 20 Tagen.

Die Färbung intrazellulärer Zytokine ist eine häufig genutzte Methode, um eine Zellantwort, insbesondere einer T-Zellantwort, nach antigener Stimulation zu visualisieren.⁽¹¹⁵⁾ Die intrazelluläre pro-inflammatorische Zytokinausschüttung bei 12/14 Patienten zeigte im Verlauf keinen nennenswerten Anstieg. Einzig hervorzuheben sind zwei Patienten, die bei steigenden WT1⁺TCs unter der Vakzinierung auch einen Anstieg von TNF α , IFN γ und IL-2 zeigten. Im Rahmen unserer Studie beurteilten wir auch die Verläufe der PD-1 und PD-L1-Expression in Hinblick auf die Funktion als prognostischen Faktor. Eine Patientin mit Ovarialkarzinom hatte bereits zur Baseline erhöhte PD-L1-Frequenzen mit einer nahezu Verdoppelung zu Zeitpunkt 1. Es kam zu einem raschen Krankheitsprogress. Eine andere Patientin mit Pleuramesotheliom mit ebenfalls erhöhten Baseline-Levels hatte im Verlauf nahezu konstante Werte mit einer stabilen Erkrankung. Von den 3 Patienten mit niedrigen PD-1-Levels zur Baseline hatte eine Patientin mit Schilddrüsenkarzinom und zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine positive klinische Antwort. Beobachtungen sollten für die Möglichkeit einer Kombinationstherapie, bestehend aus einer Peptidvakzinierung und

einem Checkpoint-Inhibitor, sensibilisieren. Darüber hinaus sollte der Baseline-Wert als fraglicher prognostischer Faktor weiterhin untersucht werden. Unter anderem konnten Petrizzo et al. in einer Studie mit Multi-Peptidvakzinierung in Kombination mit einer low-dose-Chemotherapie und einem PD-1-Checkpointinhibitor an Mäusen eine bemerkenswerte Verzögerung im Tumorwachstum und ein prolongiertes Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Dieser Ansatz könnte in klinischen Studien eine Potenzierung der anti-tumoralen Wirksamkeit der Vakzinierung mit sich bringen.⁽¹¹⁶⁾

Auch wenn Vakzinierungstherapien ein immunogenes Antigen beinhalten wissen wir heutzutage, dass die alleinige Immunogenität für eine wirksame Therapie nicht ausreicht. Passende Adjuvantien spielen für die Effektivität der Vakzinierung eine wesentliche Rolle. Idealerweise sollte ein Adjuvant a) den sofortigen Abbau des Antigens verhindern, b) die Erkennung und die Aufnahme des Antigens durch APCs unterstützen und c) die Aktivierung der APCs und die dadurch verstärkte Th1/CTL-Antwort und die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses fördern⁽¹¹⁷⁾.

Basis des Studiendesigns und der Grund für die Wahl der Kombination der Adjuvantien GM-CSF und KLH für die hier evaluierte Studie waren Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Carmen Scheibenbogen aus dem Jahr 2003. Carmen Scheibenbogen et al. prüften in einer Phase-I-Studie, ob die Hinzugabe der zwei Adjuvantien GM-CSF und KLH die T-Zellantwort auf MHC-Klasse-I-Peptidvakzinierungen verstärken kann. Hierzu wurden 43 "high-risk"-Melanompatienten, die zum Studieneintritt eine klinische CR (complete remission) hatten, entweder a) mit einem MHC-Klasse-I-Tyrosinasepeptid allein oder b) mit Zugabe von GM-CSF oder c) KLH oder d) GM-CSF + KLH geimpft. Der primäre Endpunkt war hier die Induktion Tyrosinase-spezifischer T-Zellen. Tyrosinase-spezifische IFN γ -produzierende T-Zellen konnten zwei Wochen nach der zweiten Vakzinierung bei 5 von 9 Patienten, die mit dem Tyrosinase-Peptid in Kombination mit GM-CSF + KLH geimpft wurden, nicht aber bei den Patienten, die mit dem Tyrosinase-Peptid ohne Adjuvans oder mit nur einem Adjuvans (GM-CSF oder KLH) geimpft wurden, nachgewiesen werden. Die Daten legten nahe, dass die alleinige Zugabe eines Adjuvans (wahlweise GM-CSF oder KLH) nur zu einer minimalen Verstärkung der Immunogenität des Tyrosinase-Peptids führte. Die kombinierte Applizierung von GM-CSF + KLH war wiederum mit einer frühen Induktion einer T-Zellantwort

verbunden⁽¹¹⁸⁾. In ähnlichen Studien mit soliden Tumoren war die Anwendung ebenso sicher und verbesserte das klinische Ansprechen⁽¹¹⁹⁾. Das hier validierte Impfschema war auch die Basis für weitere erfolgreiche Vakzinestudien der Arbeitsgruppe einschließlich der hier vorliegenden Studie⁽¹¹⁹⁾.

Darüberhinaus stehen andere Adjuvantien zur Auswahl: Von diversen Arbeitsgruppen wurde Montanide ISA™51 verwendet. In Suspension mit den Peptiden schützt es diese und gewährleistet deren langsame Freisetzung⁽¹²⁰⁾.

Ein anderes, bislang vielversprechendes Adjuvans bei der Suche nach effizienteren Adjuvantien ist der Toll-like-Rezeptor-Ligand (TLR). Während der natürlichen antimikrobiellen Immunantwort bewirkt die Bindung Pathogen-assoziiertes molekularer Patterns (PAMPs) an TLRs eine starke APC-Aktivierung mit einer Herauf-Regulation von Zelloberflächen-MHCs, Adhäsions- und Ko-stimulatorischen Molekülen zusammen mit der Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Dieses Zusammenspiel ist essentiell für eine adäquate Antigenpräsentation, die Migration der DCs zu den Lymphknoten und das T-Zellpriming. TLR9, TLR7, TLR3 und TLR2 werden derzeit in Kombination mit Peptiden in frühen klinischen Studien hinsichtlich Toxizität (AEs) und Immunogenität (Messung Anti-Vakzinierungs-T-Zellen) evaluiert.

Die Forschungsgruppe um Cécile Gouttefangeas erforscht derzeit den Ansatz mit einem Peptid (Antigen), Montanide (Depot-Effekte) und einem TLR-Agonisten (APC-Aktivierung) mit dem Ziel der Induktion starker Anti-Vakzine-T-Zellen und einer daraus resultierenden dauerhaften klinischen Immunantwort bei Tumorpatienten⁽¹¹⁷⁾.

Die Durchflusszytometrie als ex-vivo-Assay nutzten wir, um die T-Zellantwort im peripheren Blut zu bestimmen. Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten konnten mithilfe der Durchflusszytometrie immunologische Effekte der Vakzinierung dargestellt werden. Folglich konnte unter Berücksichtigung der Unterschiede der einzelnen Studien im Sinne von Tumorentitäten, Einschlusskriterien der Patienten, Immunogenität, der benutzten Adjuvantien sowie der Häufigkeit und der Applikationsort der Vakzinierung teilweise immunologische und molekulare Wirksamkeiten der WT1-Peptikvakzinierung nachgewiesen werden.⁽⁸³⁾

In unserer Studie konnte beim Vergleich der T-Zellmarker und dem klinischen Ansprechen keine Korrelation zwischen der T-Zellantwort und den Outcome-Parametern festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnten die spontanen WT1-Tetramer⁺T-Zellen sein, die bereits zur Baseline bei 12/14 Patienten nachgewiesen werden konnten. Bei 8/14 Patienten waren die WT1-Tetramer⁺T-Zellen unter der Vakzinierung rückläufig. Trotzdem kam es bei 5 dieser Patienten trotz rückläufiger WT1-Tetramer⁺T-Zellen zu einer Krankheitsstabilisierung. Bei 1 Patienten kam es zu einem interessanten Verlauf. Ab Baseline bis zu Zeitpunkt 1 kam es zunächst zu einem Anstieg, dann zu Zeitpunkt 2 zu einem Abfall der WT1-Tetramer⁺T-Zellen. Zu späteren Zeitpunkten kam es erneut zu einem deutlichen Anstieg der WT1-Tetramer⁺T-Zellen. Unter der Therapie stellte sich eine stabile Erkrankung ein, die bis dato anhält. Diese Beobachtung wurde bereits in anderen Vakzinierungsstudien gemacht und scheint ein mögliches Anzeichen dafür zu sein, dass eine bestimmte Zeit benötigt wird, um eine effektive Immunantwort auszulösen. Bei einem Patienten kam es trotz eines anfänglichen Anstiegs der WT1-Tetramer⁺T-Zellen zum Zeitpunkt 2 zu einem Krankheitsprogress. Ein Patient hatte zur Baseline keine nachweisbaren WT1-Tetramer⁺T-Zellen, unter der Vakzinierung kam es aber zu einem sukzessiven Anstieg der WT1-Tetramer⁺T-Zellen und einer Krankheitsstabilisierung mit einem progressionsfreien Überleben von 218 Tagen. Diese Beobachtung untermauert den der therapeutischen Vakzinierung zugrunde liegenden Mechanismus, das Immunsystem dahingehend zu unterstützen, dass es in der Lage ist den Tumor eigenständig zu bekämpfen. Ein verspätetes Therapieansprechen, welches mit Tumorkonvaleszenzen einhergeht, sollte in das Studiendesign und die Auswertungen einfließen. ^(121, 122)

6.3 Schlussfolgerung

Obwohl die Ergebnisse unserer Studie nur eine partielle Krankheitsremission und keine komplette Krankheitsremission zeigten, ist die Anzahl der stabilen Erkrankungen beachtlich, insbesondere unter Berücksichtigung des Krankheitsstatus der Patienten bei Studieneinschluss. Interessanterweise hatte 1 Patientin (Pat. 1) trotz rückläufiger WT1-Tetramer⁺T-Zellen ein deutliches Therapieansprechen mit einer partiellen Krankheitsremission. Vermutlich konnte hier das Ergebnis des Assays die immunologische Antwort nicht ausreichend darstellen.

Der Einfluss der Tumormasse auf das Therapieansprechen scheint ein weiterer wichtiger Parameter zu sein. In unserer Studie zeigten sich große Unterschiede im Therapieansprechen in Hinblick auf die Tumormasse. So konnte bei den Patienten ohne nachweisbarem Tumor bei Studieneinschluss bei 4 Patienten eine stabile Erkrankung und bei einem Patienten ein Krankheitsprogress beobachtet werden. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag bei 274 Tagen. Dem gegenübergestellt wurde bei den Patienten mit nachweisbarer Tumormasse bei 1 Patienten eine partielle Remission, bei 5 Patienten eine stabile Erkrankung und bei 3 Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung beobachtet. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag bei 107 Tagen.

Der womöglich suppressive Effekt der Tumormasse auf die Induktion der WT1-spezifischen T-Zellantwort sollte hier in Betracht gezogen werden. Möglicherweise könnten tumorassoziierte Stromazellen das Therapieansprechen beeinflussen. Eine schlechte Erreichbarkeit der Tumormasse und des Tumormikromilieus, die durch genetische und epigenetische Instabilität beeinflusst wird, kann die therapeutische Wirksamkeit im Falle solider Tumoren limitieren. Eine Möglichkeit diese Hürden zu überbrücken könnte eine Kombinationstherapie darstellen, die getrennt voneinander den Tumor und sein umgebendes Gewebe angreift. ⁽¹²³⁾

Insgesamt wurde die Therapie von allen Patienten gut vertragen. Vorübergehend auftretende lokale milde bis moderate Injektionsreaktionen, Fieber und Schüttelfrost wurden mit der Applikation von GM-CSF und KLH in Verbindung gebracht. ⁽¹²⁴⁾ Der bei einem Patienten beobachtete milde Husten könnte möglicherweise mit der Induktion von Autoantikörpern gegen GM-CSF in Verbindung gebracht werden. ⁽¹²⁵⁾

Mit der Identifizierung von Resistenzmechanismen erhofft man sich, das individuelle Therapieansprechen vorhersagen zu können und ein noch gezielteres Angreifen mithilfe von (Kombinations-)Therapien dadurch zu ermöglichen. Bei der Betrachtung möglicher Resistenzmechanismen im Rahmen unserer WT1-Vakzinierung wurde deutlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen einem Nicht-Ansprechen und der Ausschüttung immuno-regulativer Zellen wie MDSCs oder T_{regs} nicht bei allen Patienten identifiziert werden konnte.

Die Identifizierung anderer Resistenzmechanismen, die Entwicklung verlässlicher Biomarker, die Verbesserung des Immunmonitorings und die Etablierung widerstandsfähiger Essays stellen weitere Ziele zukünftiger Studien dar. Um Vakzinierungen gegen WT1 weiterzuentwickeln, sind randomisierte mehr-armige Studien mit angepassten Studiendesigns sinnvoll, um optimale Vakzinierungsstrategien zu entwickeln. Zudem ist von großem Interesse, die Mechanismen für verspätetes Ansprechen und die Mechanismen für einen Krankheitsprogress nach anfänglichem Therapieansprechen zu identifizieren. Durch die Identifizierung von frühen Markern zur Beurteilung eines Therapieansprechens könnte eine bessere Selektion von Patienten getroffen werden. Dabei sind v.a. Kombinationstherapien attraktiv, mit denen durch geschickte Kombination z.B. mit Immuncheckpoint-Inhibitoren oder anderen immunmodulatorisch wirksamen Substanzen, unter Vakzinierungen auftretende Resistenzmechanismen aufgegeben werden. Daneben kann mit optimierten Vakzinekonzepten das vielversprechende Potential von WT1 in der hier vorliegenden Proof-of-Concept- Studie im adjuvanten Setting evaluiert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
2. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of biology and medicine*. 1982;55(3-4):329-33.
3. Burnet FM. Biological approach to carcinogenesis. *Acta - Unio Internationalis Contra Cancrum*. 1959;15(1):31-4.
4. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, et al. Cancers Related to Immunodeficiencies: Update and Perspectives. *Front Immunol*. 2016;7:365.
5. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-11.
6. Grulich AE, Vajdic CM. The epidemiology of cancers in human immunodeficiency virus infection and after organ transplantation. *Seminars in oncology*. 2015;42(2):247-57.
7. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
8. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3804-9.
9. Witkiewicz AK, Kline J, Queenan M, Brody JR, Tsirigos A, Bilal E, et al. Molecular profiling of a lethal tumor microenvironment, as defined by stromal caveolin-1 status in breast cancers. *Cell Cycle*. 2011;10(11):1794-809.
10. Ramamonjisoa N, Ackerstaff E. Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor-Stroma Interaction by Non-invasive Preclinical Imaging. *Front Oncol*. 2017;7:3.
11. Efremova M, Rieder D, Klepsch V, Charoentong P, Finotello F, Hackl H, et al. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution. *Nat Commun*. 2018;9(1):32.
12. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60.
13. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14.
14. So T, Takenoyama M, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Hanagiri T, et al. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer research*. 2005;65(13):5945-52.
15. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology*. 2006;90:1-50.
16. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC, Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009;9:3.
17. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7556-61.
18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

20. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22.
21. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim BG, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: The green light for myeloma immune escape. *Blood reviews*. 2016.
22. Vuk-Pavlovic S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *Prostate*. 2010;70(4):443-55.
23. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research*. 2012;72(9):2162-71.
24. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(7):971-9.
25. Scognamiglio G, De Chiara A, Di Bonito M, Tatangelo F, Losito NS, Anniciello A, et al. Variability in Immunohistochemical Detection of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) in Cancer Tissue Types. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
26. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
27. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(5):1021-34.
28. Turner TB, Buchsbaum DJ, Straughn JM, Jr., Randall TD, Arend RC. Ovarian cancer and the immune system - The role of targeted therapies. *Gynecologic oncology*. 2016.
29. Subramaniam DS, Liu SV, Giaccone G. Novel approaches in cancer immunotherapy. *Discovery medicine*. 2016;21(116):267-74.
30. Masopust D, Vezyz V, Wherry EJ, Ahmed R. A brief history of CD8 T cells. *European journal of immunology*. 2007;37 Suppl 1:S103-10.
31. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):32-41.
32. Jager E, Knuth A. The discovery of cancer/testis antigens by autologous typing with T cell clones and the evolution of cancer vaccines. *Cancer Immun*. 2012;12:6.
33. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *Journal of immunology*. 2007;178(4):1975-9.
34. Hirayama M, Nishimura Y. The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *International immunology*. 2016.
35. Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(7):514-20.
36. Boon T. Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Adv Cancer Res*. 1992;58:177-210.
37. Boon T, Gajewski TF, Coulie PG. From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol Today*. 1995;16(7):334-6.
38. Wang RF, Rosenberg SA. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev*. 1999;170:85-100.
39. Rauch J, Gires O. SEREX, Proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(3):355-71.
40. Boon T, Old LJ. Cancer Tumor antigens. *Current opinion in immunology*. 1997;9(5):681-3.
41. Viatte S, Alves PM, Romero P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(3):318-30.
42. Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new

- members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer*. 2000;87(1):55-60.
43. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, Lower M, van de Roemer N, de Graaf J, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer research*. 2012;72(5):1081-91.
 44. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol*. 2018;36(7):633-41.
 45. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3380-7.
 46. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med*. 2018.
 47. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-13.
 48. Ohnmacht GA, Marincola FM. Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):332-8.
 49. Korangy F, Ormandy LA, Bleck JS, Klempnauer J, Wilkens L, Manns MP, et al. Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(13):4332-41.
 50. Coulie PG, Van Pel A. Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors. *Curr Opin Oncol*. 1993;5(6):1043-8.
 51. Lamerz R. AFP isoforms and their clinical significance (overview). *Anticancer research*. 1997;17(4B):2927-30.
 52. Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, et al. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer research*. 1994;54(1):16-20.
 53. Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, Menke A, Oji Y, Oka Y, et al. Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia*. 2005;19(8):1318-23.
 54. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, et al. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):475-80.
 55. Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, Thomas WA, Rowe M, Kieff E, et al. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(1):157-68.
 56. Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Romanelli RG, Buzzelli G, Casini-Raggi V, et al. Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(1):66-72.
 57. Hamilton E, Infante JR. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treat Rev*. 2016;45:129-38.
 58. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, et al. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep*. 2018;22(11):2978-94.
 59. Bodoor K, Matalka I, Hayajneh R, Haddad Y, Gharaibeh W. Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3037-46.

60. Ali MA. Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: An Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(4):315-33.
61. Hogdall EV, Hogdall CK, Blaakaer J, Heegaard NH, Glud E, Christensen L, et al. P53 autoantibodies in sera from Danish ovarian cancer patients and their correlation with clinical data and prognosis. *APMIS.* 2002;110(7-8):545-53.
62. Cua S, Tan HL, Fong WJ, Chin A, Lau A, Ding V, et al. Targeting of embryonic annexin A2 expressed on ovarian and breast cancer by the novel monoclonal antibody 2448. *Oncotarget.* 2018;9(17):13206-21.
63. Chen DL, Zeng ZL, Yang J, Ren C, Wang DS, Wu WJ, et al. L1cam promotes tumor progression and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *J Hematol Oncol.* 2013;6:43.
64. Chen J, Gao F, Liu N. L1CAM promotes epithelial to mesenchymal transition and formation of cancer initiating cells in human endometrial cancer. *Exp Ther Med.* 2018;15(3):2792-7.
65. Van Eynde A, Perez-Callejon E, Schoenmakers E, Jacquemin M, Stalmans W, Bollen M. Organization and alternate splice products of the gene encoding nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *Eur J Biochem.* 1999;261(1):291-300.
66. Moreau-Aubry A, Le Guiner S, Labarriere N, Gesnel MC, Jotereau F, Breathnach R. A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *The Journal of experimental medicine.* 2000;191(9):1617-24.
67. Oldham RK. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 1983;1(9):582-90.
68. Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, Kaplan WD, Button LN, Kufe DW, et al. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer research.* 1980;40(9):3147-54.
69. Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol.* 2008;26(11):1774-7.
70. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell.* 2015;161(2):205-14.
71. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321-30.
72. Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature reviews Immunology.* 2006;6(5):383-93.
73. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006;314(5796):126-9.
74. Siddiqi HF, Staser KW, Nambudiri VE. Research Techniques Made Simple: CAR T Cell Therapy. *J Invest Dermatol.* 2018.
75. Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nature reviews Cancer.* 2006;6(3):204-16.
76. Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Wacholder S, Bratti C, Solomon D, et al. Rationale and design of a community-based double-blind randomized clinical trial of an HPV 16 and 18 vaccine in Guanacaste, Costa Rica. *Vaccine.* 2008;26(37):4795-808.
77. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med.* 1997;336(26):1855-9.
78. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411-22.
79. Tsoras AN, Champion JA. Cross-Linked Peptide Nanoclusters for Delivery of Oncofetal

- Antigen as a Cancer Vaccine. *Bioconjug Chem.* 2018;29(3):776-85.
80. Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL, et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell.* 1990;61(7):1257-69.
81. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 1990;60(3):509-20.
82. Koido S, Okamoto M, Shimodaira S, Sugiyama H. Wilms' tumor 1 (WT1)-targeted cancer vaccines to extend survival for patients with pancreatic cancer. *Immunotherapy.* 2016;8(11):1309-20.
83. Van Driessche A, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials. *The oncologist.* 2012;17(2):250-9.
84. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 1997;89(4):1405-12.
85. Oka Y, Tsuboi A, Nakata J, Nishida S, Hosen N, Kumanogoh A, et al. Wilms' Tumor Gene 1 (WT1) Peptide Vaccine Therapy for Hematological Malignancies: From CTL Epitope Identification to Recent Progress in Clinical Studies Including a Cure-Oriented Strategy. *Oncol Res Treat.* 2017;40(11):682-90.
86. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood.* 2003;101(5):1698-704.
87. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med.* 2010;2(17):17ra9.
88. Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner KD. The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Oncogene.* 2008;27(26):3662-72.
89. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(2):194-204.
90. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(17):5323-37.
91. Doubrovina E, Carpenter T, Pankov D, Selvakumar A, Hasan A, O'Reilly RJ. Mapping of novel peptides of WT-1 and presenting HLA alleles that induce epitope-specific HLA-restricted T cells with cytotoxic activity against WT-1(+) leukemias. *Blood.* 2012;120(8):1633-46.
92. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
93. Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer.* 2016;54:112-9.
94. Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015;20(4):376-84.
95. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682-7.

96. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3887-95.
97. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:451694.
98. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med.* 2015;21(1):24-33.
99. Kobayashi M, Chung JS, Beg M, Arriaga Y, Verma UN, Courtney K, et al. Blocking monocytic myeloid-derived suppressor cell function via anti-DC-HIL/GPNMB antibody restores the in vitro integrity of T-cells from cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2018.
100. Calcinotto A, Spataro C, Zagato E, Di Mitri D, Gil V, Crespo M, et al. IL-23 secreted by myeloid cells drives castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2018;559(7714):363-9.
101. Kim SK, Wu X, Ragupathi G, Gathuru J, Koide F, Cheung NK, et al. Impact of minimal tumor burden on antibody response to vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2011;60(5):621-7.
102. Stein WD, Gulley JL, Schlom J, Madan RA, Dahut W, Figg WD, et al. Tumor regression and growth rates determined in five intramural NCI prostate cancer trials: the growth rate constant as an indicator of therapeutic efficacy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2011;17(4):907-17.
103. Gulley JL, Madan RA, Schlom J. Impact of tumour volume on the potential efficacy of therapeutic vaccines. *Curr Oncol.* 2011;18(3):e150-7.
104. Izumoto S, Tsuboi A, Oka Y, Suzuki T, Hashiba T, Kagawa N, et al. Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2008;108(5):963-71.
105. Ohno S, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Ishizaki J, Miyamoto K, et al. Wilms' tumor 1 (WT1) peptide immunotherapy for gynecological malignancy. *Anticancer research.* 2009;29(11):4779-84.
106. Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(2):352-5.
107. Ohta H, Hashii Y, Yoneda A, Takizawa S, Kusuki S, Tokimasa S, et al. WT1 (Wilms tumor 1) peptide immunotherapy for childhood rhabdomyosarcoma: a case report. *Pediatr Hematol Oncol.* 2009;26(1):74-83.
108. Iiyama T, Udaka K, Takeda S, Takeuchi T, Adachi YC, Ohtsuki Y, et al. WT1 (Wilms' tumor 1) peptide immunotherapy for renal cell carcinoma. *Microbiol Immunol.* 2007;51(5):519-30.
109. Coosemans A, Wolf M, Berneman ZN, Van Tendeloo V, Vergote I, Amant F, et al. Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma. *Anticancer research.* 2010;30(9):3709-14.
110. Krug LM, Dao T, Brown AB, Maslak P, Travis W, Bekele S, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2010;59(10):1467-79.
111. Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1417(1):104-15.
112. Anani W, Shurin MR. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:105-28.
113. Gabilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research.* 2007;67(1):425; author reply 6.
114. Albeituni SH, Ding C, Yan J. Hampering immune suppressors: therapeutic targeting of

- myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer J*. 2013;19(6):490-501.
115. Lovelace P, Maecker HT. Multiparameter Intracellular Cytokine Staining. *Methods Mol Biol*. 2018;1678:151-66.
116. Petrizzo A, Mauriello A, Luciano A, Rea D, Barbieri A, Arra C, et al. Inhibition of tumor growth by cancer vaccine combined with metronomic chemotherapy and anti-PD-1 in a pre-clinical setting. *Oncotarget*. 2018;9(3):3576-89.
117. Gouttefangeas C, Rammensee HG. Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2018;67(12):1911-8.
118. Scheibenbogen C, Schadendorf D, Bechrakis NE, Nagorsen D, Hofmann U, Servetopoulou F, et al. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer*. 2003;104(2):188-94.
119. Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemisen AM, Bauer S, Blau IW, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*. 2009;113(26):6541-8.
120. van Doorn E, Liu H, Huckriede A, Hak E. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):159-69.
121. Hoos A, Parmiani G, Hege K, Sznol M, Loibner H, Eggermont A, et al. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *Journal of immunotherapy*. 2007;30(1):1-15.
122. Xu Z, Zhen B, Park Y, Zhu B. Designing therapeutic cancer vaccine trials with delayed treatment effect. *Stat Med*. 2017;36(4):592-605.
123. Mondino A, Vella G, Icardi L. Targeting the tumor and its associated stroma: One and one can make three in adoptive T cell therapy of solid tumors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2017;36:57-65.
124. Stern AC, Jones TC. The side-effect profile of GM-CSF. *Infection*. 1992;20 Suppl 2:S124-7.
125. Uchida K, Beck DC, Yamamoto T, Berclaz PY, Abe S, Staudt MK, et al. GM-CSF autoantibodies and neutrophil dysfunction in pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 2007;356(6):567-79.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kaja Alogna, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Klinische und immunologische Effektivität einer Phase-II-Vakzinierungs-Studie mit Wilms-Tumor-Gen-Produkt-1 (WT1) und GM-CSF und KLH als Adjuvantien zur Behandlung von Patienten mit WT1-exprimierenden soliden Tumoren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. Anne Letsch für die wissenschaftliche Unterstützung dieser Arbeit, ihre konstruktive Kritik, ihren immunologischen Input und ihre herzliche Art.

Professor Ulrich Keilholz und Professor Carmen Scheibenbogen danke ich für das Konzept der Studie.

Bei Dr. Anne Marie Asemissen, Dr. Maren Knödler und PD Dr. Alexander Schmittel bedanke ich mich für ihre Hilfe zur Studiendurchführung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Sandra Bauer und Petra Quass für ihre Probenaufarbeitung und die Einführung in die Durchflusszytometrie.

Professor Eckhard Thiel und Professor Antonio Pezzutto möchte ich für die Schaffung der Rahmenbedingung zur Durchführung einer solchen Studie in ihrer Klinik danken.

Meiner lieben Freundin Lyn-Cathrin Echtermeyer-Weylandt danke ich für das Korrekturlesen sowie ihre langjährige Freundschaft.

Ein besonderer Dank gilt „meinen ganzen Eltern“ für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre offenen Ohren und ihre starken Schultern.

Zum Schluss danke ich meinen zwei großen Lieben dafür, dass jeder Tag mit ihnen mein Leben ein großes Stück besser macht und alle kleinen und großen Schritte plötzlich möglich sind.