

Aus der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am
Campus Virchow-Klinikum der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
(GM-CSF), Interleukin-2 (IL-2), Interferon- α (IFN- α)
und 5-Fluorouracil (5-FU) in der Behandlung des
metastasierten Nierenzellkarzinoms

Eine Phase-I/II-Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ann-Christine Hecker

aus Bückeburg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Westermann
2. Prof. Dr. med. B. Rau
3. Prof. Dr. med. I. Schmidt-Wolf

Datum der Promotion: 27. März 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Symptome und Diagnostik	8
1.2	Klassifikation, Stadieneinteilung und Prognose	8
1.2.1	Stadieneinteilung und Prognose	8
1.2.2	Histologische Klassifikation	11
1.2.3	Molekulare Pathogenese	12
1.3	Lokale Therapieoptionen des Nierenzellkarzinoms	13
1.3.1	Chirurgische Therapie	13
1.3.2	Strahlentherapie	14
1.4	Systemische Therapieoptionen des Nierenzellkarzinoms	14
1.4.1	Multikinaseinhibitoren (MKI) und mTOR-Inhibitoren	16
1.4.1.1	Multikinaseinhibitoren: Sunitinib (SU-11248) und Sorafenib (Bay 43-9006)	16
1.4.1.2	mTOR-Inhibitoren: Temozolomid (CC-779) und Everolimus (RAD001)	18
1.4.2	Anti-VEGF-Antikörper: Bevacizumab	18
1.4.3	Immunogenität des Nierenzellkarzinoms und systemische Immuntherapie	19
1.4.3.1	Interferone (IFN)	22
1.4.3.2	Interleukin-2 (IL-2)	24
1.4.3.3	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	26
1.4.4	Chemotherapie und 5-Fluorouracil (5-FU)	28
1.4.5	Zytokinkombinationen und Chemoimmuntherapie	29
1.4.5.1	Kombinationstherapien mit IL-2 und IFN- α	31

1.4.5.2	Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- α und 5-FU	31
1.4.5.3	Kombinationstherapien mit GM-CSF	32
2	Ziel der Arbeit	34
3	Material und Methoden	36
3.1	Patientenauswahl	36
3.2	Behandlung	37
3.2.1	Therapieplan	37
3.2.2	Abbruchkriterien	38
3.2.3	Begleitmedikation	38
3.2.4	Dosisreduktion	39
3.3	Evaluation	39
3.3.1	Erfassung der Toxizität	41
3.3.2	Erfassung und Definition des Tumoransprechens	41
3.3.3	Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen und Risikoprofil	42
3.3.4	Statistische Auswertung	42
3.4	Immunologische Untersuchungen	43
3.4.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS-Analyse)	44
3.4.2	PBMC-Präparation	45
3.4.3	Zelllinien und Zellkultur	46
3.4.4	Zytotoxizitäts-Assay: Der „JAM-Test“	47
3.4.5	Proliferations- und Stimulationsexperimente	49
3.4.5.1	T-Zell-Präparation	49
3.4.5.2	Proliferations- und Stimulationsexperimente	50
3.4.6	Statistische Auswertung	50

4	Ergebnisse	52
4.1	Patientencharakteristika	52
4.2	Toxizität und Dosismodifikation	55
4.2.1	Toxizität	55
4.2.2	Therapieabbruch	57
4.2.3	Dosismodifikation	57
4.3	Klinische Ergebnisse	58
4.3.1	Therapieansprechen	58
4.3.2	Progressionsfreies Intervall	60
4.3.3	Prognosegruppen	61
4.4	Hämatologische und immunologische Parameter im Therapieverlauf	62
4.4.1	Blutbild	62
4.4.2	Effektorzellen und Subpopulationen	64
4.5	Veränderung der zytotoxischen Aktivität von PBMC im Therapieverlauf	66
4.5.1	Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber SLO	66
4.5.2	Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber K562	68
4.5.3	Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber Raji	68
4.6	Veränderung der proliferativen und stimulatorischen Kapazität von PBMC im Therapieverlauf	68
4.6.1	Veränderung der proliferativen Kapazität der PBMC	72
4.6.2	Veränderung der stimulatorischen Kapazität der PBMC	72
4.7	Koexpression von CD80 bzw. CD86 auf T-Zellen	73

5	Diskussion	75
5.1	Toxizität	75
5.2	Klinische Ergebnisse	76
5.3	Immunologische Ergebnisse	80
5.4	Koexpression von CD80 bzw. CD86 auf T-Zellen	81
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	83
6	Zusammenfassung	85
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	87
7.1	Tabellenverzeichnis	87
7.2	Abbildungsverzeichnis	87
8	Abkürzungsverzeichnis	90
9	Literaturverzeichnis	96
10	Lebenslauf	111
11	Publikationsliste	113
11.1	Peer-reviewed Journals	113
11.2	Abstracts	113
12	Danksagung	114
13	Erklärung	115

1 Einleitung

Mehr als 15.000 Menschen in Deutschland erkranken jährlich an Nierenkrebs. Das Nierenkarzinom macht etwa 3% der bösartigen Erkrankungen im Erwachsenenalter aus und ist nach dem Prostata- und Harnblasenkarzinom der dritthäufigste maligne urologische Tumor [1]. Der Großteil der malignen Nierentumore geht von den renalen Epithelzellen der unterschiedlichen Tubulusabschnitte aus und wird als Nierenzellkarzinom (NZK) bezeichnet. Den restlichen Anteil machen Urothelkarzinome sowie maligne Lymphome, Sarkome und die vor allem im Kindes- und Jugendalter auftretenden nephroblastischen Tumore aus.

In den letzten 30 Jahren ist, auch durch die Fortschritte der bildgebenden Diagnostik, ein Anstieg der Erkrankungsraten zu verzeichnen. Mit zunehmendem Alter erhöht sich das Risiko zu erkranken, wobei Männer früher und auch fast doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter für Männer liegt bei 67 Jahren, für Frauen bei 71 Jahren [1]. Ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit. Etwa 40-50% der langzeitdialysierten Patienten entwickeln Nierenzysten, die zu ca. 6% in ein NZK übergehen [2]. Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, arterielle Hypertonie und, insbesondere bei Frauen, eine ausgeprägte Adipositas. Auch die gehäufte Einnahme phenacetinhaltiger Analgetika, welche bereits für die Entwicklung von Übergangskarzinomen des Nierenbeckens als ursächlich gelten, sowie Thiaziddiuretika werden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Zudem scheint die Exposition mit Chlorkohlenwasserstoffen und Schwermetallen wie z.B. Cadmium einen Einfluss zu haben [2].

In ca. 2% der Fälle werden NZK auch familiär gehäuft beobachtet [3]. Die Erkrankung manifestiert sich dann zumeist schon in jüngeren Jahren und weist eine bilaterale oder multifokale Beteiligung auf. Familiäre NZK treten einerseits als autosomal-dominant vererbte Erkrankung, andererseits im Rahmen hereditärer Tumorsyndrome wie dem familiären Multi-Neoplasie-Syndrom von-Hippel-Lindau (VHL) auf. Untersuchungen zur Genese der hereditären Formen des NZK trugen auch zum Verständnis der molekularen Pathogenese sporadisch auftretender Nierenzellkarzinome bei. So finden sich Mutationen des Chromosoms 3, auf dem das

VHL-Gen lokalisiert ist, und des Chromosoms 7, auf dem sich das MET-Proto-Onkogen befindet, sowohl bei den hereditären als auch den sporadischen Formen des NZK [3].

1.1 Symptome und Diagnostik

Das Fehlen spezifischer Symptome und Screeningmarker erschwert die frühzeitige Diagnose des Nierenzellkarzinoms. Die frühen und lokal begrenzten Stadien sind zumeist asymptomatisch oder stellen sich mit Fieber, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust eher uncharakteristisch dar. Beschwerden treten oft erst durch eine Zunahme des Tumors, Metastasierung oder ektope Hormonbildung auf. Die Leitsymptome der von Virchow beschriebenen Trias: Hämaturie, Flankenschmerz und tastbare Resistenz, werden jedoch nur noch in weniger als 5% beobachtet [4]. Paraneoplastische Manifestationen wie Dermatosen, Polyglobulie, Hyperkalzämie, inadäquate ADH-Produktion (Schwartz-Bartter-Syndrom) und Neuromyopathien können beim NZK ebenfalls auftreten [5].

Mit Einführung der Sonographie wurden Nierenkarzinome zunehmend inzidentell diagnostiziert, so dass inzwischen über 50% der Fälle Zufallsbefunde ausmachen [2]. Die Sonographie stellt den wichtigsten Pfeiler bei der Diagnostik des NZK dar. Wurde sonographisch der Verdacht auf einen Nierentumor gestellt, ist zur weiteren Abklärung ein CT des Abdomens und Beckens erforderlich [2]. Bei Verdacht auf Metastasierung sind eine Röntgenaufnahme und ggf. ein CT des Thorax, des Schädels oder ein Knochenszintigramm angezeigt. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegen bei 20-40% der Patienten bereits Metastasen vor, bei weiteren 20-40% mit primär lokalisiertem Tumor treten, auch nach einer Nephrektomie, im Verlauf Fernmetastasen auf. Die häufigsten Lokalisationen sind die Lunge (50-65%), gefolgt von den Lymphknoten, der Leber und dem Skelettsystem mit je 30%, sowie den Nebennieren mit 19% [6]. Das Gehirn ist in 3-6%, die kontralaterale Niere in 11% der Fälle betroffen [7].

1.2 Klassifikationen, Stadieneinteilung und Prognose

1.2.1 Stadieneinteilung und Prognose

Basierend auf der TNM-Klassifikation erfolgt gemäss der UICC (Union internationale contre le cancer) und des AJCC (American Joint Committee on Cancer) eine Einteilung in vier Stadien. Im amerikanischen Raum wird auch die Erkrankungsausbreitung nach

den Kriterien von HOLLAND und ROBSON [8] vorgenommen; eine Gegenüberstellung der beiden Klassifikationen ist in Tab. 1a dargestellt. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Klassifikationen besteht insbesondere bei den lokal begrenzten Tumorstadien.

Einteilung nach HOLLAND und ROBSON		TNM		
I	Tumor innerhalb der Nierenkapsel	T1-2	N0	M0
II	Infiltration der Nebenniere, des perirenal Fettgewebes, ohne Überschreitung der Gerota-Faszie	T3a	N0	M0
III	Regionale Tumorausbreitung mit			M0
	A: Ausdehnung des Tumors in die Nierenvenen oder Vena cava	T3b-c	N0	M0
	B: regionärem Lymphknotenbefall	T1-3a	N1	M0
	C: Kombination von A und B	T3b-c	N1	M0
IV	A: Befall benachbarter Organe (außer der Nebenniere)	T4	N0-1	M0
	B: Fernmetastasen	T1-4	N0-1	M1

Tab. 1a: Gegenüberstellung der TNM-Klassifikation und der Einteilung nach HOLLAND und ROBSON.

UICC-Stadium	TNM	5-Jahres-Überlebensrate (%)
I	T1, N0, M0	70-96
II	T2, N0, M0	50-88
III	T3a, N0, M0	65-80
	T3b-c, N0, M0	40-60
	T1/2, N1, M0	20-30
	T3, N1, M0	10-20
IV	jedes T4	0-20
	jedes N2	0-20
	jedes M1	0-10

T1	Tumor < 7cm, auf die Niere begrenzt		
T1a	Tumor < 4cm		
T2	Tumor > 7cm, auf die Niere begrenzt		
T3	Infiltration der Nebenniere, des perirenal Fettgewebes oder der Venen, ohne Überschreitung der Gerota-Faszie	N1	Metastase in einem solitären regionären Lymphknoten
T3a	Infiltration der Nebenniere oder des perirenal Fettgewebes	N2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten
T3b	Ausdehnung des Tumors in die Nierenvenen oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells		
T3c	Ausdehnung des Tumors in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells	M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
T4	Durchbruch der Gerota-Faszie	M1	Fernmetastasen

Tab. 1b: 5-Jahresüberlebensraten (%) und TNM-Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms (nach [3;9;10]).

Die HOLLAND-ROBSON-Klassifikation berücksichtigt hierbei die Größe des Primärtumors nicht, obwohl diese inzwischen ein Prognosekriterium darstellt [11]. Bei weiter fortgeschrittenen Stadien ist der Unterschied der Einteilungen bezüglich der Prognose von nicht mehr so großer Bedeutung, da inzwischen auch die HOLLAND-ROBSON-Klassifikation hinsichtlich des prognostisch ungünstigeren Lymphknotenbefalls im Stadium III [10], sowie nach dem Vorhandensein von Fernmetastasen im Stadium IV differenziert. Die TNM-Klassifikation wurde im Zuge des Fortschritts von Diagnostik und Therapie 1997 und 2002 überarbeitet, was beim Vergleich von Überlebensraten und Therapieergebnissen zu berücksichtigen ist. 1997 wurde die das Stadium T1 charakterisierende Tumorgöße von 2,5 cm auf 7 cm erhöht. 2002 wurde das Stadium T1a mit einer Tumorausdehnung bis maximal 4 cm definiert [11;12]. Eine Darstellung der TNM-Klassifikation und der 5-Jahres-Überlebensraten ist in Tab. 1b gegeben.

Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit metastasiertem NZK (mNZK) liegt unbehandelt unter 5% und bleibt trotz neuer Therapieoptionen schlecht [5]. In den letzten Jahrzehnten wurde daher stets nach Screeningmarkern oder prädiktiven Faktoren, die für ein therapeutisches Ansprechen herangezogen werden können, gesucht. Von verschiedenen Autoren wurden Risikostratifizierungen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Zytokintherapie vorgenommen. Eine diesbezüglich schlechte Prognose hatten vor allem Patienten, die nicht nephrektomiert waren und extrapulmonale Metastasen, insbesondere Knochenmetastasen, aufwiesen oder sich in schlechtem Allgemeinzustand befanden. Zudem stellten laborchemisch erhöhte LDH- und Serumkalziumwerte oder ein verminderter Hämoglobingehalt einen negativen prädiktiven Faktor dar [13;14]. Diese Kriterien finden inzwischen als sogenannter „Motzer-Score“ oder MSKCC-Kriterien (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) ihre Anwendung [14]. In der vorliegenden Studie wurde die von JONES ET AL. [15] und PALMER ET AL. [16] erarbeitete, sehr einfach durchzuführende Risikobewertung eingesetzt. Ein Zeitintervall von weniger als zwei Jahren nach der Diagnosestellung bis zur Metastasierung, mehr als eine Metastasenlokalisation und ein Allgemeinzustand von mehr als 0 Punkten auf der ECOG-Skala (Eastern Cooperative Oncology Group) gehen mit jeweils einem Punkt in die Bewertung ein. Patienten, die einen Punktwert von 0 aufwiesen, wurden als Gruppe mit „sehr guter“, Patienten mit einem Punktwert von 1 mit „guter“ Prognose definiert. Ein Punktwert von 2 entsprach einer „intermediären“, ein Punktwert von 3 einer „ungünstigen“ Prognosegruppe.

1.2.2 Histologische Klassifikation

Zunehmende Erkenntnisse über den Einfluss genetischer Veränderungen bei der Entstehung und Progression des NZK führten zur derzeit von der UICC und dem AJCC angewandten histopathologischen Klassifikation. Entsprechend ihrer zytomorphologischen und zytogenetischen Eigenschaften werden die malignen Nierentumore in das konventionelle, papilläre, chromophobe und Ductus-Bellini-Karzinom sowie in nicht klassifizierbare Karzinome eingeteilt [17]. Bei den benignen Tumoren werden das metanephritische, das papilläre und das onkozytäre Adenom (Onkozytom) unterschieden. Diese Einteilung geht auf die von THOENES und STÖRKELE erarbeitete sogenannte „Mainz-Klassifikation“ zurück [18], deren Bezeichnungen im deutschen Sprachraum und daher auch in dieser Arbeit noch ihre Anwendung finden. Grundlegende Kriterien dieser Klassifikation sind der Tumorzelltyp, das Wachstumsmuster und der Differenzierungsgrad. Das klarzellige NZK der Mainz-Klassifikation entspricht dem konventionellen NZK der UICC-Klassifikation und wird in 70-80% der Fälle diagnostiziert. Genetisch besteht eine Assoziation mit Deletionen des kurzen Armes des Chromosoms 3 (3p) und somatischen Mutationen im VHL-Gen [17]. Das papilläre NZK wurde als chromophiles oder tubulo-papilläres NZK bezeichnet. Es wird in 10-15% festgestellt und zeigt häufig einen Verlust des Y-Chromosoms oder Trisomien u.a. der Chromosomen 7 und 17 [17]. Mit einer Häufigkeit von 5 % tritt das chromophobe NZK auf, das genetisch mit Monosomien verschiedener Chromosomen oder mit einer Hypodiploidie assoziiert ist [17]. Das die Sammelrohrhauptzellen imitierende Ductus-Bellini-Karzinom ist in weniger als 1% der Fälle anzutreffen. Charakterisierende zytogenetische Befunde sind noch nicht bekannt [17]. Es ist vornehmlich in der Markzone lokalisiert und zeichnet sich durch ein stark invasives Wachstum aus. Seine Tendenz, auf das Nierenbecken überzugreifen, macht die Abgrenzung zum Urothelkarzinom oft schwierig. Papilläre und metanephritische Adenome treten in weniger als 1%, das Onkozytom in etwa 5 % der Fälle auf. Mit dem klarzelligen und papillären Tumorzelltyp gehen somit die meisten NZK von den Zellen des proximalen Tubulus aus, während sich das chromophobe und Ductus-Bellini-Karzinom, sowie das benigne Onkozytom auf Zellen des Sammelrohrsystems zurückführen lassen. Vom klarzelligen, chromophilen, chromophoben und dem Ductus-Bellini-Karzinom existieren auch eosinophile (granuläre), sowie spindel- und pleomorphzellige Varianten [18]. Etwa 4-5% der Tumore können keinem bestimmten Subtyp zugeordnet werden und sind mit einer ungünstigen Prognose verbunden [11].

1.2.3 Molekulare Pathogenese

1993 wurde das krankheitsverursachende Gen des von-Hippel-Lindau-Syndroms auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p25) identifiziert und nach den Erstbeschreibern dieser Erkrankung benannt [19]. Seine Expression ist während der Embryogenese insbesondere in den Geweben des Nervensystems sowie den proximalen Tubuli und der Henle-Schleife der Niere ausgeprägt [19;20]. Diese Gewebe repräsentieren u.a. die bei diesem Syndrom betroffenen Organe. Inzwischen ist bekannt, dass auch Patienten mit sporadischem NZK zu über 70% eine Veränderung im VHL-Gen aufweisen [21-23].

Das VHL-Genprodukt besitzt Tumorsuppressorfunktionen. In einem Multiproteinkomplex, dem sog. CBC^{VHL} -Ubiquitin-Ligase-Komplex, ist es als Adaptorprotein am kontrollierten Abbau des hypoxieinduzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α) beteiligt. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α über das VHL-Protein (pVHL) gebunden, ubiquityliert und am Proteasom abgebaut. Unter Hypoxie oder bei Defekten des pVHL kommt es zur Akkumulation von HIF-1 α mit Translokation in den Zellkern. Nach Dimersierung mit HIF-1 β führt dies zur Transkription hypoxieinduzierter Gene wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet derived Growth Factor) und TGF- α (Transforming Growth Factor- α) [3;24;25]. VEGF spielt eine Rolle bei der Angiogenese und ist in 70% der NZK-Fälle erhöht [23]. PDGF ist an der Stimulation des Tumorwachstums beteiligt. Die Überexpression seines Rezeptors wurde bei höhergradig entdifferenzierten NZK festgestellt und korrelierte mit der Erkrankungsprogression [26]. Weiterhin lag bei 50-90% der NZK eine Überexpression des EGF-Rezeptors (EGF-R; Epidermal Growth Factor-Rezeptor), an den auch TGF- α bindet, vor [24]. Die Bindung dieser Wachstumsfaktoren an ihre entsprechenden Rezeptoren führt zur Dimerisierung mit nachfolgender Aktivierung der jeweiligen Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Unter Kontrolle der RTK steht u.a. der Ras-Raf-Signalweg, dessen unphysiologische Aktivierung an der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen beteiligt ist. Über den Signalweg der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) und der Kinase AKT wird die Nicht-Rezeptor-Kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin) induziert, die wiederum für eine gesteigerte HIF-1 α -Aktivität verantwortlich ist (zusammengefasst in [24;25;27]). Letztendlich führt die Aktivierung dieser Signalwege zu einer veränderten Regulation von Genprodukten, die an der Zellzyklusprogression, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung beteiligt sind. Für eine Rezeptortyrosinkinase kodiert auch das auf Chromosom 7 (7q31)

gelegene c-MET-proto-Onkogen. Mutationen sind mit hereditären und sporadischen Formen des papillären NZK assoziiert [3].

Tyrosinkinase haben somit eine zentrale Rolle bei der Genese des NZK, was auch die Wirksamkeit der in letzter Zeit vermehrt eingesetzten Multikinaseinhibitoren (MKI), wie z.B. Sorafenib und Sunitinib, erklärt. Aber auch die Effekte von Inhibitoren der Nicht-Rezeptor-Kinase mTOR (z.B. Temsirolimus und Everolimus) sowie dem monoklonalem Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab liegen in der Unterbrechung dieser Signalwege begründet.

1.3 Lokale Therapieoptionen des Nierenzellkarzinoms

1.3.1 Chirurgische Therapie

Während bei symptomatischen oder auf die Niere begrenzten Tumoren stets eine operative Therapie angestrebt werden sollte, wurde die Nephrektomie in Zeiten der Zytokintherapie auch unter tumorimmunologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Sowohl in den prospektiven Studien der EORTC (European Organisation of Research and Treatment of Cancer) und SWOG (Southwest Oncology Group) als auch der kombinierten Analyse beider Studien wurde ein Vorteil im Sinne eines Überlebensvorteils für nephrektomierte Patienten mit anschließender Interferon- α -Therapie gesehen (13,6 Monate vs. 7,8 Monaten) [28-30]. Die Entfernung von Metastasen wird derzeit nur bei einer Anzahl bis drei empfohlen, falls diese alle resektabel erscheinen. Sind nicht alle Metastasen resektabel, sollten nur symptomatische Metastasen oder Metastasen an Lokalisationen mit Frakturgefährdung entfernt werden [25;30]. Nach Einführung von Substanzen mit gezieltem molekularem Angriffspunkt, der sog. „*targeted therapy*“ (engl.: zielgerichtete Therapie) ist jedoch die Rolle der chirurgischen Therapie im metastasierten Stadium erneut zu prüfen [31].

Bei ausreichender Funktion der Gegenniere stellt die *en-bloc*-Tumornephrektomie mit Entfernung der Fettkapsel, Gerota-Faszie, ipsilateralen Nebenniere und der regionären Lymphknoten derzeit noch den Standardeingriff dar. Die routinemässige Adrenaektomie wird jedoch inzwischen kontrovers diskutiert [3]. Für Tumore des TNM-Stadiums T1a kann auch die organerhaltende partielle sogenannte „*nephron-sparing*“-Nephrektomie in Erwägung gezogen werden. Mit 5- und 10-Jahresüberlebensraten von über 90% waren die Ergebnisse denen der radikalen

Nephrektomie gleichwertig [32]. Bei eingeschränkter Nierenfunktion, bilateralen Tumoren oder Einzelnieren ist hingegen ein Organerhalt anzustreben. Sowohl die partielle als auch radikale Nephrektomie werden bei vergleichbaren Ergebnissen inzwischen vermehrt minimalinvasiv durchgeführt. Vorteile werden in einer kürzeren Operationsdauer und Hospitalisationszeit sowie dem geringeren postoperativen Analgetikabedarf gesehen [33;34].

1.3.2 Strahlentherapie

Nierenzellkarzinome gelten als weitgehend strahlenresistent. Sowohl durch die alleinige adjuvante Bestrahlung wie auch die Kombination mit einer Chemotherapie konnten keine wesentlichen Erfolge erzielt werden. Die Rolle der Radiotherapie liegt heute vielmehr in der stereotaktischen Bestrahlung zerebraler Metastasen oder der palliativen Behandlung symptomatischer Knochenmetastasen [25], wobei in letzter Zeit die höherenergetische stereotaktische Bestrahlung auch zur Behandlung nicht resektabler Primärtumore oder extrakranieller Metastasen angewandt wird [35].

1.4 Systemische Therapieoptionen des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom weist neben der Strahlenresistenz eine hohe Resistenz gegenüber Hormon- und Chemotherapeutika auf. Trotz des teilweisen Nachweises von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Effekten im Tiermodell sind Medroxyprogesteronacetat (MPA) und Tamoxifen bei der Behandlung des mNZK als wirkungslos anzusehen. Bisher wurden sie zumeist im Kontrollarm randomisierter Studien eingesetzt und wiesen Ansprechraten von 2% auf [25].

Chemotherapeutische Substanzen zeigten sowohl als Mono- wie auch als Polychemotherapie oder in Kombination mit Hormontherapeutika kaum eine Wirkung [36;37]. Erst als Kombinationspartner der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- α wurde 5-FU im Rahmen chemoimmuntherapeutischer Konzepte wieder Gegenstand der Diskussion.

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems und werden in vier Klassen unterteilt: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Wachstumsfaktoren. In Deutschland sind Interferon- α (IFN- α) und Interleukin-2 (IL-2) zur Behandlung des mNZK zugelassen. Nach Klonierung und Möglichkeit der rekombinanten Herstellung haben sich in den 1990er Jahren zytokinbasierte Therapien

zunehmend zur Behandlung des mNZK etabliert und stellen bis vor kurzem in Deutschland einen faktischen Standard dar [38]. HULAND ET AL. [38] zufolge wurde im Jahr 2000 an 147 Zentren eine Immuntherapie durchgeführt, wobei vorwiegend die Kombination von subcutanem (sc.) IL-2 und IFN- α , teilweise zusammen mit 5-FU angewandt wurde.

In den letzten Jahren wurden mehrere prospektive, randomisierte, u.a. auch Phase-III-Studien, zum Einsatz zytokinbasierter Therapien publiziert, die das therapeutische Vorgehen beim mNZK verändert haben (siehe Tab. 3 in Kap. 1.4.5). Zudem haben sich inzwischen auch mit der Einführung neuer Substanzen der „targeted therapy“ neue Wege in der Behandlung des metastasierten NZK eröffnet, obwohl teilweise Daten zum Langzeitüberleben noch ausstehen. Derzeit werden in mehreren Phase-III-Studien, wie der dreiarmligen randomisierten Doppelblindstudie ASSURE der ECOG (Adjuvant Sorafenib or Sunitinib in Unfavorable Renal Cell Carcinoma; ECOG 2805), der SORCE- (Sorafenib in Patients with Resected Renal Cell Carcinoma) und STAR-Studie (Sunitinib Trial in Advanced Renal Cancer), die Kinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib gegenüber Placebo getestet.

Angesichts der Fülle der Studiendaten und der neuen Therapieoptionen ist die Behandlung des NZK komplexer geworden. Therapieempfehlungen unterliegen einem ständigen Wandel, so dass ein Standard derzeit nicht existiert. Aufgrund der Studienlage werden gemäss des NCCN (National Comprehensive Cancer Network) die in Tab. 2 dargestellten Empfehlungen gegeben [39].

Therapieempfehlung					
Prognosegruppe	Erstlinientherapie			Zweitlinientherapie	Drittlinientherapie
gut	Zytokine	Bevacizumab plus IFN- α	Sunitinib (Kat. 1)	Sorafenib (Kat. 1/2A) Sunitinib (Kat. 1/2A) Temsirolimus (Kat. 2/B) Everolimus	Everolimus Im Rahmen kontrollierter klinischer Studien
intermediär					
ungünstig		Temsirolimus (Kat. 1)			

Tab. 2: Algorithmus zur Behandlung des metastasierten, vorwiegend klarzelligen Nierenzellkarzinoms nach den Empfehlungen der NCCN (Kategorien 1-3) [39].

Zytokine werden als Erstlinientherapie nur noch für Patienten mit gutem MSKCC-Prognosescore empfohlen, da in dieser Patientengruppe - insbesondere bei IL-2 - teilweise lang andauernde komplette Remissionen beobachtet wurden [40]. Nicht mehr empfohlen wird die Gabe von Zytokinen für Patienten der intermediären

Prognosegruppe, nachdem der PERCY-Quattro-Studie (Programme Etude Rein Cytokines) zufolge kein Vorteil für dieses Patientenkollektiv bestand [41]. Für diese Patienten wird nun zu einer Therapie mit Sunitinib geraten [42]. Ein Überlebensvorteil für Patienten mit ungünstigen Prognosefaktoren konnte unter der Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus beobachtet werden [43], welcher nun zur Erstlinienbehandlung für Patienten dieser Prognosegruppe empfohlen wird. Aufgrund der Ergebnisse der Phase-III-Studie AVOREN (Avastin® for Renal Cell Cancer) wurde der monoklonale Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab im Dezember 2007 in der EU zur Erstlinienbehandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen [44;45]. Interessanterweise war eine Verbesserung des progressionsfreien Intervalls sowohl für Patienten der guten als auch intermediären MSKCC-Prognosegruppe zu verzeichnen. Bei Versagen der Erstlinientherapie mit einer der o.g. Substanzen wird eine Zweitlinientherapie mit Sorafenib [46] oder Everolimus [47] empfohlen.

Daneben existieren weitere therapeutische Ansätze mit angiogenesehemmenden Substanzen, monoklonalen Antikörpern sowie unterschiedliche Vakzinierungsstrategien, die Gegenstand präklinischer und klinischer Studien sind. Weiterhin werden Bisphosphonate, z.B. Pamidron- oder Zoledronsäure, bei der Progression ossärer Metastasen insbesondere zur Reduktion der Schmerzsymptomatik, eingesetzt. Neben der Hemmung der Osteoklasten wurden in vitro auch Antitumoreffekte wie Apoptoseinduktion, Proliferations- und Angiogenesehemmung beschrieben [48]. Zudem konnte für die zur dritten Generation der Bisphosphonate zählende Midronsäure, sowohl in vitro, als auch im Mausmodell ein verstärkter antiproliferativer Effekt in der Kombination mit Typ-I-Interferonen beobachtet werden [49].

1.4.1 Multikinaseinhibitoren (MKI) und mTOR-Inhibitoren

Zunächst wurden relativ spezifische RTK-Inhibitoren entwickelt, später gewannen Inhibitoren verschiedener Kinasen, sog. Multikinaseinhibitoren (MKI), wie z.B. Sorafenib und Sunitinib, und auch die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus an Bedeutung [24;25;27;47].

1.4.1.1 Multikinaseinhibitoren: Sunitinib (SU-11248) und Sorafenib (Bay43-9006)

Sunitinib ist ein oral applizierbarer Oxindol-Tyrosinkinaseinhibitor, der RTK der PDGF- und VEGF-Rezeptoren sowie weitere Tyrosinkinasen hemmt [50]. Sorafenib wird zur

Stoffgruppe der Di-Aryl-Harnstoffe gezählt und wurde zunächst als Inhibitor von Raf-1, einem Schlüsselenzym des Ras-Raf-Signalweges, entwickelt. Weitere Untersuchungen zeigten einen zusätzlichen Effekt auf die RTK der VEGF- und PDGF-Rezeptoren [51]. Basierend auf Phase-II-Studien, die für beide Substanzen zwar keine kompletten Remissionen (CR, engl.: *complete response/ remission*), aber einen hohen Anteil teilweise lang andauernder Erkrankungsstabilisierungen (SD, engl.: *stable disease*) und Verbesserungen des progressionsfreien Intervalls ergaben [52;53], wurden nachfolgende Phase-III-Studien initiiert.

Sunitinib wurde mit IFN- α an 750 nicht vorbehandelten Patienten verglichen. Wiederum wurden keine Vollremissionen beobachtet, jedoch lag der Anteil der partiellen Remissionen (PR, engl.: *partial response/ remission*) mit 31% in der Sunitinibgruppe über dem der IFN- α -Gruppe (6%). Erkrankungsstabilisierungen konnten in 48% der Fälle erreicht werden. Das progressionsfreie Intervall war mit 11 Monaten im Sunitinib-Arm gegenüber 5 Monaten im IFN- α -Arm signifikant verlängert. Die Endpunkte zur Berechnung des Gesamtüberlebens waren noch nicht erreicht, wobei jedoch der Trend eines Überlebensvorteils für Patienten der Sunitinib-Gruppe bestand [42].

In der TARGET-Studie (Treatment Approaches in Renal Cell Cancer Global Evaluation) wurde mit einem progressionsfreien Intervall von 5,5 Monaten (vs. 2,8 Monaten in der Placebogruppe) und einem Gesamtüberleben von 19,3 Monaten (vs. 15,9 Monaten in der Placebogruppe) ein Vorteil für Sorafenib festgestellt. Komplette Remissionen konnten wiederum nicht beobachtet werden. Jedoch war mit einem größeren Anteil an Erkrankungsstabilisierungen (78%) und 2% PR das Ansprechen gegenüber der Placebogruppe (55% SD, 0% PR) verbessert [46]. Die Studie wurde an 903 vorbehandelten Patienten durchgeführt. Daten zur Anwendung von Sorafenib als Erstlinientherapie stehen noch aus, so dass es seinen Einsatz derzeit im Rahmen der Zweitlinientherapie findet [31].

Als Dosierung wird für Sunitinib die tägliche Gabe von 50 mg oral (p.o.) über vier Wochen mit einer anschließenden zweiwöchigen Pause, für Sorafenib die kontinuierliche Gabe von 400 mg p.o. täglich empfohlen. Als unerwünschte Wirkungen wurden für beide Substanzen v.a. Abgeschlagenheit, Durchfall, Übelkeit und ein Hand-Fuß-Syndrom (palmare-plantare Erythrodysästhesie) beschrieben, wobei die Verträglichkeit mit einem nur geringen Anteil an Toxizitäten Grad 3 und 4 relativ gut war [50;54]. Bei Sorafenib kann zudem eine Hypophosphatämie auftreten.

1.4.1.2 mTOR-Inhibitoren: Temsirolimus (CCI-779) und Everolimus (RAD001)

Die Kinase mTOR wird über den PI3-K-Weg aktiviert und führt über eine verstärkte Translation und Proteinstabilisierung zu einer gesteigerten HIF-1 α -Aktivität [27]. Temsirolimus und Everolimus haben als mTOR-Inhibitoren somit einen hemmenden Einfluss auf HIF-1 α und die nachgeschaltete Expression von Wachstumsfaktoren.

In einer Phase-III-Studie an 626 Patienten mit ungünstigem Risikoprofil wurde Temsirolimus gegenüber IFN- α und der Kombination beider Substanzen verglichen [43]. Nachdem eine Verbesserung des Gesamtüberlebens auf 10,9 Monate im Temsirolimusarm (vs. 7,3 Monate im IFN- α und 8,4 Monate im Kombinationsarm) zu verzeichnen war, wird es nun zur Erstlinientherapie für Patienten mit ungünstigem Prognosescore empfohlen. Ein Vorteil im Sinne eines verlängerten progressionsfreien Intervalls (4,0 Monate vs. 1,9 Monate Placebo) konnte für Everolimus in einer Phase-III-Studie an vorbehandelten Patienten festgestellt werden [47]. Basierend auf diesen im Jahr 2008 auf dem ASCO-Kongress vorgestellten Ergebnissen wird Everolimus nun zur Zweit- und Drittlinientherapie empfohlen.

In o.g. Studien wurden 25 mg Temsirolimus einmal wöchentlich als intravenöse Kurzinfusion appliziert, Everolimus wurde in einer Dosierung von 10 mg p.o. täglich gegeben. Als Nebenwirkungen Grad 3-4 traten nach der Gabe von Temsirolimus Störungen des Glucose- und Lipidstoffwechsels mit Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie, nach der Gabe von Everolimus vor allem Stomatitiden, eine Anämie und ein Gewichtsverlust auf.

1.4.2 Anti-VEGF-Antikörper: Bevacizumab

Der monoklonale Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab bietet eine weitere Möglichkeit, in den VEGF-Signalweg und somit in die Tumorangiogenese und Metastasierung einzugreifen.

Die an 649 Patienten durchgeführte Phase-III-Studie AVOREN (Avastin® for Renal Cell Cancer) wies einen Vorteil einer zusätzlichen Gabe von Bevacizumab im Rahmen einer IFN- α -Therapie auf. Hierbei konnte nahezu eine Verdopplung des progressionsfreien Intervalls auf 10,2 Monate (vs. 5,4 Monate in der IFN- α Gruppe) sowie eine Verbesserung der Ansprechrate auf 31% (vs. 13% in der IFN- α Gruppe) verzeichnet werden. Es profitierten sowohl Patienten der guten als auch intermediären MSKCC-Prognosegruppe [44].

Protokollgemäß wurden 9 Mio.IU IFN- α 2a sc. dreimal wöchentlich und 10 mg/kgKG Bevacizumab alle zwei Wochen iv. appliziert, wobei nach dem Auftreten höhergradiger Toxizitäten eine Dosisreduktion von IFN- α auf 6 Mio.IU bzw. 3 Mio.IU IFN- α zugelassen war. Eine retrospektive Subgruppenanalyse ergab weiterhin, dass bei dieser Kombinationstherapie eine IFN- α -Dosisreduktion zur Beherrschung von Nebenwirkungen keine Auswirkungen auf das progressionsfreie Überleben hatte [45]. Bevacizumab bedingte Nebenwirkungen sind zumeist Proteinurie, arterielle Hypertonie, eine vermehrte Blutungsneigung sowie Wundheilungsstörungen.

1.4.3 Immunogenität des Nierenzellkarzinoms und systemische Immuntherapie

Beobachtungen spontaner Remissionen, Rückbildungen von Metastasen nach Nephrektomie und teilweise lang andauernde Erkrankungsstabilisierungen hatten eine Immunogenität des Nierenkarzinoms vermuten lassen [55]. Weitere Hinweise ergaben sich aus den immunhistochemischen Nachweisen tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL). Diese wiesen nach Kultivierung und Stimulation in Gegenwart von IL-2 und autologen Tumorzellen eine tumorzellspezifische Zytotoxizität, sowie die Sekretion von GM-CSF, TNF- α und IFN- γ auf [56]. In den 1980er Jahren wurden TIL nach In-vitro-Expansion beim NZK therapeutisch, teilweise in Kombination mit IL-2, eingesetzt [57]. TIL stellen eine heterogene Population aus größtenteils zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen und CD4⁺-T-Zellen, sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar [58]. T-Zellen, aber auch NK-Zellen exprimieren IL-2-Rezeptoren, wenngleich die Rezeptoraffinität der NK-Zellen geringer ist. Durch IL-2 wird die klonale Expansion der T-Zellen induziert. Nach deren Aktivierung sezernieren diese vermehrt IL-2 und erhöhen durch die Expression der α -Kette (CD25) die Affinität ihres IL-2-Rezeptors (IL-2-R) [59].

Notwendig für die spezifische Aktivierung der T-Zellen ist die Erkennung des antigenen Peptidfragments im Kontext von MHC-Molekülen (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) durch den T-Zell-Rezeptor (CD3). Zudem ist die Bindung der auf professionellen APC (APC, engl.: *antigen presenting cell*) exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) an ihren entsprechenden Liganden CD28 auf der T-Zelle essentiell. Erhält die T-Zelle kein kostimulatorisches Signal, resultiert dies in einem als Anergie bezeichneten areaktiven Zustand [60]. Zu den professionellen APC werden B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DC, engl.: *dendritic cell*) gezählt. Normalerweise exprimieren nur diese Zellen kostimulatorische Moleküle. Interessanterweise wurden CD80 und CD86 aber auch auf

T-Zellen nachgewiesen [61-63]. Dieses Phänomen ist jedoch bisher nicht vollständig geklärt.

DC stellen die potentesten Zellen unter den APC dar. Sie können Antigene, die von Tumoren sezerniert oder nach Zellzerfall freierwerden, aufnehmen und prozessieren. Nach ihrer Differenzierung zu reifen DC vermögen sie diese tumorassoziierten Antigene (TAA) zum einen über MHC-I-Moleküle den CD8⁺-T-Zellen, zum anderen über MHC-II-Moleküle den CD4⁺-T-Zellen zu präsentieren [60]. MHC-I-Moleküle, die endogene Proteine nach entsprechender Prozessierung präsentieren, werden auf allen kernhaltigen Körperzellen und auch auf Tumorzellen exprimiert. Hingegen erfolgt die Präsentation über MHC-II-Moleküle, von zumeist extrazellulären oder sezernierten Antigenen, auf professionellen APC [60]. Entscheidend für die Induktion einer T-Zell-Antwort ist der Differenzierungs- und Reifungszustand der DC, da reife DC neben den MHC-Oberflächenproteinen die notwendigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren. Durch Einflüsse des Tumormicromilieus, des sog. „*tumor microenvironment*“ (engl.), kann ihre Reifung und Differenzierung beeinträchtigt werden. Dies kann die Induktion von Anergie oder suppressorischer Zellen, wie z.B. regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) oder myeloischer Supressorzellen, zur Folge haben und eine spezifische Immunantwort gegenüber TAA unterbinden [64]. Zusätzlich zu den Signalen über den T-Zell-Rezeptor und die kostimulatorischen Moleküle wird für eine effektive Aktivierung der CD8⁺-Zellen inzwischen ein „drittes Signal“ über IL-12 bzw. Typ-I-Interferone diskutiert [65]. Wurden CD8⁺-T-Zellen erfolgreich aktiviert, können sie Tumorzellen, die ein entsprechendes Peptidfragment im Kontext von MHC-I-Molekülen präsentieren, über die Freisetzung von TNF- α , Perforinen oder die Induktion von Apoptose zerstören [66]. CD4⁺-T-Zellen können nach ihrer Aktivierung abhängig vom Zytokinmilieu zu T_H1-Zellen (T-Helfer-1-Zellen) oder T_H2-Zellen (T-Helfer-2-Zellen) differenzieren. In letzter Zeit wurde ein weiterer, IL-17-produzierender T-Helfer-Subtyp T_H17 identifiziert. Über seine Funktionen und mögliche Rolle u.a. bei Autoimmunerkrankungen wird aber noch spekuliert [67]. T_H1-Zellen unterhalten und fördern die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen, zum einen durch ihr Zytokinprofil, zum anderen durch Stimulation der DC über die Bindung an den CD40-Rezeptor. Dendritische Zellen, die über die Interaktion ihres CD40-Rezeptors und des CD40-Liganden auf der T-Zelle stimuliert wurden, sind nach Differenzierung und Reifung in der Lage, große Mengen IL-12 zu produzieren. IL-12 induziert die Differenzierung der T-Zellen in Richtung T_H1 und Sekretion von IFN- γ ,

welches wiederum die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL, engl.: *Cytotoxic T-Lymphocytes*) fördert [66].

Experimente mit aus NZK-Tumorpräparaten isolierten TIL zeigten aber nicht nur für CD8⁺-T-Zellen, sondern auch für CD4⁺-T-Zellen eine zytotoxische Wirkung [58]. Andererseits wiesen einige CD4⁺-T-Zellen nach ihrer Aktivierung nur eine insuffiziente IL-2-Sekretion auf und zeigten eine vermehrte Differenzierung in Richtung T_H2 [68]. Dies war, ebenso wie ein erhöhter Anteil an CD25 exprimierenden CD-4⁺-T-Zellen, vor allem bei Progression der Erkrankung festzustellen [69]. CD25 repräsentiert die α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird auf aktivierten T-Lymphozyten, aber auch auf T_{reg} exprimiert. T_{reg} zeichnen sich u.a. durch eine besonders hohe Expression von CD25 (CD4⁺/CD25⁺⁺-T-Zellen), sowie des intrazellulären Proteins FOXP3 (Transcription Factor Forkhead box P3) aus und werden mit der Induktion von Anergie, Toleranz und Inhibition der Effektorzellfunktionen in Verbindung gebracht [70;71]. T_H2-Zellen fördern die Antikörperbildung. Sie hemmen aber auch die Ausbildung einer T_H1-Antwort und somit den für die Tumorelimination wichtigen inflammatorischen Prozess. So war die Expression von T_H1-Chemokinen mit einer günstigeren Prognose und Rezidivfreiheit nach Nephrektomie assoziiert [72]. Neben den tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten stellen die NK-Zellen eine weitere Population der TIL dar. NK-Zellen vermögen Tumorzellen aufgrund des Fehlens von MHC-I-Rezeptoren oder der Expression stressinduzierter Gene auf deren Oberfläche direkt abzutöten [73]. Beim NZK waren NK-Zellen mit Voranschreiten der Erkrankung im peripheren Blut vermindert nachweisbar [69].

Neben Veränderungen auf der Effektorzelleseite, wurden beim NZK aber auch Veränderungen auf Seiten der Antigenpräsentation beschrieben. Im Vergleich zum nicht metastasierten Stadium wurde mit Fortschreiten der Erkrankung eine verminderte MHC-I-Expression festgestellt und mit einer herabgesetzten Antitumoraktivität in Verbindung gebracht [74]. Weiterhin scheinen auch die DC beeinträchtigt zu sein. Während SCHWAAB ET AL. [75] in NZK-Tumorpräparaten zwar reife DC nachweisen konnten, wurde in Untersuchungen von TROY ET AL. [76] eine herabgesetzte Expression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern festgestellt, die einen suppressorischen Einfluss des „*tumor microenvironments*“ nahe legten.

Sowohl APC als auch Effektorzellen liegen zu einem gewissen Anteil im peripheren Blut vor. Zwar konnten RADMAYR ET AL. [77] zeigen, dass im peripheren Blut bei NZK-Patienten funktionelle DC vorhanden sind, die eine PHA-induzierte

Proliferation (PHA, Phytohämagglutinin) der T-Zellen unterstützten, durch SONG und Mitarbeiter [78] wurde jedoch in In-vitro-Experimenten eine verminderte Reifung der DC, die mit Störung der Migration, Adhäsion und chemotaktischer Funktionen assoziiert war, beschrieben. T-Zellen des peripheren Blutes von NZK-Patienten zeigten im Vergleich zu denen gesunder Probanden eine geringere zytolytische Aktivität, die jedoch durch die In-vitro-Gabe von IL-2 reversibel war [79]. Zudem war eine Polarisierung in Richtung T_H2 [80] und ein erhöhter Anteil an T_{reg} [81] festzustellen. Insbesondere unter einer IL-2-Therapie stieg der T_{reg} -Anteil im peripheren Blut an und blieb v.a. bei Patienten mit Erkrankungsprogredienz auf einem erhöhten Niveau [81].

Wie TIL, die nach entsprechender Stimulation eine vermehrte zytolytische Aktivität zeigten [82], scheint aber auch das Differenzierungs-, Aktivierungs- und Migrationspotential der DC beim NZK nicht zwangsläufig irreversibel beeinträchtigt zu sein, da unter einer kombinierten Zytokintherapie mit IL-2, IFN- α und GM-CSF vermehrt reife DC in NZK-Tumorpräparaten nachweisbar waren [83]. Diese Effekte sowie das Ansprechen zytokinbasierter Therapien stellen ein weiteres Indiz für die Immunkompetenz des Nierenzellkarzinoms mit der grundsätzlichen Möglichkeit einer immuntherapeutischen Intervention dar. Nachdem konventionelle Therapieoptionen nicht erfolgversprechend waren, wurden in den 1990er Jahren vermehrt immuntherapeutische Konzepte entwickelt und inzwischen in einer Reihe von Phase-III-Studien geprüft (siehe Tab. 3 in Kap. 1.4.5).

1.4.3.1 Interferone (IFN)

Interferone werden von verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers als Reaktion auf virale Infektionen oder nach Stimulation durch Antigene, Mitogene und andere Zytokine gebildet. Die meisten Untersuchungen ihrer Effekte fanden in vitro und im Kontext von Infektionen statt. Derzeit werden die IFN in drei Kategorien eingeteilt: Interferon- α (IFN- α), Interferon- β (IFN- β) und Interferon- γ (IFN- γ).

IFN- α wird zumeist von Leukozyten, IFN- β von Fibroblasten sezerniert. Diese beiden Interferone werden auch als Typ-I-Interferone bezeichnet und binden an gemeinsame Rezeptoren vieler Wirtszellen. Sie unterscheiden sich deutlich von dem Typ-II-Interferon IFN- γ . IFN- γ besitzt einen eigenen Rezeptor und wird hauptsächlich von den T-Effektor- und NK-Zellen bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort produziert [84]. Zudem induziert IFN- γ die Synthese von MHC-I- und MHC-II-Proteinen, wohingegen Typ-I-Interferone nur schwache MHC-II-Induktoren sind [85]. IFN- α fördert die Reifung,

Aktivierung und Migration dendritischer Zellen [86;87]. Im Kontext von Typ-I-IFN gereifte DC besaßen in vitro eine stimulatorische Kapazität und konnten neben einer potenten T_H1 -Antwort [85] auch eine $CD4^+$ -T-Zell-unabhängige Stimulation zytotoxischer T-Zellen induzieren [88]. IFN- α scheint hierbei einen direkten Effekt auf $CD8^+$ -T-Zellen zu haben und wird als „drittes Signal“ bei der Aktivierung von $CD8^+$ -T-Zellen diskutiert [65]. Weiterhin wurde für IFN- α und IFN- β sowohl in vitro, als auch in vivo eine vermehrte NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität beschrieben [85].

Nach der Klonierung und der Möglichkeit der rekombinanten Herstellung wurden Interferone zunehmend therapeutisch, auch zur Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Hierbei scheinen neben den immunmodulatorischen Effekten auch direkte antiproliferative und proapoptotische sowie antiangiogenetische Eigenschaften von Bedeutung zu sein [84]. DEKERNION [89] und QUESADA [90] berichteten erstmals 1983 und 1985 in einer Phase-I- bzw. Phase-II-Studie über Remissionen und Erkrankungsstabilisierungen beim NZK nach Applikation von IFN- α . Nachdem IFN- γ in einer placebokontrollierten Studie mit einer Ansprechrate von 4,4% (vs. 6,6% Placebo) keinen Effekt zeigte [91], und ebenso kein Vorteil von IFN- β [2;4;92] festzustellen war, erfolgten Behandlungen im Rahmen einer Interferontherapie zumeist mit IFN- α . Einer Metaanalyse der Cochrane Collaboration zufolge bestand mit einer Ansprechrate von 12,5%, einer verbesserten Ein-Jahres-Überlebensrate und einem verlängerten medianen Überleben von 11,4 Monaten ein Vorteil von IFN- α gegenüber MPA oder Vinblastin (VBL) [93]. Die beiden eingeschlossenen Phase-III-Studien des MRCRCC (Medical Research Council Renal Cancer Collaborators; Studie MRC RE01) [94] und der Arbeitsgruppe um PYRHÖNEN [95] zeigten weiterhin eine Assoziation mit einem verlängerten progressionfreien Intervall. Für Patienten, die auf eine IFN- α -Therapie ansprachen, wurde eine Remissionsdauer von 4-6 Monaten angegeben, die in einigen Fällen über Jahre anhielt [3;84]. Ein Vorteil einer IFN- α -Therapie war, wie bereits erwähnt, insbesondere nach einer vorangegangenen Nephrektomie festzustellen [28-30].

Rekombinantes IFN- α steht als IFN- α 2a oder IFN- α 2b zur Verfügung. In der Analyse der Cochrane Collaboration wurden diese zwar als gleichwertig angesehen [93], jedoch wurde über die Induktion neutralisierender Antikörper bei IFN- α 2a berichtet [96]. IFN- α wurde in unterschiedlichen Dosierungen sc. oder intramuskulär (im.) appliziert, wobei sich eine Dosierung von 9-10 Mio.IU/m²KÖF (KÖF, Körperoberfläche) dreimal wöchentlich durchgesetzt hat [84]. Spitzenspiegel werden bei einer

Bioverfügbarkeit von 80% nach 1-6 Stunden erreicht. Die Nebenwirkungen werden in akute und chronische Nebenwirkungen unterteilt (zusammengefasst in [84;97]). Dosisabhängig leiden nahezu alle Patienten initial an Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Myalgien. Weiterhin treten Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust auf. Eine Komedikation mit Paracetamol kann die grippeähnlichen Beschwerden lindern, nach 8-12 Stunden reduziert sich diese Symptomatik jedoch meist von selbst. Anfänglich können diese Nebenwirkungen nach jeder Gabe auftreten. Bei regelmässiger Anwendung kommt es nach durchschnittlich 3-5 Tagen infolge einer Tachyphylaxie zum Rückgang der Symptome. Chronische unerwünschte Wirkungen treten erst nach Wochen bis Monaten auf und umfassen Thrombozytopenie, Erhöhung der Transaminasen und Cholestaseparameter, Durchfall, Verstärkung einer Herzinsuffizienz sowie Hyper- oder Hypothyreoidismus. Dosislimitierend in der Langzeitanwendung sind vor allem neuropsychiatrische Nebenwirkungen, die von Depressionen bis hin zu psychotischen Symptomen reichen. Bringt eine Dosisreduktion keinen Erfolg, ist die Therapie zu beenden. Bei vergleichbarer Wirksamkeit war auch pegyliertes IFN- α gut verträglich [98]. Durch die kovalente Bindung mit Polyethylenglykol (PEG) wird die Halbwertszeit von IFN- α erhöht und die renale Clearance vermindert, was den Vorteil einer nur wöchentlichen Applikation sowie verminderter Spiegelschwankungen bietet.

1.4.3.2 Interleukin-2 (IL-2)

Für IL-2 ist kein direkter Effekt auf Tumorzellen bekannt. Seine Antitumoraktivität wird wohl über die Stimulation einer zellvermittelten Immunreaktion bewirkt, indem IL-2 die Proliferation und Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen fördert und durch die nachfolgend sezernierten Zytokine Zellen des unspezifischen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen aktiviert werden [59]. Allerdings werden durch IL-2 auch T_{reg} induziert, die eine immunologische Antitumoraktivität verhindern können [99].

Nachdem rekombinantes IL-2 zur Verfügung stand waren zahlreiche klinische Studien möglich. IL-2 wurde zunächst zusammen mit lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) erstmalig von der Arbeitsgruppe um ROSENBERG [100] zur Behandlung unterschiedlicher metastasierter Tumorerkrankungen und auch des NZK eingesetzt. LAK werden durch Inkubation autologer Lymphozyten des peripheren Blutes mit IL-2 generiert und wiesen in In-vitro-Experimenten eine Antitumorreaktivität auf [57]. Nach anfänglichen Erfolgen früher klinischer Studien war, wie auch bei der Behandlung mit

TIL, kein wesentlicher Vorteil hinsichtlich der Ansprechraten oder des Überlebens gegenüber einer alleinigen IL-2-Gabe festzustellen [57;59]. Eine retrospektive Analyse von Patienten, die im Rahmen von Phase-II-Studien mit hochdosiertem IL-2 (HD-IL-2) als Monotherapie behandelt wurden, ergab eine Gesamtansprechrates von 15% mit 7% CR und 8% PR [40]. Aufgrund dieser initialen Daten wurde IL-2 1992 in den USA zur Behandlung des mNZK zugelassen. In der Nachbeobachtung dieser Patientenkohorte konnten ein medianes Überleben von 16,3 Monaten, sowie bei einigen Patienten komplette Langzeitremissionen von mehr als 80 Monaten festgestellt werden [40]. Wegen der starken Toxizität war die HD-IL-2-Therapie nur in speziellen Zentren durchführbar, so dass zunehmend niedrigdosierte intravenöse und subcutane Therapieschemata entwickelt wurden. Nachdem mehrere Studien die Wirksamkeit von niedrigdosiertem sc. appliziertem IL-2 (sc-IL-2), teilweise in Kombination mit IFN- α , zeigten [101;102], wurde in einer bisher zweiarmigen Studie zum Vergleich von HD-IL-2 und zehnfach niedriger dosiertem iv. appliziertem IL-2 (nd-IL-2) ein dritter Arm mit sc-IL-2 eröffnet [103]. Das HD-IL-2-Therapieregime wies mit 21 % (CR 6%, PR 15%) eine höhere Gesamtansprechrates gegenüber sc-IL2 (10%; CR 2%, PR 8%) bei allerdings auch signifikant höherer Toxizität auf [103]. In einer 2005 durchgeführten Phase-III-Studie wurde bei ähnlichen Ansprechraten keine Überlegenheit der HD-IL-2-Therapie in Bezug auf das Gesamtüberleben (17 Monate vs. 13 Monate) oder das progressionsfreie Intervall (jeweils 3,1 Monate) gegenüber der Kombination von sc-IL-2 und IFN- α festgestellt [104]. Ein Vorteil ergab sich nur, wie auch vorangegangene Studien zeigten [40;103;105;106], für Patienten, die unter einer HD-IL-2-Therapie eine Vollremission erreichten.

Interleukin besitzt mit 1,7 Stunden eine kurze Halbwertszeit und weist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung auf [107]. Die biologischen Effekte treten jedoch erst nach Stunden auf. In der Literatur existieren verschiedene Dosierungsschemata. Sie reichen von 720.000 IU/kgKG (kgKG, Kilogramm Körpergewicht) bzw. 18×10^6 IU/m²KÖF als Bolus oder kontinuierliche iv. Gabe, bis hin zur niedrigdosierten sc. Applikation von 250.000 bis 125.000 IU/kgKG bzw. 5×10^6 IU/m²KÖF täglich über 5 Tage [59;108]. Limitierend ist insbesondere bei der HD-IL-2-Therapie eine ausgeprägte Toxizität, die oft eine intensivmedizinische Behandlung erfordert und mit einer Mortalität von 4% assoziiert ist [4;59]. Insbesondere infolge einer Schrankenstörung des Kapillarendothels (sog. „*Capillary-Leak-Syndrom*“, engl.) kommt es zu Volumenverschiebungen in den Extravasalraum. Die Folge sind generalisierte Ödeme, Lungenödem, Hypotension und

akutes Nierenversagen. Im europäischen Raum wurde daher vor allem die sc-IL-2-Therapie eingesetzt, die eine geringere Toxizität aufweist und auch den Vorteil einer ambulanten Behandlung bietet. Weitere Nebenwirkungen sind juckende Exantheme, Mukositis, Stomatitis, Enteritis sowie Übelkeit und Erbrechen. Nahezu alle Patienten leiden zwei bis drei Tage nach der Applikation an Fieber, Schüttelfrost, Myalgien und Arthralgien, während Autoimmunphänomene wie eine Thyreoiditis oder Vitiligo nur selten und zumeist bei prädisponierten Patienten auftreten [59;108].

1.4.3.3 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor GM-CSF reguliert die Proliferation und Differenzierung granulopoetischer, monozytärer und eosinophiler Vorläuferzellen und wurde daher nach myeloablativen Therapien eingesetzt [109]. Zudem wurden aber auch vielfältige immunmodulierende Einflüsse, sowohl auf die Antigenpräsentation als auch auf zelluläre Effektormechanismen, beschrieben. GM-CSF ist ein wichtiger Faktor für die Proliferation, Differenzierung und Migration antigenpräsentierender Zellen [109]. Nach der Applikation von GM-CSF wurde sowohl in vivo als auch in vitro eine gesteigerte Antigenpräsentation beobachtet, wobei auf Monozyten und Makrophagen MHC-Moleküle, auf DC zudem kostimulatorische Moleküle vermehrt exprimiert werden [87;110-113]. Insbesondere in Verbindung mit IFN- α scheint die Reifung der DC sowie die Induktion einer T-Zellantwort begünstigt zu sein [86;87]. GM-CSF wirkt aber auch, vorwiegend in der Kombination mit IL-2, modulierend auf die Proliferation und Zytotoxizität von TIL sowie T- und NK-Zellen des peripheren Blutes [114-118]. Hierbei wird durch GM-CSF die Expression des IL-2 Rezeptors auf T-Zellen induziert [119]. Weiterhin werden Zellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe aktiviert, die wiederum eine unspezifische Zytolyse sowie die Freisetzung weiterer inflammatorischer Zytokine und die Stimulation dendritischer Zellen bewirken [120;121].

Nachdem einige dieser Effekte bei malignen Erkrankungen, unter anderem auch beim NZK, beobachtet wurden [113;117;118] und zudem in Tierexperimenten eine postoperativ fortbestehende Inhibition des Tumorwachstums festzustellen war [122], ließ dies eine Antitumoraktivität von GM-CSF vermuten. Zudem wurde GM-CSF im Rahmen unterschiedlicher tumorimmunologischer Behandlungskonzepte wie z.B. als Adjuvanz bei Vakzinierungen angewandt. Im Mausmodell wurde nach Applikation autologer Tumorzellen, die nach genetischer Modifikation GM-CSF sezernierten, eine langanhaltende Antitumorimmunität beobachtet [123]. In Vakzinierungsstudien beim

mNZK waren nach der Applikation GM-CSF-transduzierter Tumorzellen [124;125] oder GM-CSF als systemischem Adjuvant zusammen mit bestrahlten autologen Tumorzellen [126] neben tumorspezifischen CD4⁺-T- und CD8⁺-T-Zellen auch partielle Remissionen festzustellen.

Die beobachteten immunoadjuvanten Effekte der Vakzinetherapien und präklinischen Daten legten eine systemische Applikation von GM-CSF bei der Behandlung maligner Erkrankungen wie dem NZK nahe. Basierend auf den In-vitro-Effekten beim Lungenkarzinom [127], wurde von Wos und Mitarbeitern [128] eine Phase-II-Studie mit GM-CSF als Monotherapeutikum bei 26 z.T. vorbehandelten NZK-Patienten initiiert. In dieser Studie wiesen zwei Patienten eine partielle Remission mit Rückgang der Lungenmetastasen auf. RINI ET AL. [129] berichteten über teilweise lang andauernde Erkrankungstabilisierungen bei ebenfalls größtenteils immuntherapeutisch vorbehandelten Patienten.

Rekombinantes GM-CSF wird zum einen in Hefezellen (Sagramostim), zum anderen in *E. coli* (Molgramostim) oder chinesischen Hamster-Ovarzellen (Regramostim) generiert. Sagramostim ist in den USA zugelassen, in Deutschland wurde bisher zumeist, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Molgramostim eingesetzt. Inzwischen ist Molgramostim in Deutschland nicht mehr verfügbar. Während Molgramostim nicht glykosiliert ist, ist Regramostim, in geringerem Maße auch Sagramostim, glykosiliert. Zudem unterscheidet sich die Aminosäuresequenz von Sagramostim vom endogenen Protein an Position 23, wobei hier Leucin anstelle von Prolin vorliegt. Die Halbwertszeit von Molgramostim beträgt etwa 3 Stunden, maximale Plasmaspiegel nach sc. Gabe werden etwa nach 2 Stunden erreicht [109;130]. GM-CSF zeigt wie IFN- α und IL-2 eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dosisabhängig kommt es zur Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl, insbesondere der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie der Lymphozyten. Effekte auf die Thrombozyten mit Thrombozytose oder Thrombozytopenie sind seltener zu beobachten [109]. Als Nebenwirkungen treten oft Arthralgien, Myalgien sowie Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit auf. Weiterhin wurde über das Auftreten lokaler Exantheme, aber auch generalisierter allergischer Reaktionen berichtet [128;129]. In seltenen Fällen kann es zu Verwirrheitszuständen, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder einem „*Capillary-Leak-Syndrom*“ kommen. Eine Verschlechterung der Lungenfunktion ist insbesondere bei vorbestehender

Lungenerkrankung möglich [128]. HOTTON ET AL. [131] berichteten zudem über eine akute zerebrale Venenthrombose mit hämorrhagischer Infarzierung.

1.4.4 Chemotherapie und 5-Fluorouracil (5-FU)

In mehreren Übersichtsarbeiten wurden Literaturberichte über die Anwendung unterschiedlicher chemotherapeutischer Substanzen beim NZK zusammengefasst [36;37]. Als Monotherapeutika hatten Vinblastin und 5-Fluorouracil (5-FU) mit Remissionsraten um die 6% nur einen geringen Effekt. Kombinationstherapien, sog. Polychemotherapien, zeigten bei erhöhter Nebenwirkungsrate kaum größere Erfolge.

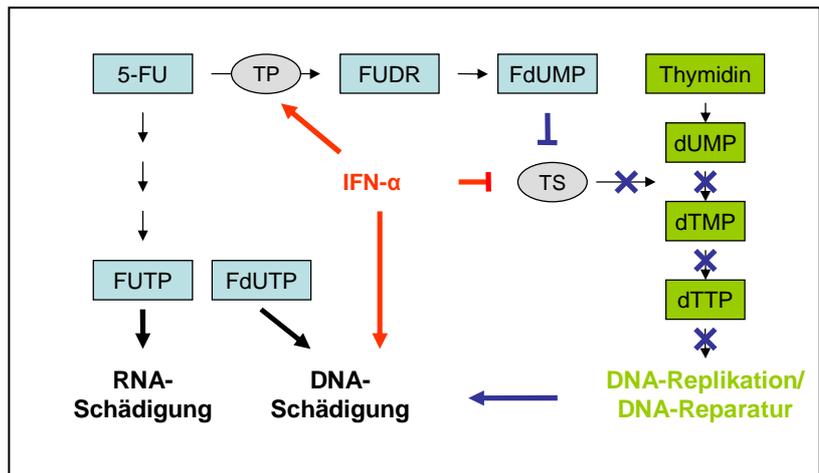
Für die weitgehende Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wird die Überexpression des *Multi-Drug-Resistance*-Proteins (MDR1), welches auch als P-Glycoprotein oder p-170 bezeichnet wurde, verantwortlich gemacht. Das MDR1-Protein gehört zur Familie der ATP-bindenden Transportproteine. Im normalen Gewebe wird es u.a. in den Zellen der Leber, sowie der luminalen Membran des proximalen Tubulus der Niere exprimiert. Es ist am Export von Substanzen und somit an der biliären und renalen Elimination beteiligt [132]. Versuche, diese chemotherapeutische Resistenz durch Kombinationen mit MDR1-Inhibitoren, wie z.B. MPA oder Verapamil zu überwinden, waren allerdings nicht erfolgreich [133]. 5-FU und Gemcitabine werden nicht über MDR-Mechanismen aus der Zelle entfernt, aber auch sie weisen beim NZK nur eine geringgradige Antitumoraktivität auf [133]. Erst als Kombinationspartner der Zytokine IL-2 und IFN- α war 5-FU im Rahmen der Chemoimmuntherapie wieder von Interesse.

5-FU wurde in den 1950er Jahren entwickelt und wird zur Behandlung vieler Tumorerkrankungen, insbesondere des Kolonkarzinoms, eingesetzt. Es bewirkt eine komplexe Hemmung des Pyrimidinmetabolismus' und greift in die DNA- und RNA-Synthese ein [134] (siehe Abb. 1). Tierexperimentell und in vitro wurden synergistische Effekte von 5-FU mit IFN- α und IL-2 gezeigt. Hierbei war ein verstärkter wachstumshemmender und zytotoxischer Effekt mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in verschiedenen Karzinomzelllinien beschrieben worden [135]. Im Mausmodell wurde das Wachstum kolonrektales Lungen- und Lebermetastasen durch die Gabe von 5-FU in Kombination mit IFN- α inhibiert, wobei durch die zusätzliche Gabe von IL-2 eine Potenzierung der Wirkung herbeigeführt werden konnte [136]. Die Effekte sind im Detail nicht genau geklärt. Diskutiert werden eine IFN- α -vermittelte gesteigerte Induktion von DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüchen, Hemmung der Thymidilatsynthetaseresynthese und

5-FU-Konvertierung in Fluorodesoxyuridin-Monophosphat [134;137;138]. Weiterhin konnte die Sensitivität von einigen NZK-Zelllinien gegenüber 5-FU durch die IFN- α -Gabe vor der 5-FU-Applikation dosisabhängig gesteigert werden. Dies wurde mit einer erhöhten Thymidinphosphorylaseexpression durch IFN- α in Zusammenhang gebracht. Diese bewirkt wiederum über einen verstärkten Umbau von 5-FU in FdUMP eine Inhibierung der Thymidilatsynthetase und der DNA-Synthese [139].

Abb. 1: Darstellung des 5-FU-Metabolismus', der Effekte der 5-FU-Stoffwechselprodukte und des Synergismus mit IFN- α .

Nach der Aufnahme in die Zelle wird 5-FU über mehrere Zwischenschritte in seine aktiven Metabolite Fluorodesoxyuridin-Monophosphat (FdUMP), Fluorouridin-Triphosphat (FUTP) und Fluorodesoxyuridin-Triphosphat (FdUTP) abgebaut. Aufgrund von Strukturähnlichkeiten wird FUTP in die RNA, FdUTP in die DNA eingebaut. FdUMP entsteht aus dem Abbau von Fluorodesoxyuridin (FUDR), welches wiederum bei der Konvertierung von 5-FU durch die Thymidinphosphorylase (TP) entsteht. Über eine Komplexbildung von FdUMP mit der Thymidilatsynthetase (TS) wird die Bindung des normalen Substrats Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP) und damit der Umbau von Thymidin zu Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP) und Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP) verhindert. Diese Produkte entstehen aus dem Abbau von Thymidin und sind für die DNA-Replikation und Reparatur notwendig (nach[134]).



Dosislimitierend sind oft Nebenwirkungen, die von einer ulzerierenden Mukositis mit Stomatitis, Ösophagitis und Enteritis über Diarrhöen und Gewichtsverlust bis hin zu einer Knochenmarktoxizität reichen. Die Knochenmarktoxizität ist dosisabhängig und äußert sich vorwiegend in einer Leukopenie, seltener auch in einer Thrombozytopenie. Der Leukozytennadir liegt zwischen dem 9. und 14., teilweise auch erst dem 20. Behandlungstag, wobei nach dem 30. Tag die Ausgangswerte zumeist wieder erreicht sind [140]. Seltener sind neurotoxische, hepatotoxische, kardiale und pulmonale Nebenwirkungen sowie ein Larynxödem oder Bronchospasmus. Weiterhin kann ein Hand-Fuss-Syndrom auftreten. 5-FU wird in der Leber über die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) abgebaut. Ein genetischer Defekt dieses Enzyms äußert sich u.a. in lebensbedrohlichen Diarrhöen und Neutropenien mit Fieber [141].

1.4.5 Zytokinkombinationen und Chemoimmuntherapie

Nachdem präklinische Daten auf synergistische Effekte der Zytokine untereinander und mit Chemotherapeutika hinwiesen, wurde die Wirksamkeit verschiedenener

Zytokinkombinationen und chemoimmuntherapeutischer Konzepte in einer Reihe von Phase-II- und auch Phase-III-Studien beim NZK untersucht (siehe Tab. 3). Unterschiede in den Therapieschemata und dem Risikoprofil der Patientenkollektive erschweren jedoch Vergleiche. In den nachfolgenden Kapiteln sind Kombinationen von IL-2 mit IFN- α und auch 5-FU dargestellt. Weiterhin sind Kombinationstherapien von GM-CSF mit IFN- α und IL-2 erörtert.

Autoren	Therapie	Patienten-anzahl	Ansprechen	Einfluss auf PFI od. ÜL
PYRHÖNEN ET AL., 1999 ^[95]	IFN- α + VBL vs. VBL	79 81	25,4% 3,6%	PFI: ja ÜL: ja
MRCRCC, 1999 ^[94]	IFN- α vs. MPA	174/ 117* 176/ 97*	14% (CR 2%, PR 12%)* 2% (CR 0%, PR 2%)*	PFI: ja ÜL: ja
YANG ET AL., 2003 ^[103]	HD-IL-2 vs. nd-IL-2 vs. sc-IL-2	96 92 93	21% (CR 6%, PR 15%) 11% (CR 1%, PR 10%) 10% (CR 2%, PR 8%)	PFI: nein ÜL: nein
NEGRIER ET AL., 1998 ^[106]	HD-IL-2 vs. IFN- α vs. HD-IL-2 + IFN- α	138 147 140	6,6% (CR 5,1%, PR 1,5%) 7,5% (CR 0%, PR 7,5%) 18,6% (CR 0,8%, PR 17,8%)	PFI: ja ÜL: nein
NEGRIER ET AL., 2007 ^[41]	sc-IL-2 vs IFN- α vs sc-IL-2 + IFN- α vs MPA	125** 122** 122** 123**	4,1% (CR 0,8%, PR 3,3%) 4,4% (CR 0,9%, PR 3,5%) 10,9% (CR 0%; PR 10,9%) 2,5% (CR 0,8%; PR 1,7%)	PFI: nein ÜL: nein
MCDERMOTT ET AL., 2005 ^[104]	HD-IL-2 vs. IFN- α + sc-IL-2	96 91	23,1% (CR 8,4%, PR 14,7%) 9,9% (CR 3,3%; PR 6,6%)	PFI: nein ÜL: nein
ATZPODIEN ET AL., 2004 ^[142]	IFN- α + VBL vs. IFN- α + sc-IL-2 + 5-FU IFN- α + sc-IL-2 + 5-FU + 13-CRA	63 132 146	31% (CR 5%, PR 26%) 20% (CR 6%, PR 14%) 26% (CR 8%, PR 18%)	PFI: ja ÜL: ja
GORE, 2008 ^[143]	IFN- α vs. IFN- α + sc-IL-2 + 5-FU	502 504	16% 24%	PFI: nein ÜL: nein

Tab. 3: Übersicht über Ergebnisse ausgewählter Studien zum Einsatz zytokinbasierter Therapien beim metastasierten Nierenzellkarzinom. * auswertbare Patienten nach 12 Wochen; ** intermediäres Risikoprofil. VBL Vinblastin, HD hoch dosiert, nd niedrigdosiert, sc subcutan. PFI progressionsfreies Intervall, ÜL kumulatives Überleben.

Zusammenfassend ist inzwischen festzustellen, dass

- die HD-IL-2-Therapie bei einzelnen Patienten (5-10%) mit günstigem Risikoprofil teilweise lang andauernde Remissionen bewirken kann, wobei die Toxizität jedoch ebenfalls erhöht ist.
- IFN- α zu einem geringen bis moderaten Überlebensvorteil führen kann.
- eine Kombinationstherapie die Ansprechraten verbessern kann, wobei die Toxizität ebenfalls erhöht ist und ein Vorteil für das kumulative Überleben nicht gesichert ist.
- zumeist nur Patienten mit günstigem Risikoprofil von einer Zytokintherapie profitieren.

1.4.5.1 Kombinationstherapien mit IL-2 und IFN- α

Zunehmende Bedeutung gewann die Kombination von IFN- α und IL-2. Tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien legten synergistische Effekte durch eine simultane Verstärkung der Antigenpräsentation, Effektorzellmechanismen und direkten Tumoraktivität nahe [92]. Die an 425 mNZZK-Patienten durchgeführte prospektive, randomisierte CRECY-Studie (Cancer Renal Cytokine Studie) ergab für die Kombination von IFN- α und IL-2 iv. noch eine Verbesserung der Ansprechraten und des progressionsfreien Ein-Jahres-Überlebens gegenüber den Einzelsubstanzen [106]. Anschließende Studien konnten jedoch keinen Vorteil mehr, insbesondere für Patienten mit intermediärer Prognose, zeigen [41;104].

1.4.5.2 Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- α und 5-FU

Um weitere synergistische oder additive Effekte zu erzielen, wurden Zytokine mit Chemotherapeutika kombiniert. Nach anfänglichen Erfolgen von IFN- α in Kombination mit Vinblastin konnten nachfolgende Studien die verbesserten Remissionsraten nicht bestätigen und zudem keinen Überlebensvorteil aufweisen [133]. Basierend auf den bereits erwähnten In-vitro-Daten, die einen Synergismus von 5-FU mit IFN- α und IL-2 zeigten (siehe Kap. 1.4.4), sollte durch die zusätzliche Gabe von 5-FU der bekannte synergistische Effekt von IL-2 und IFN- α weiter gesteigert werden. Es wurden daraufhin mehrere Studien zur Untersuchung dieser Dreifachkombination initiiert. Nachdem bereits eine Phase-I-Studie [144] eine Antitumoraktivität sowie eine retrospektive Analyse [101] Remissionsraten von 39% (CR 11%, PR 28%) zeigten, wurde auch in einer prospektiven randomisierten Phase-II-Studie der Arbeitsgruppe um ATZPODIEN [145] ein Vorteil für diese Therapieoption gesehen. Weitere Publikationen u.a. von HOFMOCKEL ET AL. [146] und ALLEN ET AL. [147] zeigten mit ähnlichen Ansprechraten und teilweise kompletten, langandauernden Remissionen ebenfalls deutliche Erfolge. In einer an 341 Patienten durchgeführten prospektiven dreiarmligen Studie der DGCIN (Deutsche Gruppe zur Chemoimmuntherapie des Nierenzellkarzinoms) wurde diese Dreifachkombination gegenüber einer Vierfachkombination mit zusätzlich 13-*cis*-Retinsäure (13-CRA) und der Kombination von IFN- α und Vinblastin verglichen. Hierbei wurde mit einer Remissionsrate von 31% (CR 5%, PR 26%), einem Gesamtüberleben von 25 Monaten und einem progressionsfreien Intervall von 6 Monaten ein Vorteil hinsichtlich der zusätzlichen Gabe von 5-FU gesehen [142]. Diese Ergebnisse werden jedoch in Bezug auf Ansprechraten und Überleben in der Literatur kontrovers diskutiert.

In verschiedenen Studien mit unterschiedlichen, aber auch solchen mit vergleichbaren Therapieprotokollen wurden geringere Ansprechraten, mitunter ohne komplette Remissionen und ohne Einfluss auf das Gesamtüberleben, beobachtet [148-153]. Weiterhin war die Verträglichkeit mit 36-55% Toxizitäten Grad 3-4 [147;151] schlechter als in den Studien der Arbeitsgruppen um ATZPODIEN [101;142].

2008 wurde auf dem ASCO-Kongress die für die Dreifachtherapie mit 1006 Patienten größte Phase-III-Studie des MRC und der EORTC (Studie RE04) [143] vorgestellt. Hierbei war für die Kombination von IL-2, IFN- α und 5-FU im Vergleich zur alleinigen IFN- α -Gabe bei verbesserten Ansprechraten kein Vorteil hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls (5,5 Monate vs. 5,3 Monate) oder Gesamtüberlebens (18,7 Monate vs. 18,5 Monate) bei deutlich erhöhter Toxizität festzustellen.

1.4.5.3 Kombinationstherapien mit GM-CSF

Nachdem eine GM-CSF-Monotherapie beim mNZK kaum klinische Effekte zeigte [128;129], aber präklinische Daten auf einen Synergismus von GM-CSF mit IL-2 und IFN- α hinwiesen [87;114-119], wurden unterschiedliche Kombinationen dieser Substanzen im Rahmen mehrerer Phase-I/II-Studien geprüft. In einigen Studien wurden auch Auswirkungen auf das Immunsystem untersucht. So wurde nach der systemischen Applikation von GM-CSF und IL-2 eine gesteigerte Expression kostimulatorischer Moleküle sowie CD83 in der PBMC-Population beobachtet, was auf eine verbesserte Antigenpräsentation und Rekrutierung dendritischer Zellen hindeutete [113]. In der Phase-I-Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe [154] war nach sequentieller Applikation von GM-CSF, IL-2 und IFN- α bei Patienten mit mNZK neben einem Anstieg der kostimulatorischen Moleküle eine Erhöhung der CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen sowie der NK-Zellen in der PBMC-Population festzustellen. Zusammen mit den Daten der Proliferations- und Zytotoxizitätsexperimente legte dies einen Effekt sowohl auf die Antigenpräsentation als auch auf die Effektorzellen nahe.

Komplette Remissionen wurden nur in einigen Studien in 2-10% der Fälle verzeichnet, vor allem nach simultaner [155-157], seltener auch nach sequentieller Zytokinapplikation [158]. Partielle Remissionen kamen in 6-18% vor und wurden ebenfalls nicht in allen Studien beobachtet. Zumeist war ein Rückgang der Lungenmetastasen zu verzeichnen [113;128;131;157-159]. Trotz der geringen Ansprechraten sahen einige Autoren mit z.T. 9-19 Monate andauernden Erkrankungstabilisierungen einen Vorteil insbesondere für Patienten, die lediglich SD

erreichten [129;155;158]. SD wurden zu 26% bis teilweise über 55% beobachtet, wobei einige Patienten nicht nephrektomiert waren oder prognostisch ungünstige Faktoren wie Knochen- oder Lymphknotenmetastasen aufwiesen. Das mediane Überleben wurde nur in einigen Studien angegeben und lag zwischen 9 und 14 Monaten, wobei die Endpunkte z.T. noch nicht erreicht waren [129;131;155-158;160]. In der bereits erwähnten Studie unserer Arbeitsgruppe [154] war bei guter Verträglichkeit, die eine ambulante Therapie ermöglichte, bei zwei von zehn Patienten eine partielle und bei einem eine gemischte Remission festzustellen. Bei einem Patienten war ein nahezu vollständiger Rückgang des Lokalrezidivs sowie der Lebermetastasen zu beobachten.

Studien zur Applikation von 5-FU zusammen mit GM-CSF, IFN- α und IL-2 lagen zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit nicht vor. Lediglich BAXEVANIS ET AL. [161] untersuchten GM-CSF im Rahmen einer Chemoimmuntherapie an 41 Patienten, die eine Zweitlinientherapie bestehend aus Carboplatin, 5-FU und Leukovorin erhielten. Zusätzlich erfolgte die Applikation von GM-CSF vs. Placebo. 17 Patienten hatten Malignome des Urogenitaltrakts. Nachdem in der GM-CSF-Gruppe vermehrt Voll- und Teilremissionen und zudem keine Erkrankungsprogressionen auftraten, wurde ein Vorteil für GM-CSF im Rahmen einer Chemoimmuntherapie gesehen. Immunologische Untersuchungen ergaben zudem eine Zunahme der Proliferation in der gemischten Lymphozytenkultur sowie einen Anstieg der der NK-Zell- und Nicht-NK-Zell-vermittelten In-vitro-Zytotoxizität.

2 Ziel der Arbeit

Trotz verschiedener Behandlungsoptionen bleibt die Langzeitprognose des metastasierten Nierenzellkarzinoms schlecht und macht die Prüfung neuer Therapiekonzepte notwendig.

Die Rationale des vor der Ära der Tyrosinkinaseinhibitoren durchgeführten, hier vorgelegten Studienkonzepts bestand in einer simultanen Steigerung der Antigenpräsentation und der spezifischen zellulären Immunantwort (siehe auch Abb. 2). Durch einen zytostatikainduzierten Zellzerfall und die proapoptotische Aktivität von IFN- α sollten tumorassoziierte Antigene bei gleichzeitiger T-Zell- und NK-Zell-Aktivierung vermehrt freigesetzt bzw. präsentiert werden. Im Weiteren sollte dann die Kombination von GM-CSF mit dem T-Zell- und NK-Zell-aktiven Zytokin IL-2 zu einer Verstärkung der Antigenpräsentation und konsekutiven Induktion von Effektorzellen mit Antitumoraktivität führen.

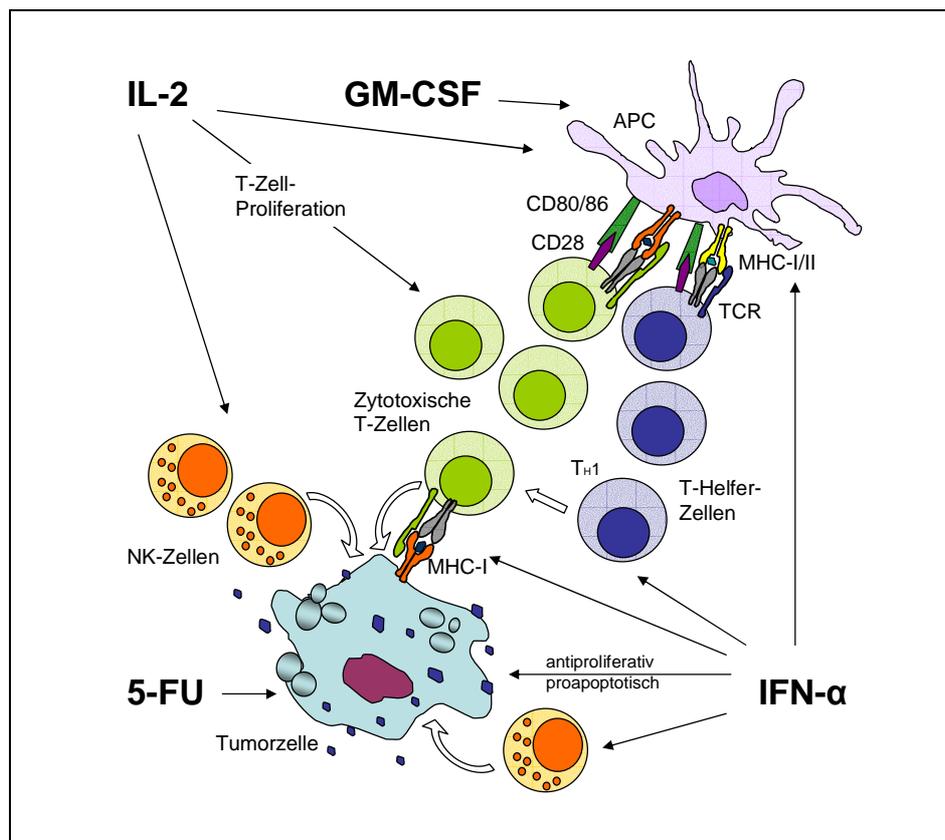


Abb. 2: Darstellung möglicher synergistischer Effekte einer Immuntherapie mit GM-CSF, IL-2, IFN- α und 5-FU.

Nachdem präklinische und klinische Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen auf eine immunologische Antitumoraktivität von GM-CSF, vor allem in Verbindung mit IL-2 und IFN- α , hinwiesen und zudem Daten vorlagen, die für eine Kombination von IL-2 und IFN- α mit 5-FU sprachen, wurde eine Phase-I/II-Studie zur niedrigdosierten sequentiellen Applikation von IFN- α / 5-FU, gefolgt von GM-CSF/ IL-2 initiiert.

GM-CSF war in der Kombination mit IL-2, IFN- α und 5-FU zu diesem Zeitpunkt weder auf klinischer noch auf immunologischer Ebene untersucht worden. Im Rahmen eines klinischen und immunologischen Monitorings sollten die Effekte dieses Therapiekonzeptes erfasst und bewertet werden.

1. Ein primäres Ziel war es, die Verträglichkeit und ambulante Durchführbarkeit dieses Therapieschemas zu prüfen.
2. Durch immunologische Untersuchungen sollten neben Veränderungen der Effektorzellpopulationen auch Auswirkungen auf die zytotoxische, proliferative und stimulatorische Kapazität der PBMC untersucht werden. Zudem sollte eine Auswertung aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen für Patienten mit einer Remission oder Erkrankungsstabilisierung und für Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf erfolgen.
3. Ferner sollte ermittelt werden, ob die klinischen Ergebnisse in Bezug auf die Remissionsraten eine weitere Prüfung dieses Behandlungskonzeptes im Rahmen einer Phase-III-Studie rechtfertigen.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenauswahl

Die Behandlung wurde, nach Prüfung und Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité Berlin, im Rahmen einer offenen einarmigen prospektiven Phase-I/II-Studie durchgeführt. Nach entsprechender schriftlicher Einverständniserklärung wurden Patienten im Alter von 18 bis 75 Jahren mit einem histologisch gesicherten Nierenzellkarzinom ohne kurative Tumorsektabilität (Stadium IV nach den UICC-Kriterien bzw. Stadium IV entsprechend der HOLLAND-ROBSON-Klassifikation) und klinisch messbaren Tumorparametern eingeschlossen. Weitere Kriterien waren ein Allgemeinzustand (AZ) besser als Grad 2 gemäss den ECOG-Kriterien bzw. ein Karnofsky-Index von mindestens 60% sowie eine Lebenserwartung von mehr als drei Monaten. Für Patientinnen im gebärfähigen Alter wurde eine Kontrazeption gefordert. Ausschlusskriterien waren neben Zweitmalignomen, entzündlichen Systemerkrankungen und einer HIV-Infektion, eine Herzinsuffizienz ab NYHA-Stadium III, ventrikuläre Extrasystolen ab Grad IV der Lown-Klassifikation und klinisch relevante koronare Herzerkrankungen. Eine schwere pulmonale Dysfunktion mit Ruhe- oder geringgradiger Belastungsdyspnoe, zerebrovaskuläre Erkrankungen, hirnorganische Psychosyndrome und Psychosen stellten ebenso Ausschlusskriterien dar. Weiterhin wurden Patienten mit schweren Funktionsstörungen der Nieren (Serumkreatinin $>2,0$ mg/dl), der Leber (Bilirubin $>3,0$ mg/dl, Transaminasen >100 U/l oder entsprechende laborabhängige Erhöhung der Normwerte) und der plasmatischen Gerinnung (Quick $<50\%$, PTT $>1,5$ -faches des Normwerts) sowie Patienten mit einer Thrombozytopenie (Thrombozyten $<100.000/\mu\text{l}$) oder einer Leukopenie (Leukozyten $<3000/\mu\text{l}$) nicht in die Studie aufgenommen. Zudem wurden keine Patienten zugelassen, die zuvor eine Therapie mit Zytokinen oder Immunsuppressiva, einschließlich einer Kortikosteroidtherapie erhalten hatten. Rekrutiert werden konnten Patienten nach operativer Entfernung oder Bestrahlung von ZNS-Metastasen. Bestehende zerebrale Raumforderungen waren hingegen ein Ausschlusskriterium. In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen November 1998 und Juli 2000 16 Patienten der Robert-Rössle-Klinik und vier der Universitätsklinik Rostock, darunter zwei Frauen

und 18 Männer im Alter von 40 bis 76 Jahren (Median 60,7 Jahre) mit gesichertem mNZK aufgenommen.

3.2 Behandlung

3.2.1 Therapieplan

Die Therapie war im Rahmen einer ambulanten Behandlung über insgesamt 20 Wochen geplant und bestand aus vier Zyklen à 5 Wochen. In den Wochen 1 und 2 wurde die Behandlung nur mit IFN- α und 5-FU, in den anschließenden beiden Wochen nur mit IL-2 und GM-CSF durchgeführt. Nach diesen vier Wochen schloss sich eine einwöchige Therapiepause an. Das genaue Therapieschema wird im folgenden erläutert und ist in Abb. 3 dargestellt.

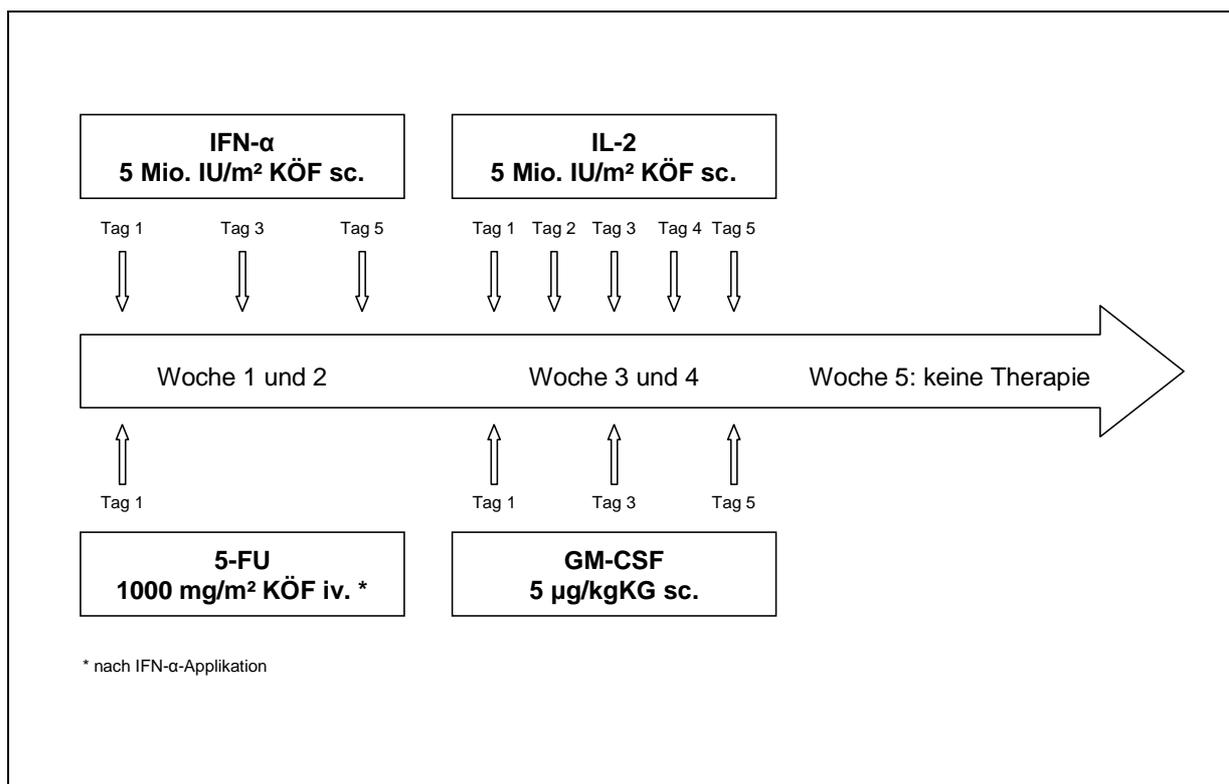


Abb. 3: Darstellung eines Behandlungszyklus'. Die Behandlung war über 20 Wochen mit vier Zyklen à 5 Wochen geplant.

Die jeweiligen Substanzen wurden nach Angaben des Herstellers aufbereitet und appliziert. In den ersten beiden Wochen wurde an den Tagen 1, 3 und 5 jeweils 5 Mio.IU/m²KÖF IFN- α sc. (Intron A; Fa. Essex Pharma, München, Deutschland) appliziert. Am ersten Tag erfolgte nach der Interferongabe eine intravenöse

Kurzinfusion von 1000 mg/m²KÖF 5-FU (Ribofluor; Fa. Ribosepharm, München, Deutschland). In den darauf folgenden zwei Wochen erhielten die Patienten an fünf aufeinander folgenden Tagen 5 Mio.IU/m²KÖF IL-2 sc. (Proleukin S; Fa. Chiron, Emeryville, Californien, USA) und an den Tagen 1, 3 und 5 zusätzlich 5 µg/kgKG rh-GM-CSF sc. entsprechend Molgramostim (Leukomax; Fa. Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland). Nach diesen vier Wochen erfolgte eine Therapiepause von einer Woche. Diese insgesamt fünf Wochen stellten einen Therapiezyklus dar. Nach zwei dieser Zyklen wurde eine Zwischenuntersuchung zur Überprüfung des Therapieansprechens vorgenommen. Lag eine Progression der Erkrankung vor, wurde die Behandlung protokollgemäß abgebrochen. Die weitere Therapie lag dann im Ermessen des Prüfarztes.

3.2.2 Abbruchkriterien

Abbruchkriterien waren, neben der Entscheidung des Patienten, inakzeptable Toxizität, Verschlechterung des Allgemeinzustandes und interkurrierende Erkrankungen, die ein o.g. Ausschlusskriterium darstellten.

3.2.3 Begleitmedikation

Als symptomatische Therapie war Paracetamol 1000 mg p.o. oder als Suppositorien 30 Minuten vor, sowie 4 und 8 Stunden nach der Applikation von IFN-α möglich. Weiterhin war unter strenger Kontrolle der Nierenfunktion, die Gabe anderer nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAR), wie z.B. Indometazin 50 mg 2-3 x täglich, zugelassen. Zur Behandlung leichter Diarrhöen konnte Loperamid mit einer initialen Dosis von 4 mg p.o. und weiteren 2 mg p.o. alle 6 Stunden über drei Tage gegeben werden. Bei schweren Verläufen (CTC-Toxizität ≥ Grad 3) war die Gabe von Octreotid 0,1 mg sc. 2 x täglich möglich. Pyridoxin (Vitamin B6) war bei einem Hand-Fuß-Syndrom (palmare-plantare Erythrodyssästhesie) mit einer täglichen Dosis von 100-150 mg anwendbar. Während der Studie durften keine weiteren antineoplastisch wirksamen Substanzen, Zytokine oder Hormonpräparate sowie Immunstimulantien oder Immunsuppressiva appliziert werden. Sollte eine Bestrahlung aus palliativen Gründen notwendig werden, durfte diese Lokalisation nicht zur Beurteilung des Tumoransprechens herangezogen werden.

3.2.4 Dosisreduktion

Bestanden trotz supportiver Maßnahmen grippeähnliche Symptome mit einer CTC-Toxizität (Common Toxicity Criteria; siehe Kap 3.3.1) von mehr als Grad 2 hatte eine Dosisreduktion von IL-2 und IFN- α um 50%, bei dann noch weiterhin bestehender Symptomatik eine Pausierung zu erfolgen. Stieg der Kreatininwert um das zweifache des Ausgangswertes, wurde die Therapie bis zum Wiedererreichen des prätherapeutischen Wertes (\pm 30%) pausiert und dann mit einer um 50% reduzierten IL-2 und IFN- α -Dosis fortgesetzt. Bei einem therapieassoziierten Anstieg des Serumbilirubins oder der Transaminasen auf mehr als das dreifache des Ausgangswertes wurde die Behandlung nach einer einwöchigen Pause mit der Hälfte der Dosis fortgesetzt. Dies galt auch für gastrointestinale Beschwerden mit einer CTC-Toxizität von mehr als Grad 2. Weiterhin wurde bei Diarrhöen bis zu deren Sistieren kein 5-FU appliziert. Bei schweren Durchfällen mit mehr als sechs ungeformten Stühlen pro Tag, war die stationäre Aufnahme mit Unterbrechung der Therapie indiziert. Traten nach einer anschließenden Dosisreduktion erneut Nebenwirkungen auf, wurde die Therapie protokollgemäß beendet. Bei schweren toxischen Reaktionen, wie z.B. schwerwiegenden kardialen Nebenwirkungen infolge einer 5-FU-Infusion oder einer Anaphylaxie wurde die Behandlung sofort abgebrochen.

3.3 Evaluation

Neben einer speziellen Eingangs-, Zwischen- und Abschlussuntersuchung wurde nach jedem Zyklus zur Ermittlung der Toxizität und des therapeutischen Ansprechens eine Anamnese mit klinischer Untersuchung und laborchemischer Kontrolle des Blutbildes, der Elektrolyte, der Leber- und Nierenwerte (sog. kleine Blutchemie) sowie ggf. eine weitere Diagnostik durchgeführt (eine Übersicht ist in Abb. 4 dargestellt).

Die Eingangsuntersuchung umfasste neben einer ausführlichen Anamnese, einer klinischen Untersuchung und einem EKG eine weitere bildgebende Diagnostik mittels Abdomensonographie, Röntgenaufnahmen und Computer-Tomographie (CT) des Thorax sowie des Abdomens. Ein kranielles CT, eine Echokardiographie (UKG), eine Röntgenaufnahme des Skeletts oder Knochenszintigraphie wurde bei entsprechender Indikation vorgenommen. Laborchemisch wurde neben dem Differentialblutbild und der Gerinnung die Blutsenkungsgeschwindigkeit bestimmt. Weiterhin wurden eine

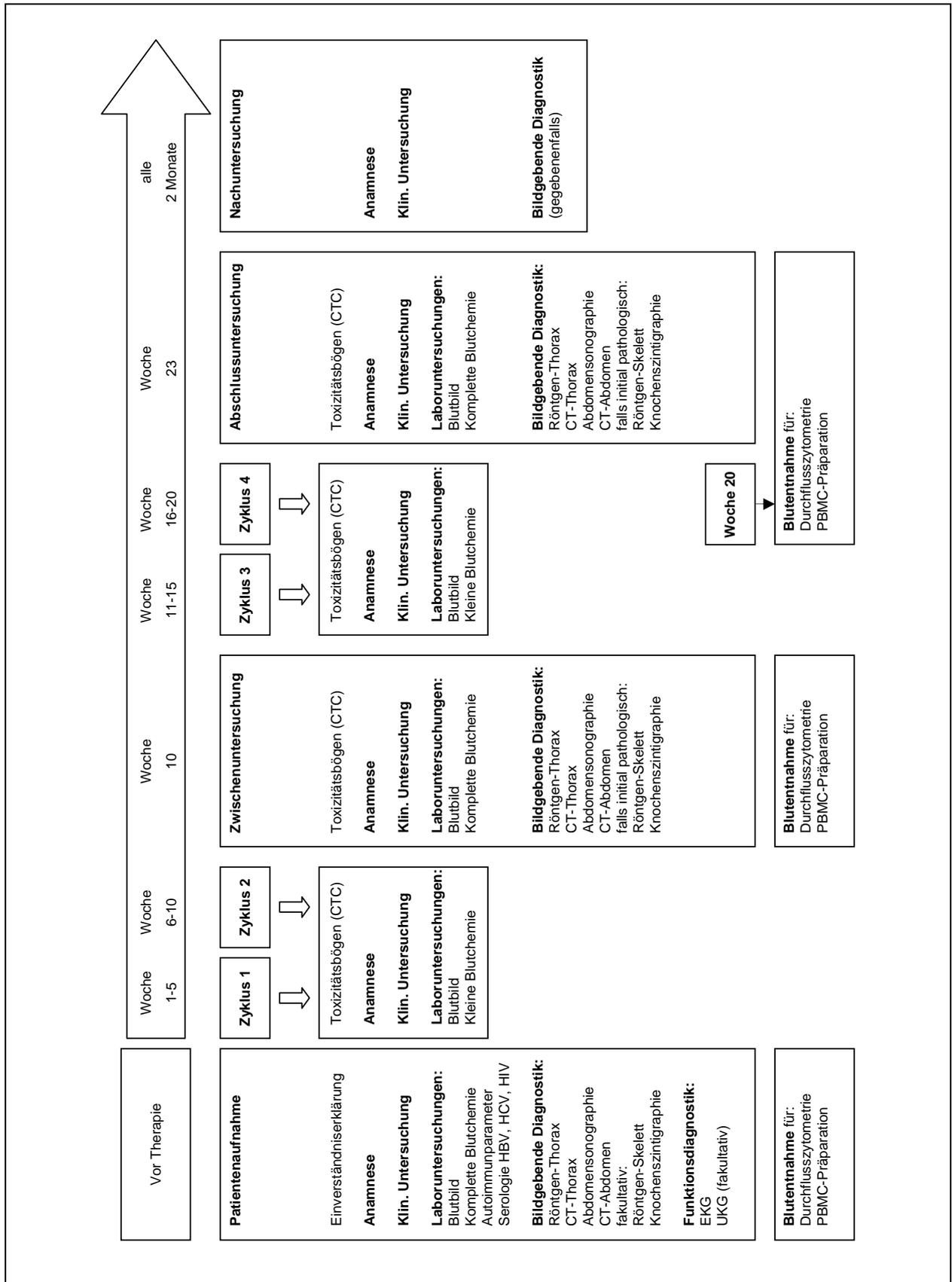


Abb. 4: Schematische Darstellung des Evaluationsschemas.

Proteinelektrophorese durchgeführt sowie CRP, Elektrolyte, Cholinesterase, LDH, Amylase, Lipase, TSH, GOT, GPT, Bilirubin, alkalische Phosphatase, Kreatinin und Harnstoff (sog. komplette Blutchemie) untersucht. Zudem erfolgte eine Überprüfung des Rheumafaktors, des antinukleären Faktors (ANF), des C-3- und C-4-Komplements sowie eine HIV-, Hepatitis B- und Hepatitis-C-Serologie.

Bei der Zwischenuntersuchung nach zwei Zyklen, planmäßig in Woche 10, war eine weitere radiologische und sonographische Diagnostik der Indikatorregionen mit nachfolgender Entscheidung über die Fortsetzung der Therapie vorgesehen. Nach Absolvieren aller vier Zyklen wurde in Woche 23 eine Abschlussuntersuchung mit erneuter klinischer, laborchemischer und radiologischer Befundkontrolle durchgeführt. Im Anschluss waren Nachuntersuchungen in zweimonatigem Abstand geplant. Außerdem wurde nach o.g. Protokoll jeweils vor Therapiebeginn, nach zwei und nach vier Zyklen Vollblut, zum einen zur sofortigen durchflusszytometrische Analyse (siehe Kap. 3.4.1), zum anderen zur Isolation von PBMC (siehe Kap. 3.4.2) entnommen. Die PBMC wurden eingefroren und nach Abschluss der Studie zu weiteren immunfunktionellen Untersuchungen herangezogen (siehe Kap. 3.4.4 und 3.4.5).

3.3.1 Erfassung der Toxizität

Art und Schweregrad der unerwünschten Wirkungen wurden entsprechend den CTC-Kriterien (Common Toxicity Criteria) Version 2.0 des National Cancer Instituts (NCI) vom 30.01.1998 nach jedem Therapiezyklus erfasst und bewertet. Die Erfassung erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ in entsprechenden Berichtsformularen. Die Bewertungsskala rangierte von 0 =keine Nebenwirkungen bis 4 =lebensgefährliche Nebenwirkungen.

3.3.2 Erfassung und Definition des Tumoransprechens

Die zur Beurteilung des Ansprechens herangezogenen Tumorparameter wurden bei der Aufnahme des Patienten in die Studie in entsprechenden Aufnahmebögen dokumentiert.

Eine komplette Remission (CR) bestand, wenn alle bekannten Tumormanifestationen durch zwei, mindestens vier Wochen voneinander getrennte Untersuchungen, nicht mehr nachweisbar waren. Bei einer mindestens 50%igen Verkleinerung aller gemessenen Tumormanifestationen ohne weitere Manifestation oder Progression wurde dies als Teilremission (PR) gewertet. Dabei musste in der zweidimensionalen Diagnostik die

Oberfläche eines Solitärtumors, berechnet durch das Produkt seines größten Quer- und Längsdurchmessers, um mindestens 50% kleiner geworden sein. Für multiple Tumore war einer 50%ige Reduktion in der Summe der so ermittelten Oberfläche aller Läsionen gefordert. Für eindimensionale Untersuchungen galt die 50%ige Abnahme des linearen Tumordurchmessers. Bei einer, im Vergleich zur Eingangsuntersuchung, mindestens 25%igen Zunahme einer oder mehrerer Tumorkläsionen sowie dem Auftreten neuer Manifestationen lag eine Progression der Erkrankung (PD) vor. Die Erkrankung galt im Erkrankungsverlauf als stabil (SD), wenn weder ein Rückgang der Tumormasse um 50%, noch eine 25%ige Zunahme einer oder mehrerer Tumormanifestationen über mindestens vier Wochen festgestellt wurde. Ein gemischtes Ansprechen (MR) war als PR oder CR in einem Organ mit SD in einem anderen Organ definiert.

3.3.3 Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen und Risikoprofil

Aufgrund der teilweise auswärtigen ambulanten Behandlung und Evaluation waren einige Parameter zur Ermittlung des MSKCC-Prognosescores [14] nicht verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die von JONES ET AL. [15] und PALMER ET AL. [16] erarbeitete, sehr einfach durchzuführende Risikobewertung eingesetzt. Ein Zeitintervall von weniger als zwei Jahren nach der Diagnosestellung bis zur Metastasierung, mehr als eine Metastasenlokalisierung und ein Allgemeinzustand schlechter als 0 Punkte auf der ECOG-Skala gingen mit jeweils einem Punkt in die Bewertung ein. Patienten, die einen Punktwert von 0 aufwiesen, wurden als Gruppe mit „sehr guter“, Patienten mit einem Punktwert von 1 mit „guter“ Prognose definiert. Ein Punktwert von 2 entsprach einer „intermediären“, ein Punktwert von 3 einer „ungünstigen“ Prognosegruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten, bei denen nach Abschluss der Therapie MR oder SD vorlag, zu einer Gruppe zusammengefasst und mit denjenigen, die PD aufwiesen, in Bezug auf das progressionsfreie Intervall sowie klinische und immunologische Parameter verglichen.

3.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms SPSS Version 13.0.1 und Version 14.0 (SPSS, Chicago, USA) für das deutschsprachige Windows-Betriebssystem. Dieses Programm wurde als Campuslizenz vom IT-Zentrum der Charité – Universitätsmedizin Berlin bezogen. Weiterhin erfolgte eine statistische

Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Die Dauer der Nachbeobachtung und des progressionsfreien Intervalls wurde vom Therapiebeginn bis zum Zeitpunkt des Ausscheidens aus der Studie, des Progresses bzw. Todes berechnet. Das progressionsfreie Intervall mit der Kaplan-Meier-Methode kalkuliert. Für die Nachbeobachtungsdauer wurde der Median berechnet. Es wurde sowohl eine Analyse für die Gesamtheit der Patienten als auch für die in Kap. 3.3.3 entsprechend definierten Subgruppen, die sich hinsichtlich ihres therapeutischen Ansprechens sowie des Prognosescores unterschieden, vorgenommen. Ein Vergleich erfolgte durch den Log-Rang-Test. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei $P=0.05$ festgelegt.

3.4 Immunologische Untersuchungen

Gemäß dem in Abb. 5 dargestellten Evaluationsschema wurde den Patienten zu den Zeitpunkten der Aufnahme-, Zwischen- und Abschlussuntersuchung jeweils ca. 60 ml Vollblut entnommen, welches mit 2,5 ml Heparin (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) versetzt wurde.

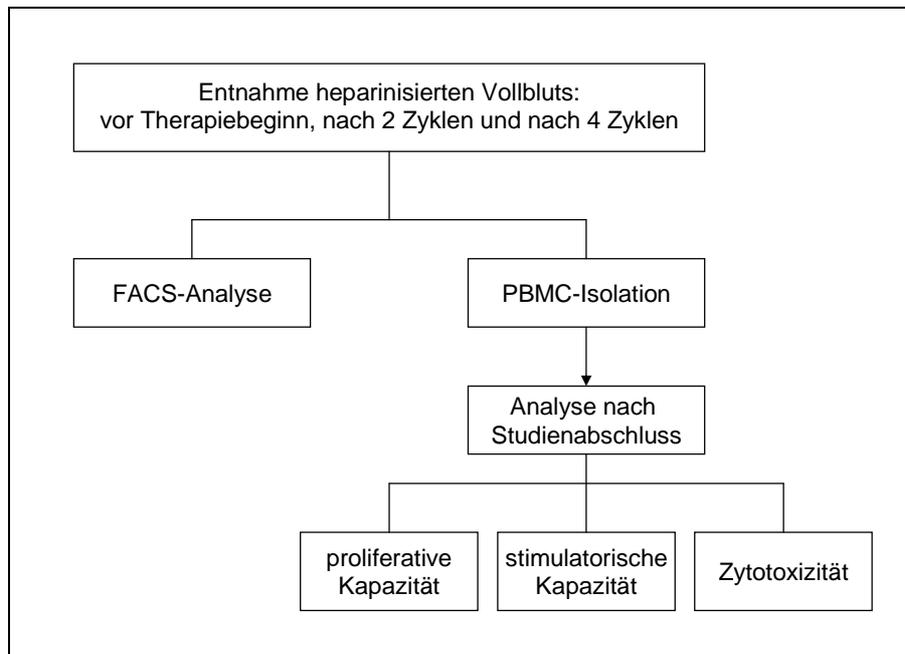


Abb. 5: Schematische Darstellung der immunologischen Untersuchungen

2-3 ml des heparinisierten Vollbluts wurden einer sofortigen durchflusszytometrischen Analyse (siehe Kap. 3.4.1) zugeführt. Aus dem restlichen Volumen wurden PBMC isoliert, eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe Kap. 3.4.2). Nach Beendigung der Studie wurden sie zur experimentellen Überprüfung ihrer proliferativen, stimulatorischen und zytolytischen Kapazität (siehe Kap. 3.4.5 und Kap. 3.4.4) herangezogen.

3.4.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS-Analyse)

Im Durchflusszytometer (FACS, engl.: *Fluorescence Activated Cell Sorter*) können Zellen, nach Bindung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers, bezüglich ihrer exprimierten Oberflächenantigene unterschieden werden. Mittels Laserenergie werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und ihre entsprechenden Emissionsspektren in getrennten Kanälen gemessen. Zudem ist es möglich, aufgrund der gemessenen Lichtstreuung die Zellform und Zellgröße zu bestimmen. Die seitliche Lichtstreuung (SSC, engl.: *side angle light scatter*) gibt Auskunft über die Granularität, die Vorwärts-Lichtstreuung (FSC, engl.: *forward angle light scatter*) über die Größe der Zellen.

Die Zellen des Immunsystems wurden anhand der Oberflächenmarker CD14 (Monozyten), CD56 (NK-Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD3 (T-Zellen) differenziert. Mittels eines zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurde die weitere Differenzierung der T-Zellen (CD4 und CD8) vorgenommen und die Expression von HLA-DR sowie CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) überprüft. Weiterhin wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf HLA-DR-positiven Zellen und T-Zellen untersucht. Eine Analyse der DC-Differenzierungsantigene CD1a, CD11 und CD83 erfolgte in Kombination mit HLA-DR.

Heparinisiertes Vollblut wurde mit dem FITC-konjugierten (FITC, Fluorescein-Isothiocyanat) monoklonalen Antikörper (mAB, engl.: *monoclonal antibody*) CD3-FITC und jeweils einem der PE-konjugierten (PE, Phycoerythrin) mAB CD4-PE, CD8-PE, CD14-PE, CD19-PE, CD25-PE, CD80-PE, CD86-PE sowie HLA-DR-PE gefärbt. CD1a-PE, CD11c-PE und CD83-PE wurden jeweils mit HLA-DR-FITC kombiniert. CD19-PE bzw. CD14-PE wurden in Kombination mit CD80-FITC und CD86-FITC, CD56-PE mit CD2-FITC eingesetzt. Die Isotypenkontrolle wurde mit den mAB CD45-FITC und HLA-DR-PE, die Negativkontrolle mit γ -FITC und γ -PE durchgeführt.

Alle Antikörper wurden von der Fa. Becton-Dickinson/Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Auf 100 µl Vollblut wurden in speziellen FACS-Röhrchen (#352052; BD Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) jeweils 20 µl Antikörperlösung eingesetzt. Eine Ausnahme war CD1a-PE mit 2 µl. Nach Durchmischung mit dem Vortex-Gerät (Fa. Scientific Industries, New York, USA) und 25-minütiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln, erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml 1%iger FACS-Lysing-Solution (Fa. Becton-Dickinson) für weitere 7 Minuten bei 4°C. Nach Zentrifugation mit 500 x g (Varifuge 3.0 R; Fa. Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von PBS (Fa. Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland, Großbritannien) mit anschließender Zentrifugation gewaschen. Nach Resuspension in 200 µl PBS wurden je 10.000 Zellen einer Probe im FACScan-Durchflusszytometer (Fa. Becton-Dickinson) gemessen. Der prozentuale Anteil der gemessenen Subpopulationen wurde sowohl im Lymphozyten- als auch PBMC-Analysefenster mit der Software CellQuest (Fa. Becton-Dickinson) auf einem Macintosh-Computersystem (Apple Computers, Cupertino, USA) ausgewertet. Dazu wurde in der FSC/SSC-Zweiparameter-Punktendarstellung (sog. dot-plot; engl.) nach Einstellung eines elektronischen Messschwellenwertes ein Fenster um die PBMC- und Lymphozytenpopulation gelegt. Die Berechnung der absoluten Zellzahl wurde durch Multiplikation der gemessenen Prozentwerte mit den Zellzahlen des entsprechenden Differentialblutbildes vorgenommen. Die PBMC-Zahl wurde hierbei aus der Summe der Lymphozyten und Monozyten ermittelt.

Desweiteren wurde die FACS-Analyse zur Überprüfung der T-Zell-Präparation aus „*Buffy coats*“ mittels negativer Selektion (siehe Kap. 3.4.5.1) eingesetzt.

3.4.2 PBMC-Präparation

PBMC wurden sowohl aus dem Vollblut der behandelten Patienten als auch aus sog. „*Buffy-coats*“ gesunder Blutspender durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll (Fa. Biochrom ehemals Seromed, Berlin, Deutschland) isoliert. Der „*Buffy-coat*“ ist die Schicht, die bei der Aufarbeitung von Erythrozytenkonzentraten zwischen den Erythrozyten und dem Frischplasmapräparat entsteht. Neben den Thrombozyten sind in dieser Schicht die Leukozyten enthalten. Die „*Buffy-coats*“ wurden freundlicherweise vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes in Berlin-Wannsee zur Verfügung gestellt.

Für die Präparation aus dem Vollblut der Patienten wurden jeweils 25 ml heparinisieretes Vollblut mit 10 ml PBS (Fa. Gibco BRL) verdünnt. Das Volumen der „*Buffy-coats*“ wurde in Zellkulturflaschen (Fa. TPP; Trasadingen, Schweiz) mit PBS auf 105 ml aufgefüllt. Anschliessend wurden 15 ml des in 50 ml-Kunststoff-Röhrchen (Fa. TPP) vorgelegten Ficolls (Fa. Biochrom; Berlin, Deutschland) mit 35 ml der PBS-Blut-Mischung überschichtet und mit 700 x g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert (Varifuge 3.0 R; Fa. Heraeus Instruments). Die entstandene Interphase wurde mit Polysterol-Einmalpipetten (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) abgenommen. Zur Entfernung der Thrombozyten wurden die entnommenen Zellen noch zweimal in PBS mit nachfolgender Zentrifugation bei 700 x g gewaschen. Die isolierten PBMC der gesunden Blutspender wurden der T-Zell-Präparation für die gemischte Lymphozytenkultur zugeführt. Die PBMC der Studienpatienten wurden in 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 90% FKS (Fa. Biochrom) in 2 ml-Gefrier-Röhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bei -80°C in speziellen Einfrierkisten (Freezing container „Mr. Frosty“; Fa. Nalgene, New York, USA) eingefroren. Einen Tag später wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert. Für den Einsatz in den Proliferations- und Zytotoxizitätsexperimenten (siehe Kap. 3.4.4 und Kap. 3.4.5) wurden sie bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, das DMSO über zwei Waschstufen mit einer Zentrifugation bei 400 x g entfernt und die Zellen in dem entsprechenden Medium aufgenommen. Nach Färbung mit Trypanblau (Fa. Gibco BRL) wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl mit dem Anteil toter Zellen bestimmt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl 0,5%iger Trypanblaulösung versetzt und der Anteil toter Zellen mikroskopisch bestimmt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an Zellproteine bindet. Bei nicht mehr intakten Zellmembranen, wie bei toten Zellen, wird das Zytosol angefärbt. Nach der Auftauprozedur lag die Vitalität bei mindestens 80%.

3.4.3 Zelllinien und Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien SLO, K562 und Raji wurden dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Ingo Tamm am Campus Virchow-Klinikum Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. K562 ist eine humane Zelllinie, die ursprünglich während der Blastenkrise eines Patienten mit CML isoliert wurde. Sie weist als besonderes Merkmal das Fehlen von MHC-I- und MHC-II-Antigenen auf und reagiert sensitiv auf die zytolytische Aktivität von NK-Zellen [162]. Mit

der NZK-Zelllinie SLO stand eine NZK-Epitope exprimierende Zelllinie zur Verfügung, die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Rajii stellt eine NK-Zell-resistente Zelllinie dar.

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Fa. Scientific Industries) bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Als Komplettmedium wurde RPMI 1640 (Fa. Cambrex, Belgien) mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) (Fa. Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml; Fa. Biochrom) und 0,2% Gentamycin (10 µg/ml; Fa. Cambrex) benutzt. Zur Kultivierung von SLO waren noch jeweils 0,1% 50 mM 2-Mercaptoethanol (Fa. Gibco BRL), nicht essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom) und Insulin-Transferrin-Selenium (Fa. Gibco BRL) zugesetzt. Das Medium für K562 und Raji enthielt noch jeweils 1% 200 mM L-Glutamin (Fa. Biochrom), Na-Pyruvat (Fa. Biochrom) und 200 mM HEPES-Puffer (Fa. Cambrex). Die Zellen wurden je nach Dichte alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden sie mit 1 x Trypsin-EDTA (Fa. Biochrom) vom Schalengrund abgelöst, in FKS-haltigem Medium durch Zentrifugation bei 700 x g (Varifuge 3.0 R; Fa. Hereus Instruments) gewaschen und erneut in einem Verhältnis von 1:5 - 1:10 ausplattiert.

3.4.4 Zytotoxizitäts-Assay: Der „JAM-Test“

Inwieweit die in der PBMC-Population enthaltenen Effektorzellen die entsprechenden Zielzellen durch Lyse oder Apoptoseinduktion abtöten können, wurde mit dem, von MATZINGER beschriebenen, sog. JAM-Test (Abk.; engl.: „*Just Another Method*“) [163] untersucht. Die Patienten-PBMC der verschiedenen Therapiezeitpunkte wurden zusammen mit Zielzellen inkubiert, die zuvor radioaktives H³-Thymidin in ihre DNA eingebaut hatten. Zytotoxische T-Zellen können Zielzellen, die das entsprechende Antigen in ihren HLA-Molekülen exprimieren, abtöten, NK-Zellen vermögen Zellen mit fremden, aberrierenden oder fehlenden MHC-Molekülen abzutöten. Hierbei kommt es zur Lyse oder Apoptoseinduktion der Zielzellen mit Freisetzung der radioaktiven DNA in den Überstand. Nach der Ernte mit einem automatisierten Zellerntegerät bleibt lediglich die hochmolekulare DNA intakter Zellen in den Filterplatten hängen, während die niedrigmolekulare DNA zerstörter Zellen herausgewaschen wird. Anhand der verbliebenen radioaktiv markierten DNA intakter Zellen kann mit der unten genannten Formel die Lyserate bestimmt werden.

Beim JAM-Test wird – im Gegensatz zum Chrom-Freisetzungstest, bei dem radioaktiv markiertes Chrom, das an intrazytoplasmatische Proteine bindet und nach Lyse freigesetzt wird – die Abtötung durch Apoptose miterfasst.

Als Zielzellen dienten die humane Nierenzellkarzinomlinie SLO, die NK-Zell-sensitive humane Zelllinie K562 und die NK-Zell-resistente humane Zelllinie Raji. Diese wurden jeweils unter den in Kap. 3.4.3 erläuterten Bedingungen kultiviert.

Je 1×10^4 SLO-Zellen wurden 48 Stunden vor Versuchsbeginn pro Loch in einer 96-Loch-Rundboden-Platte (Fa. TPP) ausplattiert. K562 und Raji-Zellen wurden 24 Stunden vor dem Experiment in einem Volumen von 5 ml und mit einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 50 ml-Zellkulturflaschen (Fa. TPP) ausgesät. Alle drei Zelllinien wurden mit Beginn des Experiments in Anwesenheit von $5 \mu\text{Ci/ml}$ H^3 -Thymidin (Fa. Amersham Radiochemicals, Buckinghamshire, UK) sieben Stunden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert und anschliessend in Iscoves modifiziertem Dulbeccos Medium (IMDM; Fa. Gibco BRL), das 2% humanes AB-Serum (Fa. Cambrex) enthielt, dreimal gewaschen. Die SLO Zellen wurden daraufhin in je $100 \mu\text{l}$ Blockmedium pro Loch resuspendiert. Dieses bestand aus IMDM, dem 10% AB-Serum und Thymidin (Fa. Sigma) im Verhältnis 1:500 zugesetzt waren. K562- und Raji-Zellen wurden mit diesem Medium auf eine Konzentration von 1×10^4 Zellen/ $100 \mu\text{l}$ eingestellt.

Die Patienten-PBMC der unterschiedlichen Therapiezeitpunkte wurden in AB-Serum aufgetaut und nach dem Waschen in Blockmedium aufgenommen. Sie wurden entsprechend einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 100:1, 50:1 sowie 10:1 eingesetzt und in einem Volumen von jeweils $100 \mu\text{l}$ aufgenommen. Anschließend wurden sie zu den SLO-Zellen in die Löcher der Multi-Pipettier-Platte gegeben. Für die Untersuchung der Zytotoxizität gegenüber den Zielzellen K562 und Raji wurden die Patienten-PBMC der verschiedenen Zeitpunkte in 96-Loch-Platten vorgelegt und die Zielzellen zugegeben. Zur Ermittlung der spontanen Lyserate wurden die Zellen jeweils ohne Effektorzellen inkubiert. Nach weiteren 20 Stunden Inkubation erfolgte dann die Ernte mit dem automatisierten Zellerntegerät Tomtec-Harvester 96 (Fa. Tomtec, Hamden, USA) auf Filterplatten (Meltilex A; Fa. Perkin Elmer/ Fa. Wallac Oy, Turki, Finnland). Diese wurden in der Mikrowelle (360 Watt, 12 Minuten) getrocknet und mit einem speziellen Wachs (im Paket der Meltilex A Filterpapiere enthalten) versiegelt. Anschließend wurde die eingebaute Radioaktivität mit dem Wallac-Jet-Szintillationszähler 1450 MicroBeta (Fa. Wallac) gemessen und die Auswertung über das computergestützte MicroBeta-System der Fa. Wallac vorgenommen. Entsprechend nachfolgend genannten Formel kann nun die spezifische Lyse aus der im Filter zurückgeblieben radioaktiv markierten DNA ermittelt werden:

Spezifische Lyse (%)= $[(S-E)/ S] \times 100$

S...verbliebene DNA (spontan) in Abwesenheit von Effektorzellen (in cpm)

E...verbliebene DNA (experimentell) in Anwesenheit von Effektorzellen (in cpm)

3.4.5 Proliferations- und Stimulationsexperimente

Lymphozyten befinden sich in der Regel in der G₀-Phase des Zellzyklus. Bei der experimentellen Untersuchung wird nach Stimulation der T-Zellen der Einbau radioaktiven H³-Thymidins in die zelluläre DNA während der Proliferation gemessen.

Um unterscheiden zu können, ob es unter der Therapie zu einer Veränderung der proliferativen oder stimulatorischen Kapazität kam, wurde dies mit nachfolgend erläuterten Versuchsaufbau getrennt überprüft.

Die Proliferationsfähigkeit der PBMC wurde durch Stimulation mit IL-2 und dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) untersucht. Zur Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials wurde die gemischte Lymphozytenkultur (MLR, engl.: mixed lymphocyte reaction) als In-vitro-Modell herangezogen. Dieser Reaktion liegt die Reaktivität von T-Zellen gegenüber allogenen MHC-Molekülen zugrunde und wird als In-vitro-Analog für die In-vivo-Alloreaktivität herangezogen. In den vorliegenden Experimenten wurden bestrahlte Patienten-PBMC als Stimulatoren und allogene T-Zellen, die aus „Buffy-coats“ gesunder Blutspender isoliert wurden, als Zielzellen eingesetzt.

3.4.5.1 T-Zellpräparation

Eine weitere T-Zell-Isolation aus den PBMC, die aus den „Buffy-coats“ gesunder Blutspender gewonnen wurden, erfolgte durch negative Selektion mittels ferromagnetischer Trennsäulen. Nach Inkubation mit Antikörpern, die magnetische Mikropartikel (sog. „microbeads“) enthalten, durchlaufen die Zellen eine ferromagnetische Matrix in Trennsäulen. Im magnetisierten Zustand der Säule werden Zellen mit gebundenen Antikörpern und somit entsprechender Oberflächenantigenexpression an die Matrix gebunden.

Die PBMC wurden mit „microbeads“-konjugierten mAb (alle Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegen die Differenzierungsantigene der Monozyten (CD14), B-Zellen (CD19) und NK-Zellen (CD56) nach Angaben des Herstellers inkubiert und auf die Trennsäulen (MACS LD-Depletion-Columns, Fa. Miltenyi Biotec) geladen. Der Durchfluss, der die nicht markierten Zellen enthält,

wurde gesammelt und bei 500 x g zentrifugiert (Varifuge 3.0 R; Fa. Heraeus Instruments). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Kompletmedium aufgenommen. Die phänotypische Verifikation erfolgte durch eine FACS-Analyse mit dem mAB Anti-CD3-PE (Fa. Becton-Dickinson/ Pharmingen) vor und nach der Selektion, wobei eine Aufreinigung von mehr als 93-95% festzustellen war.

3.4.5.2 Proliferations- und Stimulationsexperimente

Als Stimulatorzellen dienten die zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommenen Patienten-PBMC. Nach Auftauen, Waschen und Resuspendieren in Kompletmedium wurden sie entsprechend einem Stimulator-Zielzell-Verhältnis von 1:2 bis 1:64 in 96-Loch-Rundboden-Multipipettier-Platten (Fa. TPP) ausgesät und anschliessend mit einer Cs-137-Quelle und einer Dosisleistung von 30 Gy/min bestrahlt (Irradiator OB29; Fa. STS-Steuerungs- und Strahlentechnik, Braunschweig, Deutschland). 1×10^5 der aus den „Buffy-coats“ präparierten allogenen T-Zellen wurden jeweils zugesetzt und bei 37°C und 5% CO₂ fünf Tage inkubiert. Die maximale Proliferation der nicht bestrahlten PBMC wurde durch die Zugabe von 1×10^7 IU/ml IL-2 (Proleukin S, Fa. Chiron) und 10 µl/ml PHA-L (Fa. Biochem, Karlsruhe, Deutschland) erreicht. Während der letzten 20 Stunden wurde jedem Reaktionsansatz 1 µCi H³-Thymidin (Fa. Amersham) zugesetzt. Der Inhalt der 96-Loch- Multipipettier-Platten wurde wiederum mittels Tomtec-Harvester 96 (Fa. Tomtec) auf 96-Loch-Filterpapiermatten (Meltilex A; Fa. Perkin Elmer/ Fa. Wallac Oy) übertragen. Diese wurden in der Mikrowelle (360 Watt, 12 Minuten) getrocknet und anschließend versiegelt. Die eingebaute Radioaktivität wurde mit dem Wallac-Jet-Szintillationszähler 1450 MicroBeta (Fa. Wallac) gemessen und über das computergestützte MicroBeta-System der Fa. Wallac ausgewertet.

3.4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde wiederum unter Zuhilfenahme des Programms SSPS Version 13.0.1 und Version 14.0 (SPSS, Chicago, USA) für das deutschsprachige Windows-Betriebssystem (Campuslizenz des IT-Zentrums der Charité – Universitätsmedizin Berlin) vorgenommen. Ebenso erfolgte eine statistische Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Sowohl für die Proliferations- und Stimulations- als auch Zytotoxizitätsexperimente wurde die Ausplattierung in Triplets vorgenommen. Aus den gemessenen Werten wurde der Median mit entsprechender 25. und 75. Perzentile berechnet. Für unabhängige Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test, für verbundene Proben der Wilcoxon-Rang-Test angewandt. Eine Analyse wurde wiederum sowohl für die Gesamtheit der Patienten als auch für die entsprechend des therapeutischen Ansprechens und Risikoprofils definierten Subgruppen (siehe Kap. 3.3.3) durchgeführt. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei $P=0.05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Zwischen November 1998 und Juli 2000 wurden 20 Patienten, darunter zwei Frauen und 18 Männer, im Alter von 40 bis 76 Jahren (Median 60,7 Jahre) mit gesichertem mNZK in die offene, einarmige Phase-I/II-Studie aufgenommen. Die Charakteristika der Patienten sind in Tab. 4 und Tab. 5 zusammengefasst.

Vorherrschend war das bei 14 Patienten (70%) diagnostizierte klarzellige (konventionelle) NZK. Ein Patient wies ein chromophobes (5%), einer ein papilläres NZK (5%) auf. Der Patient mit dem papillären und ein weiterer mit einem klarzelligem NZK hatten eine eosinophile Variante. Bei vier Patienten (20%) konnte keine weitere Klassifikation vorgenommen werden.

Einer operativen Entfernung des Primärtumors hatten sich 17 Patienten (85%), einer Metastasen Chirurgie zwölf (60%) unterzogen. Ein Patient (#15) wurde sechs Monate vor Studienbeginn wegen einer Knochenmetastase bestrahlt. Ein weiterer Patient (#1) erhielt zum Ende des vierten Zyklus' aufgrund einer symptomatischen Skelettmetastase im Lendenwirbelsäulenbereich eine palliative Bestrahlung und wurde zudem mit Pamidronsäure behandelt. Keiner der Patienten erhielt zuvor eine Immun- oder Hormontherapie. Multikinaseinhibitoren waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar.

Von 20 Patienten wiesen drei (15%) eine Metastasierung in nur einem Organsystem, dem der Lunge, auf. Bei neun Patienten (45%) waren zwei und bei acht Patienten (40%) drei oder mehr Organsysteme befallen. Eine Metastasierung der Lunge lag bei insgesamt 16 (80%), der Lymphknoten und des Skelettsystems bei jeweils sieben (35%), der Leber bei fünf Patienten (25%) vor. Lokale Infiltrationen und Metastasen der Muskulatur und des Weichteilgewebes kamen bei drei Patienten (15%) vor. Bei einer Patientin (#7; 5%) wurde einige Jahre vor Aufnahme in die Studie eine ZNS-Metastase operativ entfernt. Bei ihr lag auch eine Metastasierung des Pankreas vor. Ein Patient (5%) wies eine nicht operativ entfernte Metastasierung der kontralateralen Niere auf. Bei insgesamt sechs Patienten (30%) waren die Milz, das Zwerchfell oder die Haut befallen. Ein Lokalrezidiv hatten drei Patienten (15%), ein Patient (5%) wies bei Diagnosestellung ein bilaterales NZK auf.

Patientencharakteristika			Patientenanzahl				
			n	%			
Eingeschlossene Patienten			20	100			
Klinisch auswertbare Patienten			19	95			
Therapieabbruch wegen Toxizität			2	10			
Alter	Median (Jahre)		60,7				
	Altersbereich (Jahre)		40,2-76,8				
Geschlecht	weiblich		2	10			
	männlich		18	90			
Allgemeinzustand	Karnofsky-Index	100%	13	65			
		90%	6	30			
		80%	1	5			
Histologie	klarzellig (konventionell)		14	70			
	chromophob		1	5			
	papillär		1	5			
	nicht weiter klassifiziert		4	20			
Metastasierung	Anzahl der Metastasenlokalisationen	1	3	15			
		2	9	45			
		≥3	8	40			
		Lokalrezidive	3	15			
	Bilaterales NZK	1	5				
	Metastasenlokalisationen	Lunge	16	80			
		nur Lunge	3	15			
		Lymphknoten	7	35			
		Skelett	7	35			
		Muskulatur u. Weichteilgewebe	3	15			
		Leber	5	25			
		ZNS*	(1)	(5)			
		kontralaterale Niere	1	5			
		sonstige	6	30			
	Zeitraum bis zur Diagnose der Metastasierung	≤ 12 Monate	5	25			
≥ 24 Monate		6	30				
synchron		8	40				
ungeklärt		1	5				
Vorthérapien	Primärtumorentfernung		17	85			
	keine Primärtumorentfernung		3	15			
	Metastasen Chirurgie		12	60			
	Bestrahlung		1	5			
	Immuntherapie		0	0			
	sonstige		0	0			
Prognosegruppe	eingeschlossene Patienten	gut	7	35			
		intermediär	12	60			
		ungünstig	1	5			
	für n=19 auswertbare Patienten	gut	6	32			
		intermediär	12	63			
		ungünstig	1	5			
Therapieansprechen	verstorben	während der Therapie	0	0			
		nach Beendigung der Therapie	5	28			
	Therapieansprechen für n=19 auswertbare Patienten:	insgesamt nach		2 Zyklen		4 Zyklen	
				n	%	n	%
		Komplette Remission (CR)		0	0	0	0
		Partielle Remission (PR)		0	0	0	0
		Gemischte Remission (MR)		3	16	4	21
		Erkrankungsstabilisierung (SD)		11	58	6	32
		Erkrankungsprogression (PD)		5	26	9	47

Tab. 4: Zusammenfassung der Patientencharakteristika und des Therapieansprechens; * prätherapeutisch operativ entfernt.

Pat. Nr./ Geschl.	Alter (Jahre)	Datum der Erstdiagnose / Metastasierung	Histologie	Metastasenlokalisationen	Vorbehandlung	Therapie- ansprechen	
1	m	57,8	01/83 – 10/98 (> 24 Monate)	klarzellig	Lunge, Skelettmetastasen mit Infiltration des Muskel- und Weichteilgewebes	OP: PT (R.: Knochen-M wd. der Therapie)	MR/MR
2	m	56,4	1986 – 01/99 (> 24 Monate)	klarzellig	Lokalrezidiv, Skelettsystem, Leber, LK	OP: PT OP: Knochen-M.	PD/- †
3	m	67,4	05/96 – 05/97 (= 12 Monate)	nicht weiter klassifiziert	Lokalrezidiv, Lunge	OP: PT OP: Lungen-M.	PD/- †
4	m	62,8	01/99 – 01/99 (synchron)	chromophob	Lunge, mediast. LK	OP: PT	MR/PD †
5	m	59,2	03/99 – 03/99 (synchron)	nicht weiter klassifiziert	Lokale Infiltration der Neben- niere, Skelettsystem m. Infiltration des Muskel- und Weichteilgewebes, intra- u. extraabdominelle LK	keine	SD/MR
6	m	63,4	1993 – 03/99 (> 24 Monate)	klarzellig	Lunge	OP: PT OP: Lungen-M.	SD/SD
7	w	61,0	1991 – 08/93 (> 24 Monate)	nicht weiter klassifiziert	Lunge, Pankreas, (ZNS)*	OP: PT OP: ZNS-M.	SD/ (SD) Abbruch durch Pat.
8	m	58,9	05/99 – 05/99 (synchron)	klarzellig	Lunge, mediast. LK	OP: PT	SD/MR
9	m	60,8	01/99 – 01/99 (synchron)	klarzellig	Lunge	OP: PT	SD/SD
10	w	64,4	08/98 – 03/99 (< 12 Monate)	nicht weiter klassifiziert	Lunge, Skelettsystem	OP: PT OP: Lungen-M.	SD/MR
11	m	54,4	08/98 – 05/99 (< 12 Monate)	klarzellig	Lunge, Leber	OP: PT OP: Lungen-M.	PD/-
12	m	40,2	12/96 – 06/99 (> 24 Monate)	papillär/ eosinophil	Lokalrezidiv, Lunge, Zwerchfell, Milz, Muskulatur (Bauchwand)	OP: PT OP: Lungen-M., Weichteil-M.	-/- (NA) Ausschluss wg Tox.
13	m	74,4	06/94 – 04/97 (> 24 Monate)	klarzellig	kontralat. Niere, Skelettsystem	OP: PT OP: Knochen-M.	SD/SD
14	m	60,6	01/00 – 01/00 (synchron)	klarzellig	Lunge	keine	SD/SD
15	m	57,2	03/99 – 06/99 (< 12 Monate)	klarzellig/ eosinophil	Lunge, mediast. LK, Skelettsystem	OP: PT OP: Knochen-M. LK-M. R : Knochen-M.	PD/-
16	m	58,8	01/00 – 04/00 (< 12 Monate)	klarzellig	Lunge, mediast. LK, Leber	OP: PT	SD/PD †
17	m	76,8	02/00 – 02/00 (synchron)	klarzellig	bilaterales NZK Lunge, Leber, LK	keine OP: PT OP: LK-M.	PD/-
18	m	68,9	07/98 – 07/98 (synchron)	klarzellig	Lunge, Skelettsystem	OP: PT OP: Lungen-M. Knochen-M.	SD/ (SD) Ausschluss wg. Tox
19	m	68,0	07/96 – ?	klarzellig	Milz, Leber	OP: PT	MR/PD
20	m	48,3	04/00 – 11/99 (synchron)	klarzellig	Lunge, (Haut)*	OP: PT OP: Haut-M.	SD/PD †

Tab. 5: Auflistung der einzelnen Patientencharakteristika und des klinischen Ansprechens; PR partielle Remission, MR gemischte Remission, SD Stabilisierung der Erkrankung, PD Progression; NA nicht analysiert, † verstorben nach Studienabschluss, PT Primärtumor, M Metastase, LK Lymphknoten, mediast. LK mediastinale Lymphknoten, Z Zyklus, OP Operation, R Bestrahlung, Tox. Toxizität, *prätherapeutisch operativ entfernt.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lagen bei acht Patienten (40%) bereits Metastasen vor, wobei bei einem Patienten (#20) zunächst eine Metastasierung der Haut auffiel und der Primärtumor erst später diagnostiziert wurde. Innerhalb eines Jahres wurden bei fünf Patienten (25%) Metastasen festgestellt, bei sechs (30%) nach 24 und mehr Monaten. Bei einem (5%) konnte der Zeitpunkt der Metastasierung nicht genau geklärt werden. Bei vier Patienten (20%) bestanden tumorbedingte Schmerzen.

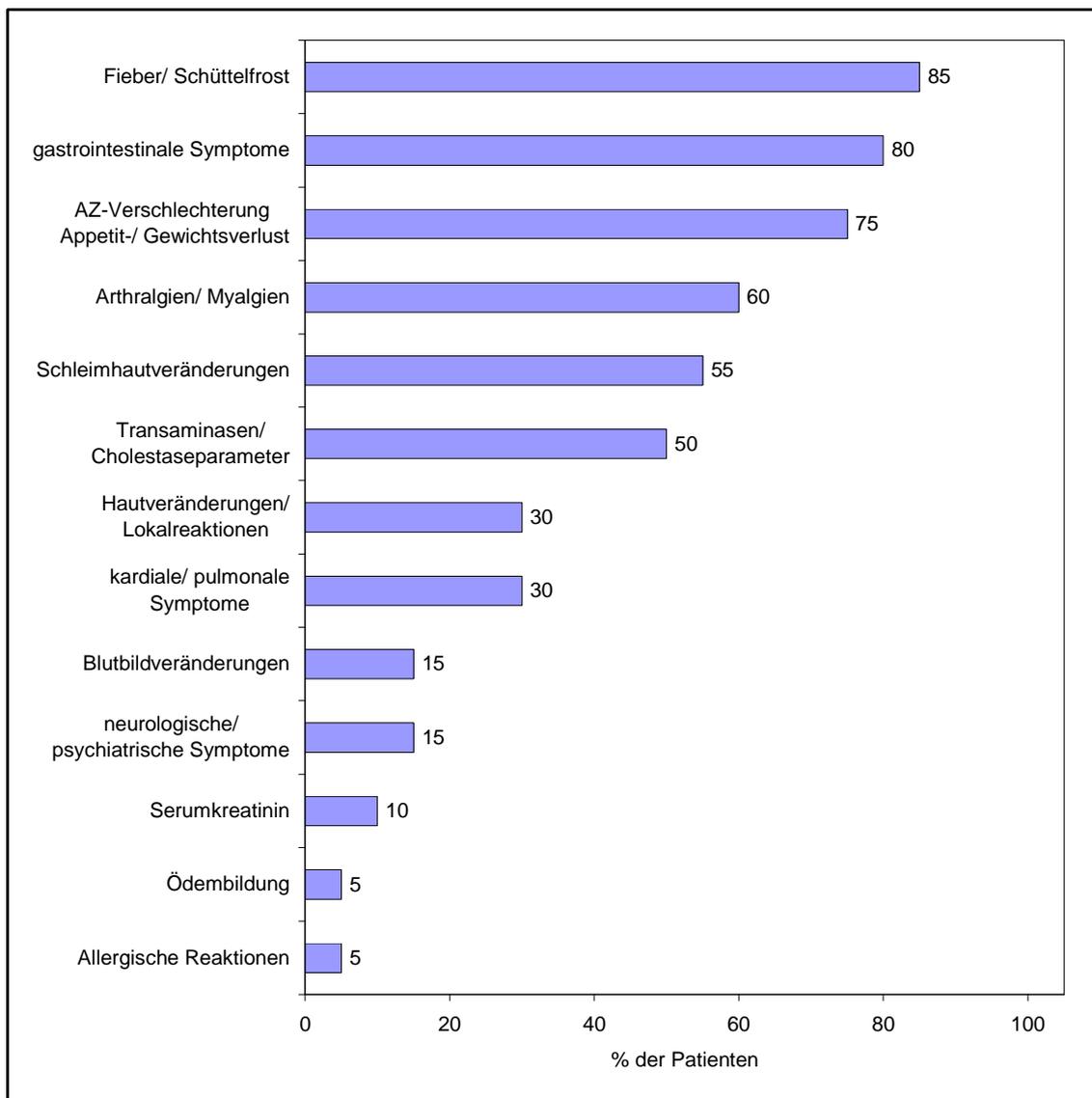
Eine Einteilung in Prognosegruppen entsprechend den MSKCC-Kriterien [14] konnte nicht durchgeführt werden, da aufgrund der teilweise auswärtigen Behandlung Laborparameter wie das korrigierte Serumkalzium und die LDH nicht vorlagen. Eine Einteilung wurde daher nach den Kriterien von JONES ET AL. [15] und PALMER ET AL. [16] in modifizierter Weise vorgenommen. Hierbei wurde die von den Autoren beschriebene „sehr gute“ und „gute“ Prognosegruppe zu einer Gruppe „gut“ zusammengefasst wurden. Im gesamten Patientenkollektiv wiesen sieben Patienten (35%) einen guten, zwölf (60%) einen intermediären und ein Patient (5%) einen ungünstigen Prognosescore auf. Von den 19 klinisch auswertbaren Patienten hatten sechs (32%) einen guten, zwölf (63%) einen intermediären und ein Patient (5%) einen ungünstigen Prognosescore.

4.2 Toxizität und Dosismodifikation

4.2.1 Toxizität

Die Therapie wurde insgesamt moderat toleriert und konnte zumeist ambulant durchgeführt werden. Das Vorkommen unerwünschter Wirkungen und deren Ausprägungsgrad entsprechend den CTC-Kriterien (engl.: *Common Cytotoxicity Criteria*, allgemeine Toxizitätskriterien) ist in Abb. 6 und Tab. 6 dargestellt.

Wie für Zytokintherapien zu erwarten, traten vornehmlich Fieber und Schüttelfrost (85%), Arthralgien und Myalgien (60%), eine Reduktion des Allgemeinzustandes sowie Appetit- und Gewichtsverlust (75%) auf. Über gastrointestinale Beschwerden mit Diarrhöen, Übelkeit und Erbrechen berichteten 80% der Patienten. Weiterhin kam es bei 55% der Patienten zu Schleimhautveränderungen, Stomatitis und Konjunktivitis. Hautirritationen mit Pruritus oder Schwellungen an der Injektionsstelle wurden bei 30% der Patienten beobachtet, eine generalisierte Ödembildung trat bei einem Patienten (5%) kurzfristig während des zweiten Zyklus' auf.



Toxizität	CTC		
	Grad 1 u. 2	Grad 3	Grad 3-4
Insgesamt (von 20 Patienten)	18 (90%)	8 (40%)	1 (5%)
Fieber/ Schüttelfrost	16	1	17 (85%)
gastrointestinale Symptome	11	5	16 (80%)
AZ-Verschlechterung, Appetit-/ Gewichtsverlust	13	2	15 (75%)
Arthralgien/ Myalgien	9	3	12 (60%)
Schleimhautveränderungen	11		11 (55%)
Erhöhung der Transaminasen /Cholestaseparameter	10		10 (50%)
Hautveränderungen/ Lokalreaktionen	6		6 (30%)
kardiale/ pulmonale Symptome	6		6 (30%)
Blutbildveränderungen	3		3 (15%)
neurologische/ psychiatrische Symptome	3		3 (15%)
Erhöhung des Serumkreatinins	2		2 (10%)
Ödembildung	1		1 (5%)
Allergische Reaktionen			1 (5%)

Abb. 6 und Tab. 6: Darstellung der unerwünschten Wirkungen gemäss den CTC-Kriterien unter der Therapie. Die Häufigkeit der unterschiedlichen Toxizitäten ist im Diagramm (% der Patienten), der Ausprägungsgrad in der Tabelle dargestellt (jeweils stärkste auftretende Toxizität pro Patient gewertet).

Diese Nebenwirkungen, wie auch die Erhöhung des Serumbilirubins und der Transaminasen (50% der Patienten) oder des Serumkreatinins (10%) traten überwiegend transient und als Toxizitäten Grad 1 und Grad 2 auf. Neurologische und psychiatrische Symptome wie Parästhesien, Depressionen und Schlafstörungen waren nur mild ausgeprägt (Grad 1) und kamen bei 15% der Patienten nur passager vor. Schwere neurologische und psychiatrische Komplikationen mit Verwirrtheitszuständen, epileptischen Anfällen und ZNS-Thrombosen wurden im Vergleich zu anderen Publikationen [131;159] nicht beobachtet. Hämatologische Veränderungen mit Abfall des Hb-Wertes, Leuko- oder Thrombozytopenien waren bei 15% der Patienten festzustellen und nur gering bis mässig (Grad 1 und Grad 2) ausgeprägt. Kardiale sowie pulmonale Beschwerden mit Palpitationen und Dyspnoe traten in 30% der Fälle mit einer Toxizität Grad 1 und Grad 2 auf (siehe auch 4.2.2).

Fast alle Patienten (90 %) berichteten über geringgradig ausgeprägte Nebenwirkungen im Sinne von Toxizitäten Grad 1 und Grad 2. Bei acht Patienten (40%) wurden Toxizitäten Grad 3 beobachtet. Diese Toxizitäten Grad 3 waren zumeist auf Diarrhöen (5 Patienten), Arthralgien oder Myalgien (3 Patienten) sowie Fieber und Schüttelfrost (1 Patient) mit Verschlechterung des Allgemeinzustandes (2 Patienten) zurückzuführen. Bei einem Patienten (5%) trat eine allergische Reaktion nach der ersten IL-2-Gabe im Sinne einer Toxizität Grad 3 bis 4 auf (siehe auch 4.2.2).

4.2.2 Therapieabbruch

Ein Therapieabbruch wegen inakzeptabler Toxizität erfolgte in zwei Fällen (10%). Ein Patient (#12) erlitt nach der ersten IL-2-Gabe eine allergische Reaktion Grad 3-4 und wurde unter Beendigung der Therapie stationär aufgenommen. Wegen pektanginöser Beschwerden und Dyspnoe Grad 2, die während des zweiten Zyklus' auftraten, wurde bei einem anderen Patienten (#18) die Behandlung nicht fortgesetzt.

Eine Patientin (#7) brach nach dem zweiten Zyklus die Therapie auf eigenen Wunsch hin ab. Therapieassoziierte Todesfälle traten nicht auf.

4.2.3 Dosismodifikation

Pausierungen und Dosismodifikationen wurden bei 40% der Patienten verzeichnet und betrafen vor allem die 5-FU-Gabe (30%). Eine temporäre Unterbrechung mit anschliessender 20%iger Dosisreduktion oder alleiniger Dosisreduktion von 5-FU wurde bei sechs Patienten (#1, 6, 7, 10, 13, 14) durchgeführt. Die Pausierung bzw. Reduktion

der Dosis erfolgte zumeist bereits in der zweiten Woche des ersten Zyklus wegen Stomatitis, persistierender Diarrhöen und Verschlechterung des Allgemeinzustandes sowie einer passageren Thrombozytopenie Grad 2. Bei einem Patienten (#13) erfolgte eine Dosisreduktion erst in der zweiten Woche des zweiten Zyklus'. Zwei Patienten (#3, 20) erhielten wegen Fieber und persistierender, ausgeprägter Myalgien einmalig während des zweiten bzw. vierten Therapiezyklus kein IL-2. GM-CSF und IFN- α wurden regulär verabreicht. Die Therapie konnte bis auf die in 4.2.2 erwähnten Ausnahmen ambulant durchgeführt werden.

4.3 Klinische Ergebnisse

20 Patienten mit gesichertem mNZK begannen die Therapie. Wegen inakzeptabler Toxizität wurden bei zwei Patienten (10%) während des ersten (#12) bzw. zweiten (#18) Zyklus' die Therapie nicht fortgesetzt. Patient #12 wurde auswärtig behandelt; eine weitere Evaluation lag nicht vor. Eine Patientin (#7) brach die Therapie nach dem zweiten Zyklus aufgrund subjektiv zu stark empfundener Nebenwirkungen ab. Sie, wie auch Patient #18, erschienen zu weiteren Kontrolluntersuchungen.

Hinsichtlich des Therapieansprechens konnten somit 19 Patienten ausgewertet werden, wovon 18 Patienten mindestens einen Therapiezyklus erhielten. Ein Patient (#17), der bei Diagnosestellung ein bilaterales Nierenzellkarzinom aufwies, konnte den ersten Zyklus wegen Progredienz der Erkrankung nicht beenden.

4.3.1 Therapieansprechen

Das Therapieansprechen der einzelnen Patienten ist in Tab. 5 aufgelistet und in Abb. 7 schematisch dargestellt. Im Rahmen der Zwischenuntersuchung nach zwei Zyklen wurde bei 5/19 Patienten (26%) eine Progression der Erkrankung (PD) festgestellt, 3/19 (16%) zeigten ein gemischtes Ansprechen (MR), 11/19 Patienten (58%) waren im Erkrankungsverlauf stabil (SD). Insgesamt lag bei 14/19 (73%) Patienten zum Zeitpunkt der Zwischenuntersuchung eine MR oder SD vor. Nachdem bei einem Patienten wegen Toxizität während des zweiten Zyklus' die Therapie beendet wurde und eine Patientin auf eigenen Wunsch hin die Behandlung abbrach, wurde bei zwölf Patienten die Behandlung mit zwei weiteren Zyklen fortgesetzt. Von diesen zwölf Patienten wiesen nach Absolvierung von insgesamt vier Therapiezyklen je vier eine MR, SD oder PD auf. Zwei Patienten, bei denen im Rahmen der Zwischenuntersuchung eine SD festgestellt

wurde, zeigten nach vier Zyklen eine Progression der Erkrankung; bei drei weiteren Patienten mit SD konnte eine MR beobachtet werden. Von den drei Patienten die bei der Zwischenuntersuchung eine MR aufwiesen waren zwei im Erkrankungsverlauf progredient, bei einem blieb die MR erhalten.

Nachdem die beiden Patienten, bei denen die Behandlung aus o.g. Gründen nicht fortgesetzt wurde, im Erkrankungsverlauf stabil blieben, hatten von 19 auswertbaren Patienten nach Therapieabschluss 6/19 Patienten (32%) SD, 4/19 Patienten (21%) MR, und 9/19 Patienten (47%) PD.

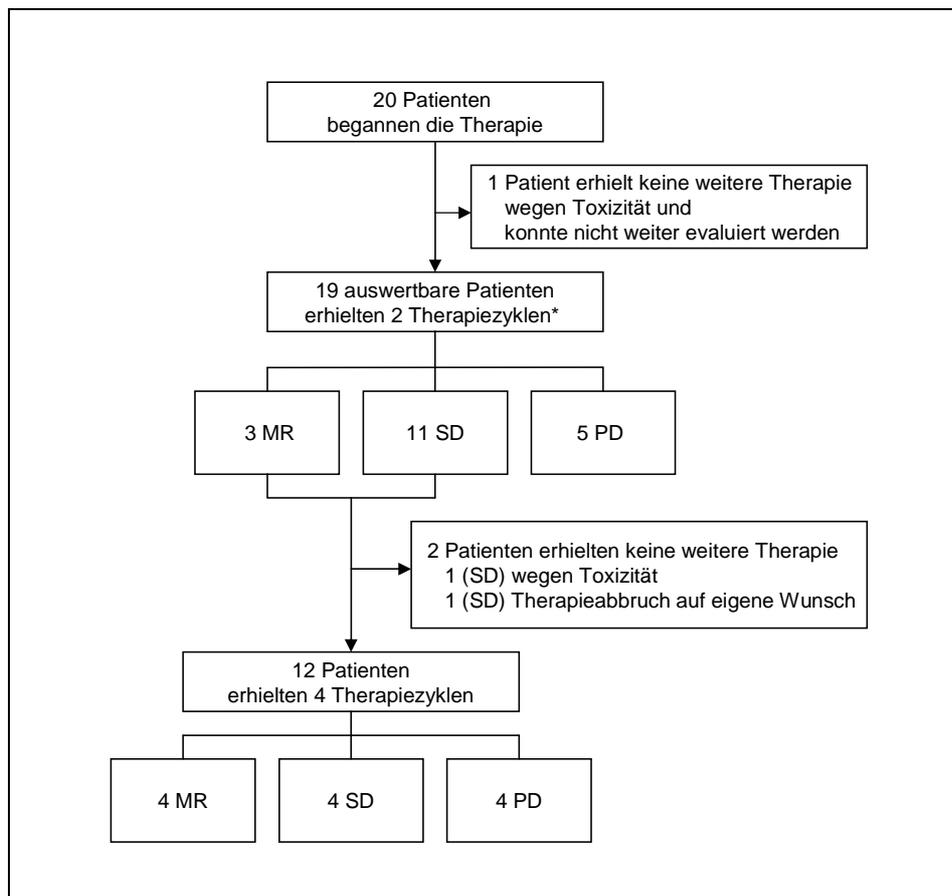


Abb. 7: Schematische Darstellung des Therapieansprechens.

*Ein Patient konnte wegen Progredienz der Erkrankung den ersten Zyklus nicht beenden.

Bei einem Patienten waren nach der Bestrahlung einer symptomatischen Skelettmetastase neben den Knochen- und Weichteilmetastasen auch die Lungenmetastasen nicht mehr nachzuweisen. Aufgrund der vorangegangenen Strahlentherapie wurde die bestrahlte Region nicht in die Bewertung einbezogen und das therapeutische Ansprechen als gemischte Remission (MR) gewertet.

Auffallend war, dass alle sechs Patienten, bei denen eine Pausierung oder Dosisreduktion von 5-FU vorgenommen wurde, eine Erkrankungsstabilisierung oder gemischten Remission aufwiesen. Nur drei Patienten, bei denen eine SD bzw. MR festgestellt wurde, erhielten die volle 5-FU Dosis. Die für die unterschiedlichen Prognosegruppen (siehe Kap. 3.3.3) ermittelten Ansprechraten sind in Kap. 4.3.3 erläutert.

4.3.2 Progressionsfreies Intervall

Eine Darstellung des progressionsfreien Intervalls ist für die Gesamtheit der Patienten und aufgeschlüsselt nach den entsprechenden Prognosegruppen in Abb. 8 abgebildet. Die Ergebnisse für die Prognosegruppen sind zusammen mit den Ansprechraten im nachfolgenden Kapitel weiter erläutert.

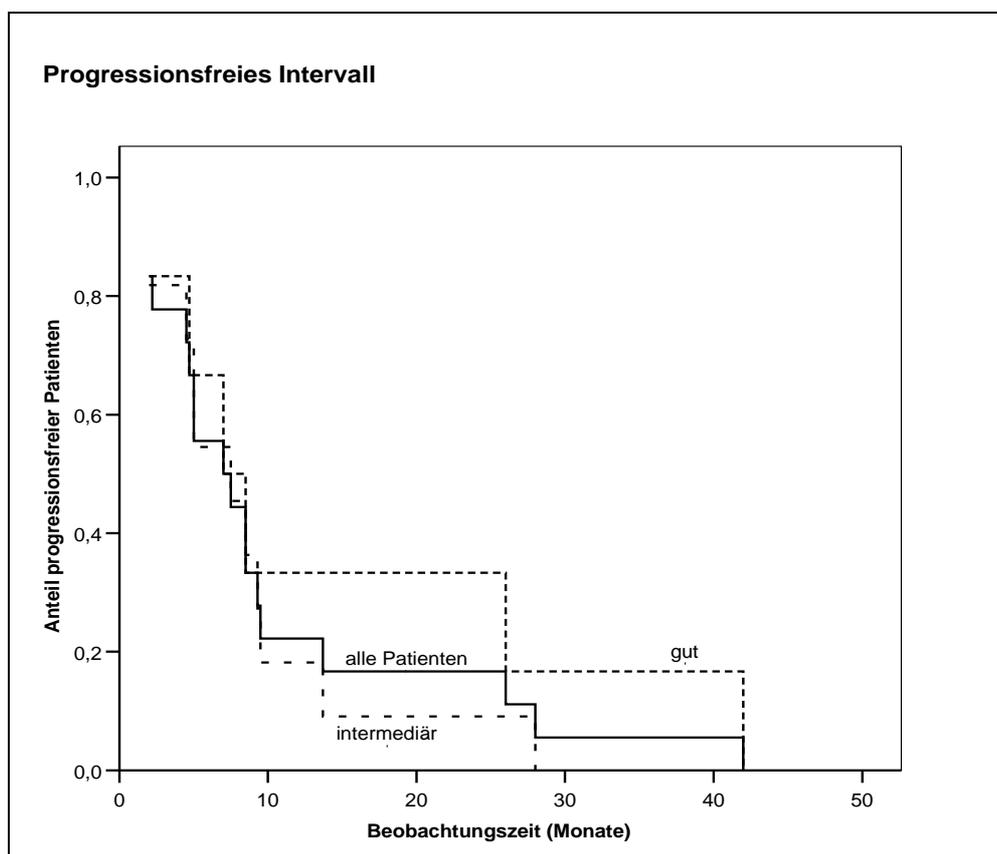


Abb. 8: Darstellung des progressionsfreien Intervalls für die Gesamtheit der Patienten (-) sowie für Patienten der guten (- - -) und intermediären (- · -) Prognosegruppe nach JONES ET AL. [15] und PALMER ET AL. [16].

Die mediane Beobachtungszeit, gerechnet vom Therapiebeginn an, betrug 8,9 Monate (95% CI: 7,0-22,3). Für die Gesamtheit der Patienten wurde ein progressionsfreies Intervall von 7,0 Monaten (95% CI: 4,2-9,8), für Patienten mit SD und MR von

9,3 Monaten (95% CI: 6,9-11,6) nach Therapiebeginn ermittelt. Hierbei konnten zwei Patienten mit MR nur 7,5 bzw. 8,5 Monate und ein Patient mit SD nur 7 Monate nachbeobachtet werden, da sie zu keinen weiteren Kontrolluntersuchungen erschienen. Alle Patienten, die 5-FU in reduzierter Dosis erhielten, waren nach Abschluss der Studie noch am Leben. Das progressionsfreie Intervall dieser Patientengruppe war mit 9,5 Monaten (95% CI: 4,2-14,8) gegenüber 4,7 Monaten (95% CI: 2,4-6,9) für Patienten, die 5-FU in planmässiger Dosierung erhielten, signifikant (P=0.014) verlängert.

Ein besonders langes progressionsfreies Intervall wiesen drei Patienten auf. Sie erhielten nach Studienabschluss 15 Mio.IU IFN- α dreimal pro Woche. Bei zwei dieser Patienten wurde im Therapieverlauf 5-FU reduziert. Ein Patient wurde aufgrund einer symptomatischen Knochenmetastase bestrahlt und erhielt zusätzlich Pamidronsäure. Er war 42 Monate ohne Progression. Die beiden anderen Patienten waren 26 bzw. 28 Monate progressionsfrei. Einer erhielt wegen Nebenwirkungen nur zwei Therapiezyklen gemäß des hier vorgelegten Studienprotokolls.

4.3.3 Prognosegruppen

Das nach den entsprechenden Prognosegruppen aufgeschlüsselte Therapieansprechen ist in Tab. 7 aufgelistet, die Darstellung des progressionsfreien Intervalls ist in Abb. 8 (Kap. 4.3.2) abgebildet.

Therapieansprechen	Prognosegruppe			gesamt n=19
	gut n=7/ evaluierbar n=6 (32%)	intermediär n=12 (63%)	ungünstig n=1 (5%)	
MR	1 (17%)	3 (25%)	0 (0%)	4 (21%)
SD	3 (50%)	3 (25%)	0 (0%)	6 (32%)
PD	2 (33%)	6 (50%)	1 (100%)	9 (47%)

Tab. 7: Therapieansprechen entsprechend der Prognosegruppen nach JONES ET AL. [15] und PALMER ET AL. [16].

In der guten Prognosegruppe war bei 4/6 Patienten (67%) eine MR oder SD, bei 2/6 (33%) eine PD festzustellen. In der intermediären Prognosegruppe wiesen 6/12 Patienten (50%) eine MR oder SD, 6/12 Patienten (50 %) eine PD auf. Bei dem Patienten mit ungünstigem Prognosescore lag nach dem zweiten Zyklus eine Progredienz der Erkrankung vor.

Das progressionsfreie Intervall der Patienten mit einem guten Prognosescore betrug 7,0 Monate (95% CI: 2,4-11,5), der mit einem intermediärem Prognosescore 7,5 Monate (95% CI: 4,2-10,7). Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Fünf Patienten verstarben nach Abschluß der Therapie aufgrund einer manifesten Erkrankungsprogression. Während der Therapie verstarb kein Patient. Ein Patient der guten Prognosegruppe verstarb nach 14 Monaten, vier der intermediären Prognosegruppe verstarben im Median nach 8,5 Monaten, so dass diese Zahlen auf ein verlängertes Überleben für Patienten mit gutem Risikoprofil hindeuten. Nachdem das Gesamtüberleben aber kein primärer oder sekundärer Endpunkt der Studie war, sind diesbezügliche weitere Aussagen nicht möglich und lediglich als Trend zu werten.

Im Einzelnen betrachtet hatten der Zeitpunkt der Metastasierung sowie die Lokalisation und Anzahl der Metastasen keinen Einfluss auf das Therapieansprechen oder die Erkrankungsprogression. Bei acht Patienten lag eine synchrone Metastasierung vor, wobei ein Patient (#12) wegen Nebenwirkungen ausgeschlossen und nicht weiter evaluiert wurde. Von ihnen wiesen vier nach Therapieende eine SD bzw. MR, drei eine PD auf. Alle drei Patienten mit nur einer Metastasenlokalisierung – der Lunge – waren im Erkrankungsverlauf stabil. Aber auch Patienten mit mehreren Metastasenlokalisationen unter anderem des Skeletts und der umgebenden Weichteilgewebe, des Pankreas oder der kontralateralen Niere, sowie Patienten, die sich keiner Nephrektomie unterzogen hatten, wiesen eine MR oder SD auf. Zwei nicht nephrektomierte Patienten waren im Erkrankungsverlauf SD bzw. MR. Bei einem dieser Patienten war nach Abschluss der Therapie kein Lymphknotenbefall mehr nachweisbar. Ansonsten konnte bei der gemischten Remission zumeist ein Rückgang der Metastasierung im Bereich der Lunge verzeichnet werden. Bei einem Patienten war ein kompletter, bei zwei ein partieller Rückgang der pulmonalen Metastasen festzustellen.

4.4 Hämatologische und immunologische Parameter im Therapieverlauf

4.4.1 Blutbild

Die Veränderung der Leukozytenzahlen und ihre weitere Differenzierung in Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten und mononukleäre Zellen ist in Abb. 9 zusammengestellt.

Für die Gesamtheit der Patienten war ein signifikanter Anstieg der Leukozyten knapp über dem oberen Referenzwert festzustellen. Diese Erhöhung war jedoch für eine GM-CSF-basierte Therapie nur gering ausgeprägt. Sieben Patienten hatten nach dem zweiten Zyklus eine Gesamtleukozytenzahl von mehr als 12.000/ μ l. Diese waren, mit einer Ausnahme, zu diesem Zeitpunkt im Erkrankungsverlauf nicht progredient. Die weitere Analyse des Differentialblutbildes ergab einen ebenfalls signifikanten Anstieg der Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten. Die Eosinophilie und Lymphozytose waren aber auch nur mild ausgeprägt, die Monozyten blieben im Normbereich.

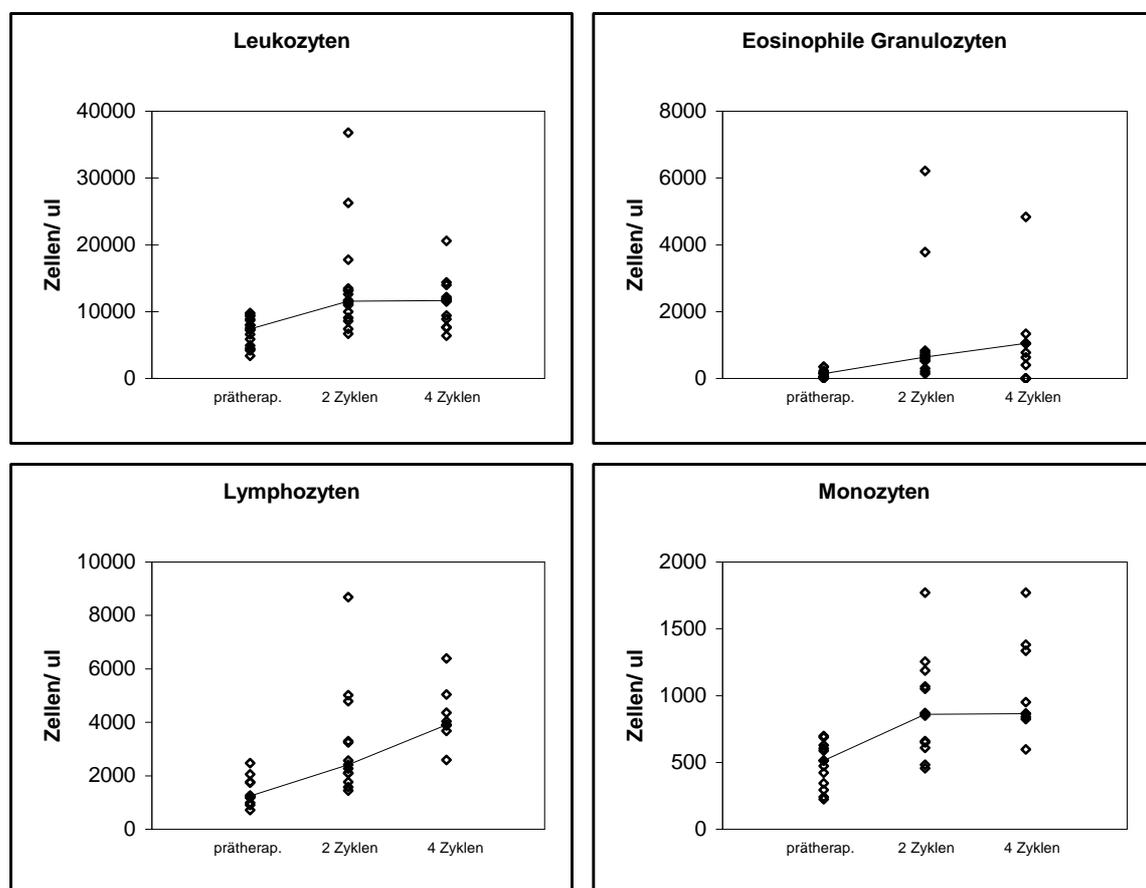


Abb. 9: Veränderung der Gesamtleukozytenzahlen sowie der eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (in Zellen/ μ l) im Therapieverlauf. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Median.

Signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und denjenigen ohne Erkrankungsprogression hinsichtlich einer therapieassoziierten Veränderung der jeweiligen Zellzahlen ergaben sich nicht. Zudem war kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen, die sich bezüglich ihres Prognosescores oder 5-FU-Dosierung unterschieden, festzustellen.

4.4.2 Effektorzellen und Subpopulationen

Eine weitere Differenzierung der PBMC-Population wurde anhand der in Kap. 3.4.1 erwähnten Oberflächenmarker durchflusszytometrisch vorgenommen. Bei zwei Patienten lag aufgrund der auswärtigen Behandlung kein Differentialblutbild zur Berechnung der absoluten Zellzahl vor. Vor Therapiebeginn konnten somit 17 nach zwei und vier Zyklen jeweils elf der klinisch auswertbaren Patienten evaluiert werden. Die Veränderung der Zellzahlen der unterschiedlichen Subpopulationen ist in Abb. 10 dargestellt.

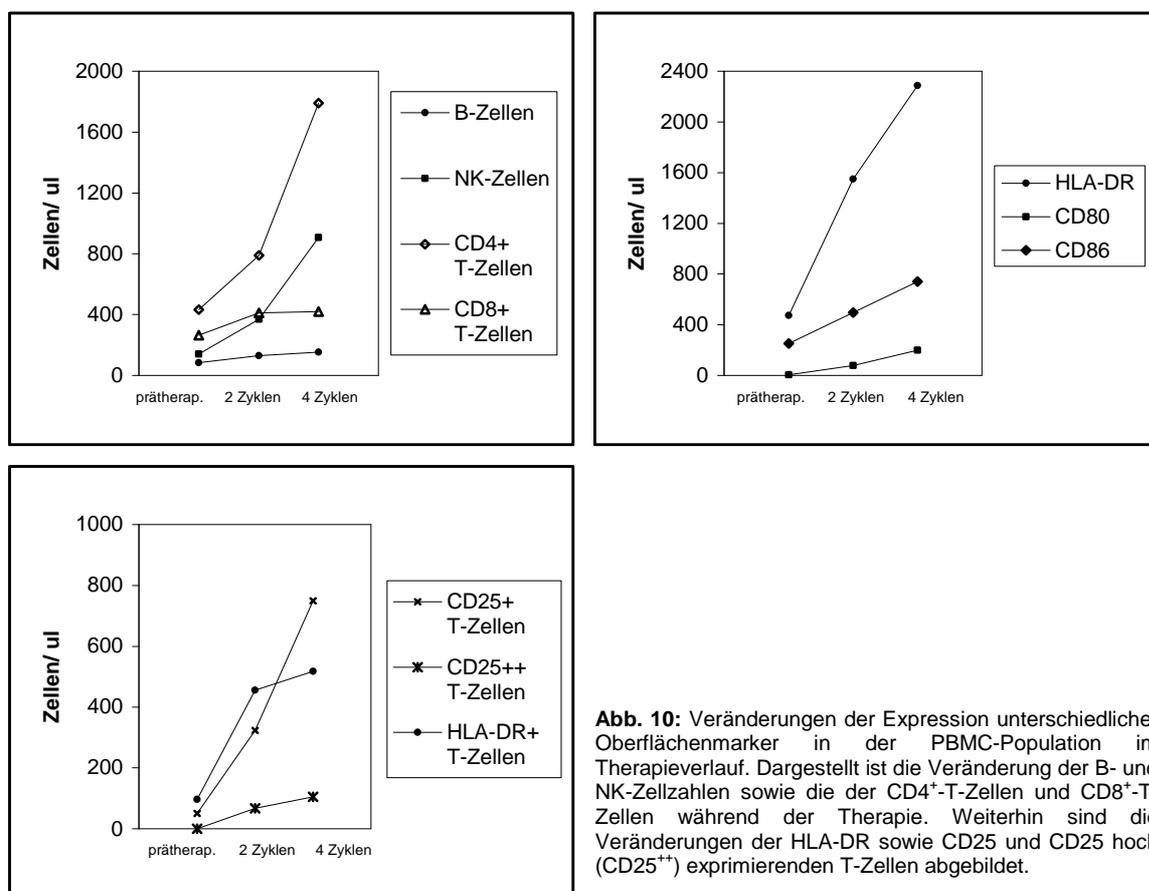


Abb. 10: Veränderungen der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker in der PBMC-Population im Therapieverlauf. Dargestellt ist die Veränderung der B- und NK-Zellzahlen sowie die der CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen während der Therapie. Weiterhin sind die Veränderungen der HLA-DR sowie CD25 und CD25 hoch (CD25⁺⁺) exprimierenden T-Zellen abgebildet.

Wie bereits die Auswertung des Differentialblutbildes erkennen ließ, war eine signifikante Erhöhung der Monozyten nach zwei ($P=0.016$) und vier Zyklen ($P=0.008$) festzustellen. Ebenso stiegen die NK-Zellen nach zwei ($P=0.021$) und nochmals nach vier Therapiezyklen ($P=0.008$) signifikant an. Die Anzahl der B-Zellen war nicht signifikant, die der T-Zellen schon nach zwei Therapiezyklen signifikant ($P=0.010$) erhöht. Vor allem die CD4⁺-T-Zellen stiegen bereits nach zwei Zyklen ($P=0.016$) an, die CD8⁺-T-Zellen weniger ausgeprägt und erst nach dem vierten Therapiezyklus

($P=0.008$). Die Expression der DC-Differenzierungsmarker CD83 und des Langerhanszellantigens CD1a wurde auf HLA-DR⁺-PBMC untersucht, wobei beide nach vier Zyklen signifikant ($P_{CD1a}=0.021$ bzw. $P_{CD83}=0.035$) vermehrt nachweisbar waren. Veränderungen des Aktivierungsstatus' wurden anhand der Expression von HLA-DR und CD25 überprüft. Hierbei wurde für beide Oberflächenantigene eine signifikant vermehrte Expression nach zwei ($P_{HLA-DR}=0.008$ bzw. $P_{CD25}=0.003$) und vier Zyklen (jeweils $P=0.008$) festgestellt.

Eine Analyse der unter anderem durch CD4⁺/CD25⁺⁺ charakterisierten T_{reg} erfolgte nicht, da diese bei Initiierung der Studie noch nicht hinreichend phänotypisiert waren. Diese T-Zellpopulation weist neben der Expression von Fox-P3 eine hohe Expression von CD25 (CD25⁺⁺) auf. Das Phänomen der CD25-Expression ist unter einer IL-2-basierten Therapie jedoch nicht ausreichend zu verwerthen, da es ebenso die aktivierten Lymphozyten kennzeichnet. Ein Anti-Fox-P3-Antikörper stand zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Neben der Zunahme der CD25⁺-Expression war auch ein Anstieg der CD25⁺⁺-Expression auf T-Zellen nach zwei ($P=0.003$) und vier Zyklen ($P=0.011$) im Therapieverlauf zu verzeichnen.

Sowohl die Expression von HLA-DR, als auch der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 stieg in der PBMC-Population im Therapieverlauf an. CD80 und CD86 wurden sowohl auf klassischen APC, wie B-Zellen und Monozyten, aber auch auf T-Zellen vermehrt exprimiert. Dieser Anstieg war bereits nach dem zweiten Zyklus signifikant. Die Besonderheit dieser CD80 bzw. CD86 koexprimierenden T-Zellen ist in Kap. 4.7 weiter ausgeführt.

Ferner erfolgte ein Vergleich zwischen den Patienten mit progredientem (PD) und nicht progredientem (MR+SD) Krankheitsverlauf. Bei nicht signifikanten Unterschieden der Gesamt-T-Zellzahl kam es bei Patienten mit PD im Therapieverlauf zu einer signifikant vermehrten Expression von CD4 sowie CD80 und CD86 auf T-Lymphozyten. Ebenso war bei diesen die HLA-DR- sowie die CD25- und auch die CD25⁺⁺-Expression auf T-Zellen erhöht, wobei dies nicht signifikant war.

Hinsichtlich der Prognosegruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

4.5 Veränderung der zytotoxischen Aktivität von PBMC im Therapieverlauf

Veränderungen der zellulären Toxizität wurden mit Hilfe des JAM-Tests (Abk.; engl.: „*Just Another Method*“) nach MATZINGER [163] untersucht. Hierbei wurde die zytolytische Aktivität gegenüber Zellen, die Nierenzellkarzinomspezifische Epitope exprimierten sowie die NK-Zell- und Nicht-NK-Zell-vermittelte zytotoxische Aktivität analysiert. Mit der NZK-Zelllinie SLO stand eine NZK-Epitope exprimierende Zelllinie zur Verfügung, die CML-Zelllinie K562 stellt eine NK-Zell-sensitive, die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Rajii eine NK-Zell-resistente Zelllinie dar.

Untersucht wurden drei unterschiedliche Effektor-Zielzell-Verhältnisse, die der testinternen Kontrolle dienten und ein erwartetes konzentrationsabhängiges Wertemuster der Lyseraten ergaben. Die Ergebnisse für das Effektor-Zielzell-Verhältnis 100:1, das am deutlichsten die Unterschiede im Therapieverlauf widerspiegelt, sind in Abb. 11 dargestellt.

Aufgrund von Materialmangel wurden vor der Therapie und nach zwei Zyklen nur jeweils sieben Patienten untersucht. Bei zwei dieser Patienten lag zum Zeitpunkt der Zwischenuntersuchung eine Erkrankungsprogredienz vor, so dass keine weitere Analyse erfolgte. Eine weitere Untersuchung nach vier Zyklen wurde somit bei fünf Patienten durchgeführt. Aufgrund der geringen Probandenzahl war eine subgruppenspezifische Analyse nicht möglich. Eine statistische Auswertung erfolgte daher nur für die Gesamtheit der Patienten. Fast alle analysierten Patienten erhielten 5-FU in regelhafter Dosierung. Jeweils drei Patienten hatten einen guten oder intermediären, ein Patient (#15) hatte einen ungünstigen Prognosescore.

4.5.1 Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber SLO

Für die Gesamtheit der analysierten Patienten ergab sich ein nicht signifikanter Anstieg der Zytotoxizität gegenüber der Nierenzellkarzinomzelllinie SLO (in Abb. 11 mit ● dargestellt). Ein Zusammenhang mit den Effektorzellzahlen bestand nicht.

Im Detail betrachtet war jedoch für die meisten Patienten ein Anstieg der Zytotoxizität nach zwei Zyklen festzustellen. Bei einem Patienten blieb sie relativ konstant, bei einem anderen (#20) sank sie ab. Eine weitere Analyse wurde nach vier Zyklen bei fünf Patienten durchgeführt. Die Lyserate lag bei vier Patienten noch über dem

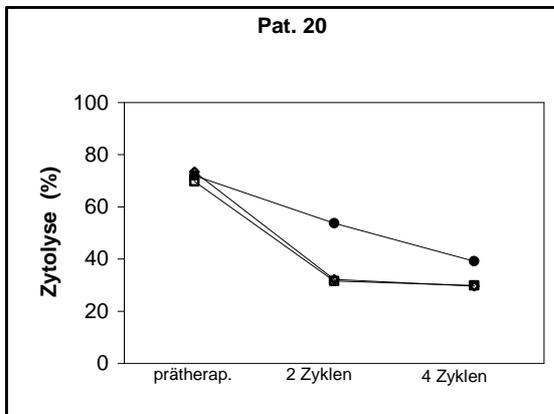
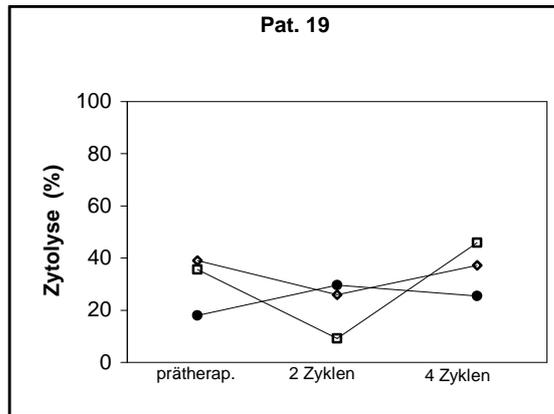
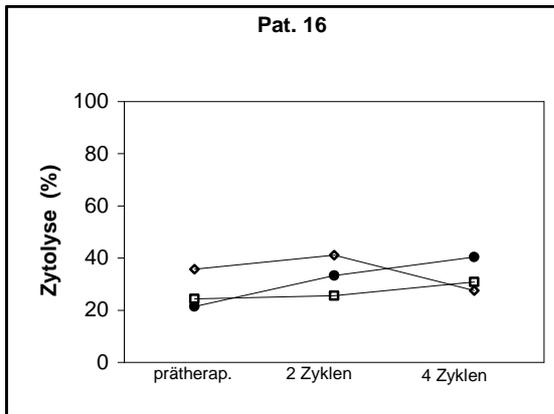
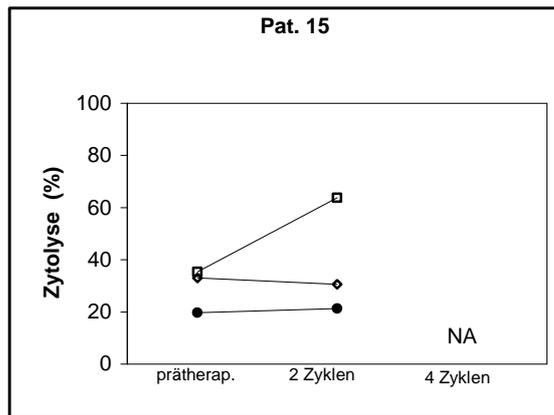
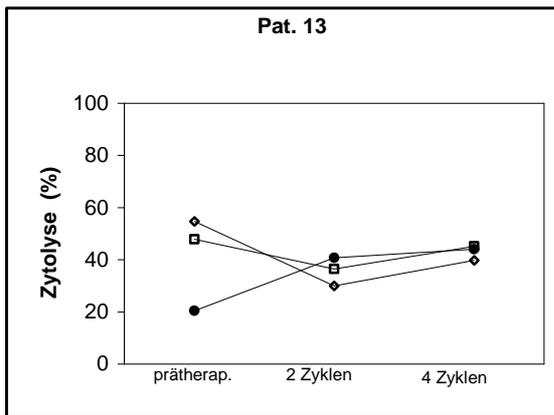
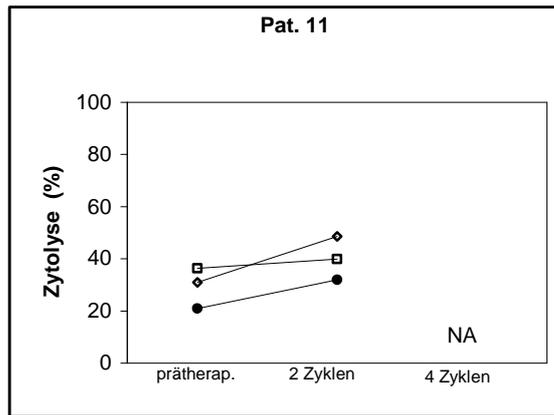
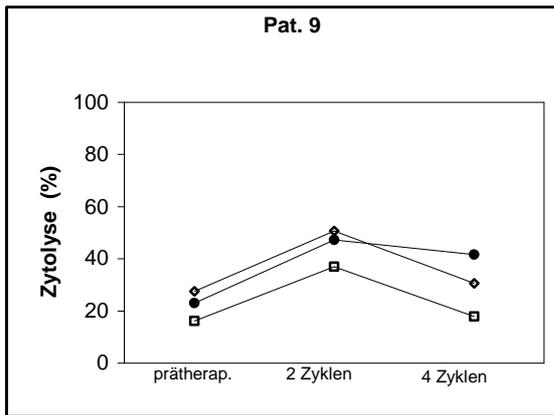


Abb. 11: Veränderung der zytolytischen Aktivität der Patienten-PBMC unter der Therapie. Die Darstellung zeigt die Veränderungen der zytolytischen Aktivität für ein Effektor-Zielzell-Verhältnis von 100:1 gegenüber der NZK-Zelllinie SLO (●), der NK-Zell-sensitiven Zelllinie K562 (□) und der NK-Zell-resistenten Zelllinie Raji (◇); NA nicht analysiert.

prätherapeutischen Wert, während es bei einem Patienten (#20) zu einem weiteren Absinken kam.

4.5.2 Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber K562

Insgesamt war eine statistisch nicht signifikante Abnahme der Zytotoxizität gegenüber der NK-Zell-sensitiven Zelllinie K562 (in Abb. 11 mit □ dargestellt) festzustellen. Eine Korrelation der Zytolyserate mit den Effektorzellzahlen, insbesondere der Anzahl der CD56⁺-PBMC, ergab sich nicht. Trotz zumeist ansteigender NK-Zellzahlen war nur bei wenigen Patienten ein Anstieg der zytolytischen Aktivität zu verzeichnen.

Eine erhöhte zytolytische Aktivität nach zwei Zyklen ergab sich bei zwei, ein Absinken bei drei Patienten. Drei Patienten wiesen eine relativ konstante zytolytische Aktivität auf. Bei der Analyse von fünf Patienten nach vier Zyklen befand sich die Lyserate bei drei Patienten auf nahezu prätherapeutischem Niveau. Bei einem lag sie etwas darüber, bei einem anderen Patienten (#20) sank die Zytolyserate weiter.

4.5.3 Zytotoxische Aktivität der PBMC gegenüber Raji

Gegenüber der NK-Zell-resistenten Zelllinie Raji (in Abb. 11 mit ◇ dargestellt) war für die Gesamtheit der analysierten Patienten eine eher rückläufige Zytotoxizität festzustellen. Zudem konnte kein Zusammenhang mit den Effektorzellzahlen ermittelt werden.

Bei zwei Patienten kam es nach zwei Zyklen zu einer Zunahme, bei drei zu einer Abnahme der Zytotoxizität. Zwei weitere wiesen kaum veränderte Zytolyseraten auf. Nach vier Zyklen war die Zytolyserate bei zwei Patienten auf nahezu prätherapeutischem Niveau, bei drei Patienten lag sie darunter.

4.6 Veränderung der proliferativen und stimulatorischen Kapazität von PBMC im Therapieverlauf

Um unterscheiden zu können, ob es im Therapieverlauf zu einer Änderung der proliferativen oder stimulatorischen Kapazität kam, wurde dies mit dem im Folgenden dargestellten Versuchsaufbau getrennt untersucht.

Die proliferative Kapazität der Patienten-PBMC wurde durch die Stimulation mit IL-2 und PHA (Phytohämagglutinin) überprüft. Die stimulatorische Kapazität wurde in der

gemischten Lymphozytenkultur mit bestrahlten Patienten-PBMC als Stimulatoren und allogenen T-Zellen als Effektorzellen bestimmt.

Die zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten isolierten PBMC konnten von zwölf Patienten hinsichtlich ihrer stimulatorischen und proliferativen Kapazität analysiert werden. Bei einem dieser Patienten (#5) lag kein Material nach zwei Zyklen vor. Bei zwei Patienten (#11, 15) wurde keine Analyse nach vier Zyklen vorgenommen, da die Therapie aufgrund einer klinisch manifesten Progression beendet wurde. Eine Patientin (#7) beendete die Therapie nach zwei Zyklen, so dass keine Messungen nach vier Zyklen durchgeführt werden konnten. Somit wurden vor der Therapie zwölf, nach zwei Zyklen elf und nach vier Zyklen neun Patienten analysiert. Die Ergebnisse der proliferativen und stimulatorischen Kapazität sind jeweils einzeln für Patienten mit progredientem (PD) und nicht progredientem (MR+SD) Krankheitsverlauf in den Abb. 13a/b und Abb. 14a/b dargestellt sowie in Abb. 12 zusammengefasst. Zu beachten ist, dass von den hier analysierten Patienten bei fünf (#6, 7, 10, 13 und 14) eine Pausierung bzw. Dosisreduktion von 5-FU vor oder während des zweiten Zyklus' vorgenommen wurde.

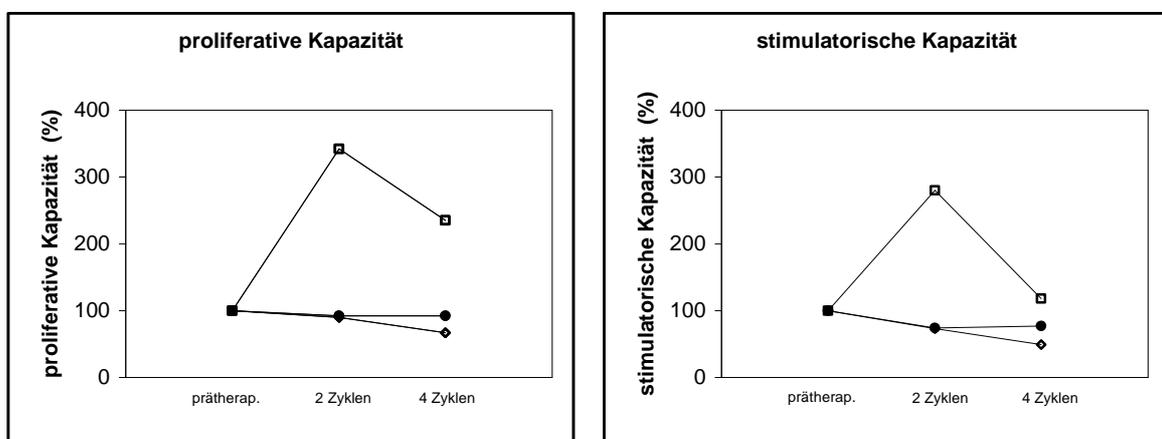


Abb. 12: Veränderung der proliferativen und stimulatorischen Kapazität. Dargestellt sind die Veränderungen in % ausgehend von einem prätherapeutischen Wert von 100% für die Gesamtheit der Patienten (●) sowie aufgliedert für Patienten mit progredientem (◇ PD) und nicht progredientem (□ MR+SD) Krankheitsverlauf. Die Veränderungen der stimulatorischen Kapazität sind für eine Stimulator-Zielzell-Verhältnis von 1:2 abgebildet

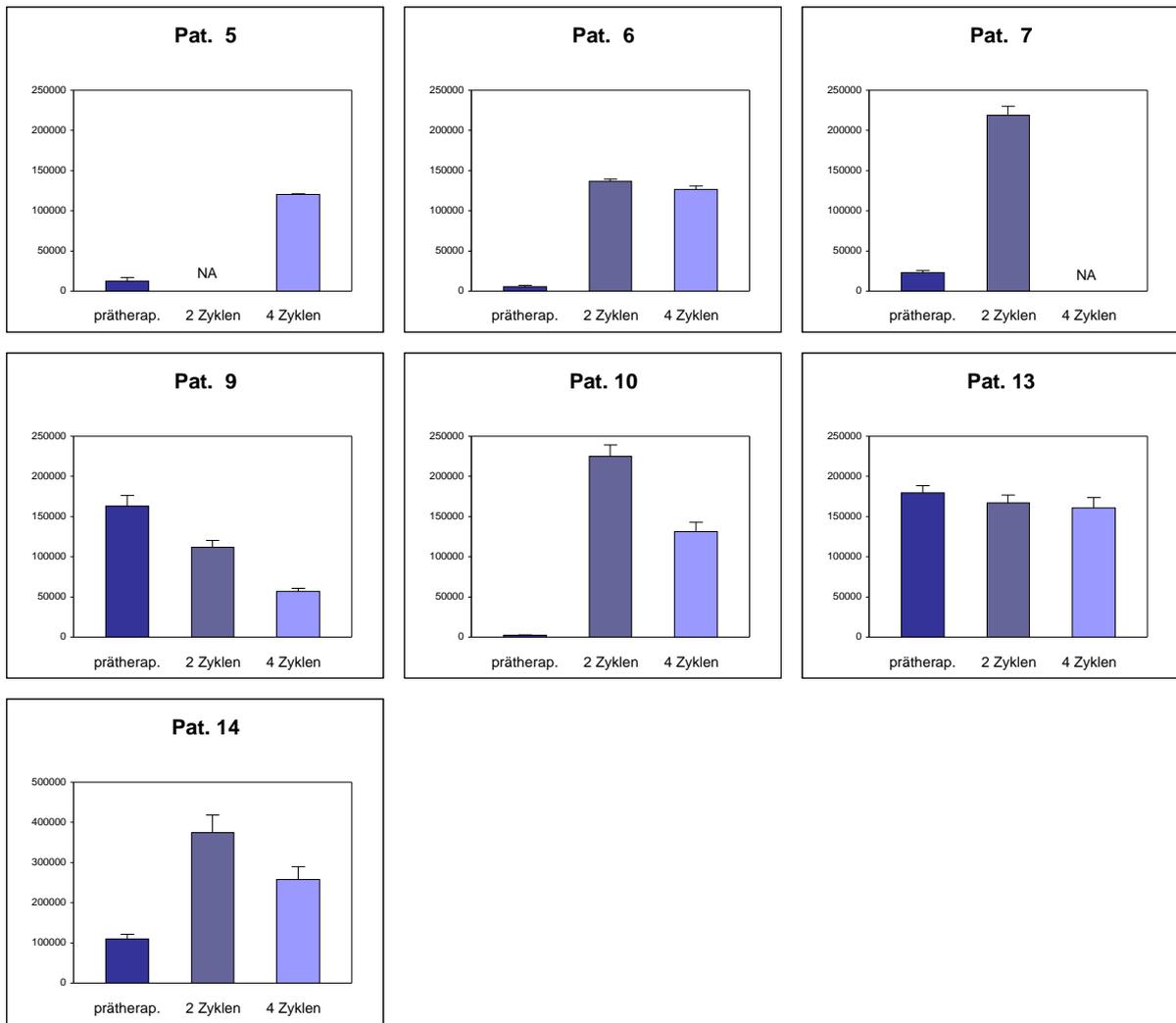


Abb. 13a: Veränderung der proliferativen Kapazität bei Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD); NA nicht analysiert.

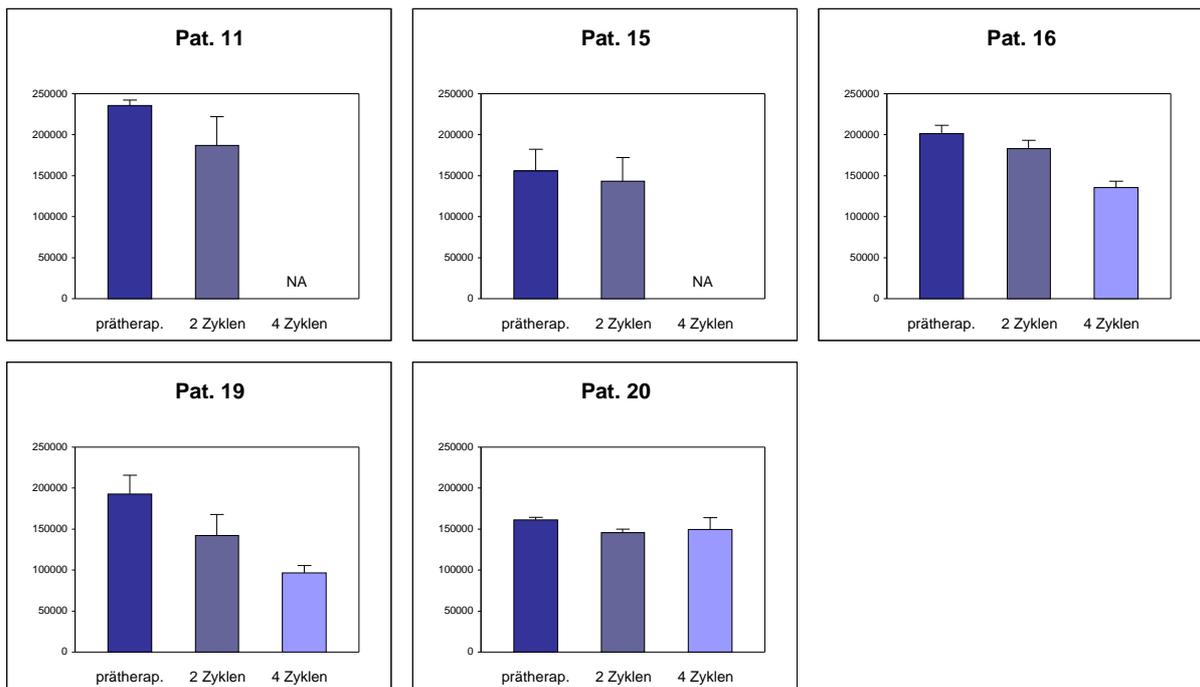


Abb. 13b: Veränderung der proliferativen Kapazität bei Patienten mit Erkrankungsprogression (PD); NA nicht analysiert.

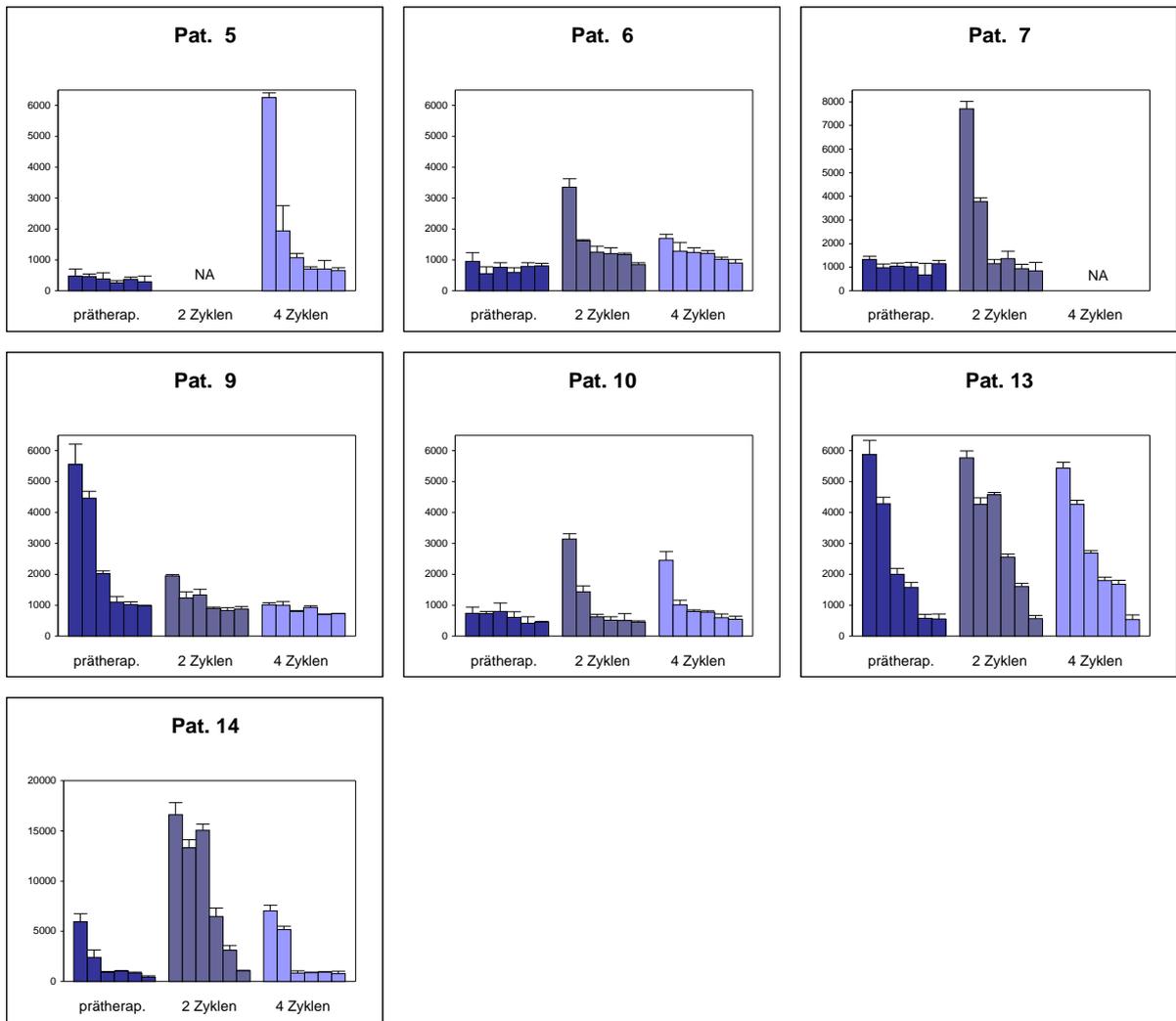


Abb. 14a: Veränderung der stimulatorischen Kapazität bei Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD); NA nicht analysiert.

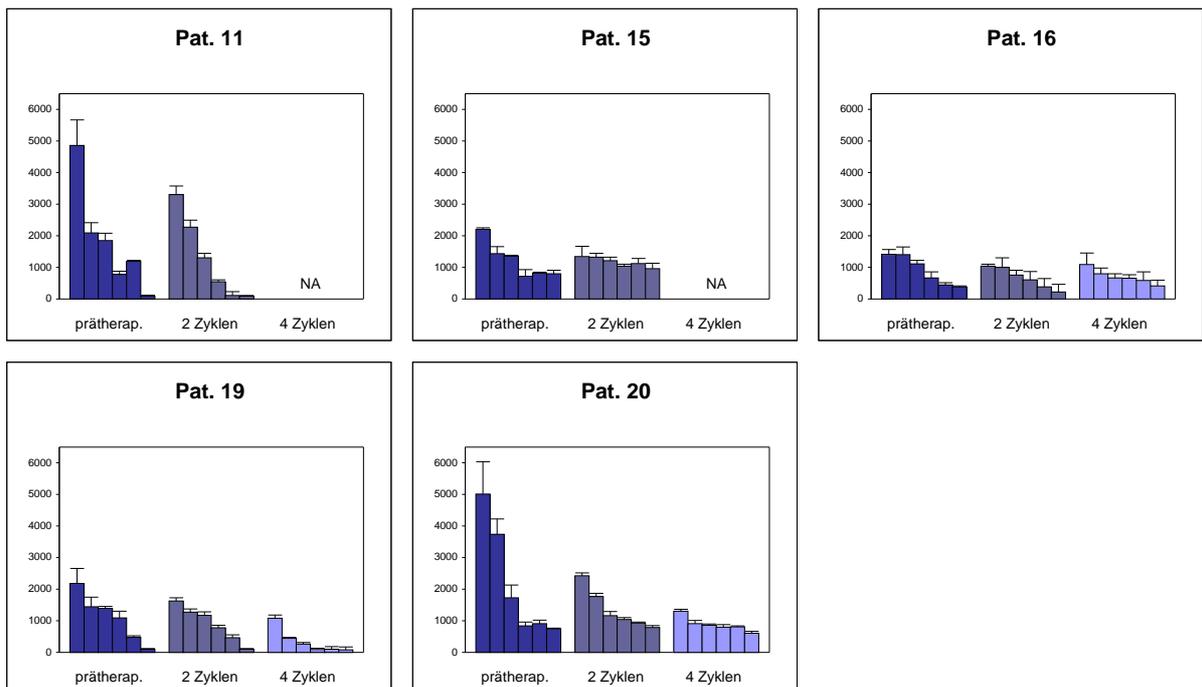


Abb. 14b: Veränderung der stimulatorischen Kapazität bei Patienten mit Erkrankungsprogression (PD); NA nicht analysiert.

4.6.1 Veränderung der proliferativen Kapazität der PBMC

Für die Gesamtheit der analysierten Patienten (siehe Abb. 12 mit ● dargestellt) ergab sich eine leicht rückläufige proliferative Kapazität. Aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen war für Patienten ohne Erkrankungsprogression (□ MR+ SD) eine Erhöhung der Proliferation nach zwei Zyklen auf das 3,4-fache, nach vier Zyklen auf das 2,3-fache des Ausgangswertes festzustellen. Hingegen war für Patienten mit PD (◇) ein Rückgang zu beobachten. Aufgrund der geringen Patientenzahl und der großen Streuweite war der Unterschied nicht signifikant.

Im Detail betrachtet (siehe Abb. 13a/b) ergab sich bei vier Patienten nach zwei Zyklen eine Zunahme der proliferativen Kapazität, bei vier Patienten lag sie nach vier Zyklen über dem Ausgangswert. All diese Patienten wiesen klinisch keine Progression auf und hatten weiterhin aufgrund von Nebenwirkungen eine Pausierung bzw. Dosisreduktion von 5-FU erhalten. Nur bei einem Patienten, der im Erkrankungsverlauf stabil war, war die proliferative Kapazität rückläufig, während dies bei fast allen Patienten mit PD festzustellen war.

4.6.2 Veränderung der stimulatorischen Kapazität der PBMC

Die gemischte Lymphozytenkultur misst die proliferative Antwort der T-Zellen auf einen antigenen Stimulus, welcher auf APC präsentiert wird. In den hier dargestellten Experimenten wurden bestrahlte Patienten-PBMC als Stimulatoren und allogene T-Zellen gesunder Blutspender als Zielzellen eingesetzt. Somit konnte die stimulatorische Kapazität getrennt von der proliferativen Kapazität untersucht werden. In einer Verdünnungsreihe mit sechs unterschiedlichen Stimulator-Zielzell-Verhältnissen, die der testinternen Kontrolle dienten, zeigte sich ein erwartetes Wertemuster der Proliferationsraten (siehe Abb. 14a/b). Die Darstellung in Abb. 12 erfolgte für ein Stimulator-Zielzell-Verhältnis von 1:2, das am deutlichsten die Unterschiede widerspiegelt.

Für die Gesamtheit der analysierten Patienten (siehe Abb. 12 mit ● dargestellt) ergab sich, wie bereits für die proliferative Kapazität beobachtet, ein Rückgang der stimulatorischen Kapazität. Bei der getrennten Analyse war, analog zu den Ergebnissen der Proliferationsanalyse, bei Patienten ohne Krankheitsprogredienz (□ SD+MR), insbesondere nach dem zweiten Zyklus, ein Anstieg auf das 2,8-fache des Ausgangswertes festzustellen, während es für Patienten mit PD (◇) zu einem Absinken

kam. Nach vier Zyklen lag die stimulatorische Kapazität für Patienten mit SD+MR noch geringfügig über dem Ausgangsniveau, hingegen kam es bei den Patienten mit PD zu einem weiteren Absinken auf die Hälfte des prätherapeutischen Wertes. Wie bereits bei der proliferativen Kapazität wurde auch bei der stimulatorischen Kapazität eine Zunahme insbesondere bei Patienten, die eine Pausierung bzw. Dosisreduktion von 5-FU erhielten, festgestellt. Diese Unterschiede waren sowohl für die proliferative als auch stimulatorische Kapazität aufgrund der großen Streuweite und geringen Probandenzahl nicht signifikant.

4.7 Koexpression von CD80 bzw. CD86 auf T-Zellen

In der hier vorgelegten Studie wird erstmalig ein Anstieg CD80 bzw. CD86 koexprimierender T-Zellen unter einer zytokinbasierten Therapie beschrieben was eine Besonderheit dieser Arbeit darstellt. Dieser Anstieg war nach dem zweiten ($P_{CD80}=0.009$ bzw. $P_{CD86}=0.013$) und vierten Zyklus (jeweils $P=0.008$) signifikant. Die Veränderung der absoluten Zellzahlen ist in den Box-Whisker-Plots zum einen für die Gesamtheit der Patienten (Abb. 15a), zum anderen aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen (Abb. 15b) dargestellt.

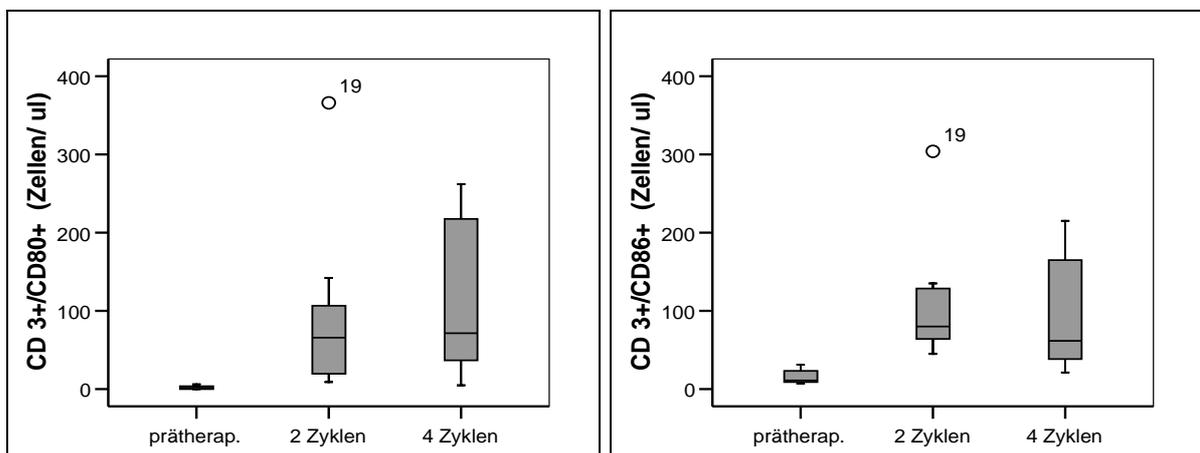


Abb. 15a: Veränderung der CD80- bzw. CD86-Expression auf T-Zellen im Therapieverlauf, dargestellt für die Gesamtheit der analysierten Patienten.

Bei prätherapeutisch noch vergleichbaren Zellzahlen, zeigten vor allem Patienten mit PD nach dem zweiten und vierten Zyklus einen Anstieg der CD80 sowie CD86 auf T-Zellen. Hingegen ergab sich für Patienten mit MR+SD nur eine geringfügige, nicht signifikante Veränderung, welche auch erst nach dem vierten Therapiezyklus festzustellen war. Der Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen war nach dem vierten Zyklus sowohl für die CD3⁺/CD80⁺-Zellen (P=0.024) als auch die CD3⁺/CD86⁺-Zellen (P=0.021) signifikant. Ein Unterschied zwischen den Patientengruppen, die sich hinsichtlich ihres Prognosescores unterschieden, war nicht festzustellen.

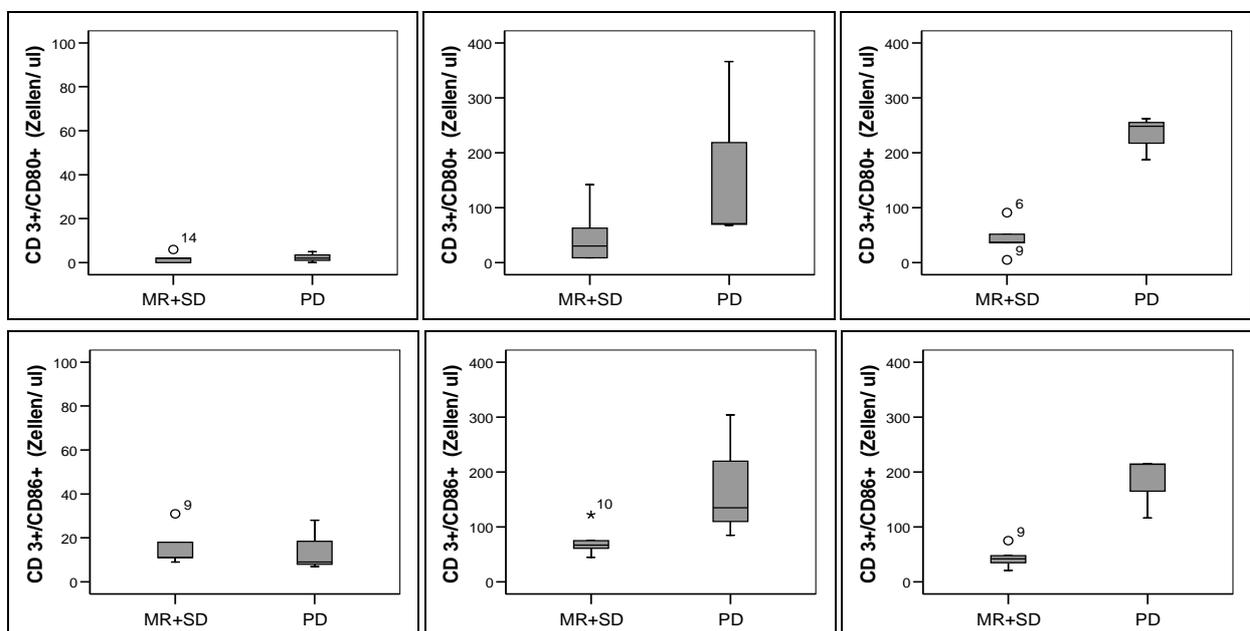


Abb. 15b: Veränderung der CD80- bzw. CD86-Expression auf T-Zellen, aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen. Dargestellt sind die Veränderungen getrennt für Patienten mit Progression (PD) und ohne Progression der Erkrankung (MR+SD). Die Box-Whisker-Plots der CD3⁺/CD80⁺-Zellen sind im oberen, die der CD3⁺/CD86⁺-Zellen im unteren Abschnitt abgebildet.

Vor allem bei Patienten mit PD war bei ansteigenden Aktivierungsparametern auf T-Zellen auch eine vermehrte Expression von CD80 und CD86 auf T-Zellen festgestellt werden. Zudem wiesen diese Patienten einen Rückgang der proliferativen und stimulatorischen Kapazität auf. Dagegen konnte für Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD), bei ansteigenden Aktivierungsparametern und kaum erhöhtem Anteil der CD80⁺-T-Zellen und CD86⁺-T-Zellen, eine Zunahme der proliferativen und stimulatorischen Kapazität, insbesondere nach dem zweiten Zyklus nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Bis vor kurzem stellte die Zytokintherapie noch den Standard bei der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms dar [31;38]. Trotz der Heterogenität der berichteten Ansprechraten wurden in zahlreichen Studien Remissionsraten von 15% für die Zytokine IL-2 und IFN- α [40;94;106] bis über 30% für die Kombination mit dem Zytostatikum 5-FU publiziert [101;145;146;164]. Präklinische und klinische Vorarbeiten unserer [154] und anderer Arbeitsgruppen [115-118;155;159] deuteten auf eine immunologische Antitumoraktivität von GM-CSF, insbesondere in Verbindung mit IL-2 und IFN- α . In der vorliegenden Studie wurde eine Kombination von GM-CSF mit den T-Zell- und NK-Zell-aktiven Zytokinen IL-2 und IFN- α gewählt, um so eine simultane Verstärkung der Antigenpräsentation und der Effektorzellantwort zu induzieren. Die weite Verbreitung der Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- α und 5-FU zum Zeitpunkt der Initiierung der Studie [38] sowie die bereits erwähnten Überlegungen zur Induktion einer Tumorzellapoptose mit nachfolgender Aktivierung der Antigenpräsentation und der Effektorzellen durch GM-CSF und IL-2 führten zu dem Entschluss, 5-FU in das Therapieprotokoll zu integrieren.

Es wurde somit eine Phase-I/II-Studie zur niedrigdosierten, sequentiellen Applikation von IFN- α und 5-FU, gefolgt von einer Kombination aus GM-CSF und IL-2 initiiert und hinsichtlich der ambulanten Durchführbarkeit, Toxizität sowie den klinischen und immunmodulatorischen Effekten untersucht.

5.1 Toxizität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ambulante Durchführung einer Therapie mit GM-CSF, IL-2, IFN- α und 5-FU nach diesem Protokoll bei moderater Verträglichkeit möglich ist.

Wie für Zytokintherapien zu erwarten, traten vor allem Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Arthralgien oder Myalgien und Beeinträchtigungen des Allgemeinzustandes auf. Zudem wurden Diarrhöen, Erbrechen und Übelkeit sowie Stomatitiden beobachtet. Diese Symptome trugen zu einem Großteil der berichteten Toxizitäten Grad 3 bei und waren zumeist auf die Gabe von 5-FU zurückzuführen. Pausierungen und Dosismodifikationen betrafen, wie bereits von anderen Autoren für

die Anwendung der Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- α und 5-FU publiziert [147;150], vor allem die 5-FU-Gabe. Mit toxisitätsbedingten Therapieabbrüchen bei 10% der Patienten sowie dem Auftreten von Toxisitäten Grad 3 und mehr in 40% der Fälle war die Verträglichkeit insgesamt mit anderen Studien vergleichbar [147-151;164;165], jedoch schlechter im Vergleich zu den Publikationen der Arbeitsgruppe um ATZPODIEN [101;142]. Schwerwiegende Myelosuppressionen mit Neutropenie und Sepsis [165] wurden hingegen nicht beobachtet, so dass für GM-CSF als Wachstumsfaktor ein Vorteil in der Kompensation einer 5-FU-bedingten Neutropenie zu vermuten ist.

Im Gegensatz zur HD-IL-2-Therapie waren das Spektrum und die Intensität der Nebenwirkungen geringer ausgeprägt und vergleichbar mit anderen Studien, die sc-IL-2 als Monotherapie oder in Kombination mit IFN- α einsetzten [103;104]. Auch im Vergleich zu einigen GM-CSF-basierten Therapien waren die Nebenwirkungen, insbesondere neurologische Symptome und Blutbildveränderungen wie Leukozytose oder Eosinophilie, in der hier vorgelegten Studie weniger ausgeprägt. In der Literatur wurde über schwere kardiovaskuläre, hämatologische oder neurologische Komplikationen, vor allem nach simultaner Applikation [156], berichtet [131;157]. Hingegen trat in Studien mit sequentieller Zytokingabe zumeist keine Toxisität Grad 3-4 auf [113;158], was diesbezüglich einen prinzipiellen Vorteil sequentieller Behandlungsschemata darstellt.

5.2 Klinische Ergebnisse

Wie bei anderen Studien, bei denen GM-CSF als Monotherapie [128;129] oder in Kombination mit anderen Zytokinen sequentiell [113;159] eingesetzt wurde, wurden auch in der vorliegenden Studie keine Vollremissionen beobachtet. Komplette Remissionen wurden zumeist unter einer HD-IL-2-Therapie [40;103;105] oder im Rahmen einer GM-CSF-Therapie mit synchroner Zytokingabe [155-157] beobachtet, so dass diesbezüglich ein Einfluss der Dosierung und des Applikationsschemas möglich ist. Vor dem Hintergrund einer erhöhten Toxisität und den inzwischen publizierten Daten bezüglich des Gesamtüberlebens [104;131;159] ist ein Therapieprotokoll mit synchroner und höher dosierter Zytokingabe jedoch eher kritisch zu sehen, insbesondere da wahrscheinlich nur eine klinisch bisher nicht genau definierte Patientensubgruppe langfristig von dieser Behandlung profitiert.

Inzwischen wird die Zytokintherapie nur noch für Patienten, die einen günstigen Prognosescore aufweisen [39], empfohlen, da bei diesen teilweise lang andauernde komplette Remissionen beobachtet wurden [40] und zudem neuere Studien keinen Vorteil für Patienten der intermediären Prognosegruppe aufwiesen [41]. In der hier vorgelegten Studie waren überwiegend Patienten mit intermediärem Risikoprofil eingeschlossen. Somit war möglicherweise der Anteil der Patienten mit einem günstigen Prognosescore zu gering, um eine hohe Remissionsrate zu erhalten. Bemerkenswert ist jedoch, dass in der hier vorliegenden Arbeit auch bei Patienten, die in der Literatur eine eher ungünstige Prognosegruppe (keine Nephrektomie, Lokalrezidiv, Skelettmetastasen) darstellen [13;14], teilweise lang andauernde Erkrankungsstabilisierungen oder gemischte Remissionen beobachtet wurden. Das progressionsfreie Intervall beider Prognosegruppen war nahezu gleich. Weiterhin war ein für zytokinbasierte Therapien [41;104;143] vergleichsweise langes progressionsfreies Intervall sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für Patienten, die lediglich eine Erkrankungsstabilisierung erreichten, festzustellen. Dies war vergleichbar mit anderen GM-CSF-enthaltenden Therapiestudien [129;158]. Wie bereits von anderen Autoren für die Anwendung der Chemoimmuntherapie [101;146;164] oder GM-CSF [131;159] beschrieben, war auch in der vorliegenden Studie bei einer MR zumeist ein Rückgang der pulmonalen Metastasierung zu verzeichnen.

Im Gegensatz zu den Studien der Arbeitsgruppe um ATZPODIEN [101;142;145], die Ansprechraten weit über 30% und komplette Remissionen bis zu 10% zeigten, war das Therapieansprechen in der hier vorliegenden Studie mit lediglich 21% MR (4/19 Patienten) und 32% SD (6/19) ohne komplette oder partielle Remissionen unerwartet gering. Der Nutzen einer zusätzlichen 5-FU Gabe im Rahmen einer Therapie mit IL-2 und IFN- α wird aber in Bezug auf Ansprechraten und Überleben in der Literatur inzwischen kontrovers diskutiert. NEGRIER ET AL. [148], RAVAUD ET AL. [153] und O'BRIEN ET AL. [149] konnten keinen Vorteil von 5-FU erkennen. Bei nur marginalen Ansprechraten von 1,8% bis 8,2 % wurden ebenfalls teilweise keine kompletten Remissionen beobachtet. Unterschiede in der Patientenauswahl und den Behandlungsschemata erschweren jedoch Vergleiche. Während das mediane Alter und der Allgemeinzustand in der hier vorgelegten Arbeit vergleichbar mit bereits publizierten Studien war, waren jedoch vermehrt Patienten mit Skelett- und Lebermetastasen, Lokalrezidiven oder mehreren Tumormanifestationen eingeschlossen. Zudem wies der überwiegende Anteil der Patienten ein intermediäres Risikoprofil auf. Weiterhin war bei

vergleichbarer IFN- α - und 5-FU-Dosierung die IL-2-Dosis niedriger und 5-FU wurde zu Zyklusbeginn nach der IFN- α -Gabe appliziert, nachdem In-vitro-Daten eine dahingehend bessere Wirkung von 5-FU vermuten ließen [139].

Aber auch nach der Anwendung vergleichbarer Therapieprotokolle konnten die von ATZPODIEN und Mitarbeitern [101;142;145] publizierten Ergebnisse nicht erreicht werden. In Studien von JOFFE ET AL. [150] und VAN HERPEN ET AL. [151] wurden nur Ansprechraten von 17% bzw. 9,8%, jeweils ohne komplette Remissionen erzielt. Auch DUTCHER ET AL. [152] berichteten in einer an 50 Patienten durchgeführten Studie über eine vergleichsweise geringe Ansprechrate von 18% bei nur zwei kompletten und sieben partiellen Remissionen ohne Vorteil für das Gesamtüberleben [152]. Auffallend in der hier vorgelegten Studie war sogar, dass alle sechs Patienten, bei denen eine Pausierung oder Dosisreduktion von 5-FU vorgenommen wurde, eine SD oder MR aufwiesen. Zudem war das progressionsfreie Intervall mit 9,5 Monaten gegenüber den Patienten mit regelhafter 5-FU-Dosierung (4,7 Monate) signifikant verlängert, so dass 5-FU möglicherweise sogar einen inhibitorischen Einfluss hat. Zwar wurden zwei der Patienten, die 5-FU in reduzierter Dosis erhielten, nach Studienende mit IFN- α weiterbehandelt, jedoch wurde bei vier dieser Patienten keine Anschlussbehandlung vorgenommen. Zudem bestand kein Unterschied in der Prognosegruppenzugehörigkeit, so dass auch ein dahingehender Einfluss unwahrscheinlich ist. Vielmehr lagen bei den Patienten, die 5-FU in reduzierter Dosis erhielten, prognostisch ungünstige Skelett- und Weichteilmetastasen sowie Infiltrationen des Pankreas oder der kontralateralen Niere vor.

Ein Einfluss einer Anschlussbehandlung mit IFN- α kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zwar gibt es in der Literatur keine Berichte über eine IFN- α -Weiterbehandlung nach einer remissionsinduzierenden Therapie beim mNZK, jedoch besteht aufgrund der derzeitigen Studienlage ein moderater Vorteil für IFN- α hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls und Gesamtüberlebens [94;95]. Ein langes progressionsfreies Intervall wurde nach einer GM-CSF-enthaltenden Therapie bei NZK-Patienten beschrieben, die im Anschluss IL-2 sc. erhielten [160]. Zudem berichteten RINI ET AL. [129] über einen zeitlich verzögerten Rückgang von Lungenmetastasen nach bereits beendeter GM-CSF-Therapie, so dass in diesem Zusammenhang eine prolongierte Wirkung von GM-CSF möglich wäre, die zusammen mit einer anschließenden dauerhaften IFN- α - oder IL-2-Therapie einen Vorteil hinsichtlich einer Erkrankungsstabilisierung bieten könnte.

Bei einem weiteren Patienten war nach einer palliativen Bestrahlung neben dem Rückgang der Skelett- und Weichteilmetastasen auch ein kompletter Rückgang der Lungenmetastasen festzustellen. Das Ansprechen wurde als MR gewertet und dauerte 42 Monate. Zusätzlich erhielt er Pamidronsäure. Welche Auswirkung die Bestrahlung oder die zusätzliche Gabe von Pamidronsäure hatte, muss allerdings offen bleiben. Das mNzK gilt als strahlenresistent und auch RYAN ET AL. [166] konnten im Rahmen einer GM-CSF-basierten Therapie keinen Vorteil einer zusätzlichen Bestrahlung feststellen. Bei der Bestrahlung symptomatischer Knochenmetastasen steht zumeist die Schmerzlinderung im Vordergrund. In der Literatur existieren jedoch einige experimentelle und klinische Hinweise für eine systemische Auswirkung einer lokalen Bestrahlung auf das Immunsystem mit Steigerung eines immuntherapeutischen Effekts [35;167;168]. Weiterhin wurden für Bisphosphonate neben einer Hemmung der Osteoklasten direkte Antitumoreffekte beschrieben [48]. Für Pamidronsäure, einem Bisphosphonat der dritten Generation, wurde zudem ein Synergismus mit Typ-I-Interferonen beobachtet [49], so dass auch in diesem Kontext eine verbesserte therapeutische Wirkung denkbar wäre.

Insgesamt zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse keine Verbesserung der Remissionsraten beim mNzK weder durch GM-CSF, noch durch 5-FU, so dass in Zusammenschau mit anderen inzwischen publizierten Studien und auch mit Hinblick auf eine Erhöhung der Toxizität eine weitere klinische Prüfung dieses Therapieprotokolls nicht erfolgversprechend scheint. Zur Behandlung von Patienten mit gutem Risikoprofil, aber auch als Kombinationspartner von Substanzen der „*targeted therapy*“ bleiben Zytokine dennoch weiterhin von Interesse. Unter dem Aspekt einer verstärkten antiproliferativen und antiangiogenetischen Wirkung wurde IFN- α zusammen mit Sorafenib eingesetzt, wobei ein Effekt auf die Tumolvaskularisierung [169] sowie 5% komplette Remissionen [170] beobachtet wurden. Studien zur Kombination dieser neuen Substanzen mit IL-2 liegen nicht vor. Aber auch für GM-CSF ergäbe sich als Kombinationspartner der MKI eine neue Möglichkeit bei der Behandlung des mNzK. Da VEGF die Reifung und Funktion dendritischer Zellen mindert [171], wäre nach Blockierung dieses Signalweges durch Kinaseinhibitoren eine verbesserte GM-CSF-vermittelte Antigenpräsentation möglich. Zudem wurden sowohl für die Substanzen der „*targeted therapy*“ [42;43;46], als auch für GM-CSF [129;158] teilweise lang andauernde Progressionsverögerungen beschrieben, so dass auch unter diesem Aspekt Kombinationstherapien denkbar wären.

5.3 Immunologische Ergebnisse

In dem hier geprüften Therapiekonzept sollte durch simultane Effekte auf die Antigenpräsentation und die Immuneffektorzellen eine Verstärkung der immunologischen Antitumoraktivität herbeigeführt werden.

Unerwarteterweise war jedoch ein Rückgang der proliferativen und stimulatorischen Kapazität der PBMC für die Gesamtheit der analysierten Patienten festzustellen. Auch zeigte die Analyse des Blutbildes im Gegensatz zu anderen GM-CSF-basierten Behandlungsprotokollen [129;156;157;159] und den Ergebnissen der vorausgegangenen Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe ohne 5-FU [154] nur eine milde Leukozytose, sowie einen nur geringgradigen Anstieg der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Bei der weiteren Immunphänotypisierung ergab sich, vergleichbar mit anderen GM-CSF- [83;157] oder 5-FU-enthaltenden [172] Zytokintherapien, ein Anstieg der Monozyten, NK-Zellen und T-Lymphozyten (insbesondere der CD4⁺-T-Zellen) bei relativ konstanter B-Zellzahl. Weiterhin war eine Zunahme der Aktivierungsparameter auf T-Zellen sowie der kostimulatorischen Moleküle in der PBMC-Population festzustellen. Dennoch resultierte dies insgesamt und insbesondere bei Patienten mit PD nicht in einer Steigerung, sondern in einem Rückgang der proliferativen und stimulatorischen Kapazität der PBMC. Für eine diesbezügliche Minderung der Effektorzell- und/oder APC-Funktion wäre sowohl 5-FU, als auch die Induktion gegenregulatorischer Mechanismen (T_{reg} und/oder myeloische Suppressorzellen) in Erwägung zu ziehen.

Für IL-2 [81;173] wie auch für GM-CSF [174] wurde die Induktion T_{reg} beschrieben. Nachdem zu Beginn dieser Arbeit T_{reg} noch nicht ausreichend charakterisiert waren und ein Anti-Fox-P3-Antikörper nicht zur Verfügung stand, ist die CD25-Expression auf CD3⁺-T-Zellen unter einer IL-2-basierten Therapie allerdings nur eingeschränkt zu verwenden, da CD25 auch die aktivierten T-Zellen kennzeichnet. Ein Unterschied zwischen Patienten mit PD und Patienten mit MR+SD hinsichtlich der CD25⁺⁺-Expression auf CD3⁺-T-Zellen war nicht signifikant. Hingegen bestand eine Assoziation mit T-Zellen, die die kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86 exprimierten. Diese Beobachtung ist in Kap. 5.4 weiter erörtert.

Trotz des Anstiegs der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen war keine vermehrte NK-Zell- und Nicht-NK-Zell-vermittelte In-vitro-Zytotoxizität festzustellen. Zusammen mit den Daten der Proliferations- und Stimulationsexperimente stehen diese Ergebnisse im

Kontrast zur vorangegangenen Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe [154], bei der kein 5-FU eingesetzt wurde. Somit ist ein inhibitorischer Einfluss durch 5-FU auf die Effektorzell- und/ oder APC-Funktion wahrscheinlich. Eine verminderte NK-Zell-Aktivität nach 5-FU-Gabe wurde bei Untersuchungen zur 5-FU-Applikation im Rahmen der Chemoimmuntherapie bereits beschrieben [6]. Weiterhin zeigten Arbeiten von QUEMENEUR ET AL., dass 5-FU ein potenter Inhibitor der Zellzyklusprogression und Proliferation von T-Zellen ist [175] und zudem einen hemmenden Einfluss auf die Effektorzellfunktionen sowie die Differenzierung von CD8⁺-T-Zellen besitzt [176]. Bezüglich einer 5-FU-bedingten Beeinträchtigung der APC-Funktion gibt es in der Literatur keine Hinweise, hingegen wurde für GM-CSF die Induktion suppressorisch wirksamer DC beschrieben [177-179]. Nachdem zudem die Patienten, bei denen eine 5-FU-Dosisreduktion vorgenommen wurde, tendentiell ein besseres klinisches Ergebnis sowie eine Zunahme der proliferativen und stimulatorischen Kapazität aufwiesen, scheint die Zugabe von 5-FU im Rahmen einer niedrigdosierten, GM-CSF-enthaltenden Zytokintherapie einen inhibitorischen Effekt auf die immunologische Antitumoraktivität zu haben.

Zusammenfassend betrachtet bieten, zusätzlich zu den nicht zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen, die hier vorliegenden immunologischen Daten keine Grundlage zur Prüfung eines Therapiekonzeptes von 5-FU im Rahmen einer niedrigdosierten GM-CSF-basierten Zytokintherapie beim mNZK.

5.4 Koexpression von CD80 bzw. CD86 auf T-Zellen

In der hier vorgelegten Studie wird erstmalig ein Anstieg von CD80 bzw. CD86 koexprimierenden T-Zellen unter einer Chemoimmuntherapie beschrieben. Dies stellt eine Besonderheit dieser Arbeit und einen neuen Aspekt der Zytokintherapie dar.

Die Expression von CD80 und CD86 auf T-Zellen ist ein interessantes, aber im Detail bisher nicht verstandenes Phänomen, da T-Zellen keine APC im klassischen Sinne sind. In vitro waren CD80 und CD86 nach repetitiver Stimulation mit IL-2 sowohl auf T-Zelllinien und T-Zellklonen, aber auch auf T-Lymphozyten des peripheren Blutes vermehrt messbar [61-63;180-182]. Nachdem in der vorliegenden Studie im Therapieverlauf ein Anstieg von CD80⁺-T-Zellen und CD86⁺-T-Zellen zu verzeichnen war, legt dies nahe, dass auch in vivo durch eine IL-2-enthaltende Therapie die

Expression von CD80 und CD86 auf T-Zellen induziert werden kann. Bisher wurden CD80⁺-T-Zellen und CD86⁺-T-Zellen vermehrt bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), der Wegenerschen Granulomatose und einer Immunthyreoiditis nachgewiesen [181;183;184]. Über das Vorkommen dieser T-Zellsubpopulationen bei malignen Erkrankungen ist in der Literatur wenig bekannt. CD86 wurde auf T-Zellen, die aus malignem Aszites isoliert wurden [183], CD80 auf tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten beim NZK nachgewiesen [185]. Die Expression von CD80 bzw. CD86 auf T-Zellen im peripheren Blut von NZK-Patienten ist somit ein weiterer Nachweis bei einer malignen Erkrankung und dem NZK. Während die prätherapeutischen Werte noch weitgehend in den publizierten Bereichen gesunder Probanden lagen [181;184], war im Therapieverlauf ein Anstieg auf Werte, die für Patienten mit Autoimmunerkrankungen [181;183;184] ermittelt wurden, festzustellen. Diese Beobachtung stellt einen neuen Aspekt einer zytokinbasierten Behandlung, insbesondere bei einer Tumortherapie dar.

Die Rolle und Funktion der CD80 bzw. CD86 koexprimierenden T-Zellen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Nachdem in älteren Publikationen eine Zunahme der proliferativen und stimulatorischen Kapazität festgestellt wurde und CD80⁺-T-Zellen sowie CD86⁺-T-Zellen vermehrt bei Autoimmunerkrankungen nachgewiesen wurden, wurde ein anergievermeidender Effekt angenommen [61;63;182]. Basierend auf Transplantationsexperimenten in Mäusen wurde ihnen in letzter Zeit aber auch eine regulierende Rolle als Inhibitor einer T-Zell-Antwort im Rahmen einer Autoimmun- oder Transplantationsreaktion zugeschrieben [186-188]. CD80 und CD86 wurden mit zunehmendem Aktivierungsgrad der APC, auch antigenunabhängig auf T-Zellen induziert [180;183]. In der gemischten Lymphozytenkultur wurde eine mit zunehmendem Aktivierungsgrad der Zielzellen abnehmende stimulatorische Funktion beschrieben [183]. Diese Beobachtungen weisen auf eine suppressorische Funktion mit möglicher Limitierung einer Immunreaktion hin. Der genaue Mechanismus dieser Effekte ist bisher nicht geklärt. Kontrovers diskutiert wird eine Interaktion mit dem suppressorischen Oberflächenmolekül CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) bzw. über T_{reg} [183;186;189].

Die Beobachtungen der hier vorgelegten Studie legen auch einen inhibitorischen Einfluss der CD80⁺ und CD86⁺-T-Zellen, die möglicherweise durch das veränderte Zytokinmilieu der Chemoimmuntherapie induziert wurde, nahe. Insbesondere Patienten mit PD wiesen bei erhöhten Aktivierungsparametern auf T-Zellen einen vermehrten

CD80⁺-T-Zell- und CD86⁺-T-Zell-Anteil sowie eine rückläufige proliferative und stimulatorische Kapazität auf. Dagegen konnte für Patienten, die im Krankheitsverlauf nicht progredient waren, nach dem zweiten Zyklus eine Zunahme der proliferativen und stimulatorischen Kapazität festgestellt werden. Bei ansteigenden Aktivierungsparametern wiesen sie einen nicht signifikant erhöhten CD80⁺-T-Zell- und CD86⁺-T-Zell-Anteil auf. Im Gegensatz zu den Experimenten anderer Arbeitsgruppen mit aufgereinigten und langzeitkultivierten CD80⁺-T-Zellen bzw. CD86⁺-T-Zellen, die eine zunehmende stimulatorische Kapazität gegenüber unstimulierten allogenen T-Zellen zeigten [61;63;182;183], korrelierte in der vorliegenden Studie die vermehrte Expression von CD80 und CD86 auf T-Zellen mit einer Abnahme der proliferativen und stimulatorischen Kapazität. Da allerdings PBMC als Stimulatoren eingesetzt wurden, wäre eine Minderung der stimulatorischen Kapazität über eine Interaktion mit suppressorischen Zellen denkbar.

Letztendlich kann die Frage, ob die Verschlechterung der proliferativen und stimulatorischen Kapazität sowie eine erhöhte CD80- bzw. CD86-Expression auf T-Zellen lediglich ein Surrogatmarker für Progredienz ist oder ob ein kausaler Zusammenhang zwischen einer fehlenden Immunantwort und Krankheitsprogredienz besteht, im Rahmen dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Zudem erfolgten bisher kaum weitere phänotypische und immunfunktionelle Charakterisierungen dieser T-Zellpopulation. Die Koexpression von CD80- bzw. CD86-Rezeptoren wurde sowohl für CD4⁺-T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen beschrieben [181]. Es wäre daher denkbar, dass unterschiedliche Subpopulationen mit divergierenden Funktionen bei malignen Erkrankungen sowie unter einer zytokinbasierten Therapie induziert werden. Diesbezüglich wären weiterführende phänotypische und funktionelle Untersuchungen der CD80⁺-T-Zellen bzw. CD86⁺-T-Zellen, insbesondere unter dem Aspekt eines prädiktiven Faktors für das Ansprechen einer Zytokintherapie, von Interesse.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der hier vorgelegten Phase-I/II-Studie konnte gezeigt werden, dass die ambulante Durchführung eines Therapieprotokolls mit der niedrigdosierten sequentiellen Applikation von IFN- α , IL-2, GM-CSF und 5-FU bei moderater Verträglichkeit möglich ist. Die klinischen Ergebnisse blieben bezüglich der Remissionsraten jedoch deutlich

hinter den Erwartungen zurück. Nachdem GM-CSF als Monotherapie beim mNZK kaum wirksam war, konnte es auch in der hier geprüften Kombination mit IL-2, IFN- α und 5-FU die Ansprechraten von IL-2 und IFN- α im Vergleich zu den publizierten Daten nicht verbessern. Die klinischen und immunologischen Daten dieser Arbeit rechtfertigen in Zusammenschau mit den inzwischen veröffentlichten Studienergebnissen anderer Zytokin- und GM-CSF-basierter Therapieprotokolle auch unter dem Aspekt einer weiteren Toxizitätssteigerung keine weitere Prüfung dieses Therapieprotokolls zur Behandlung des mNZK im Rahmen einer Phase-III-Studie.

Immunologisch interessant war jedoch eine Korrelation der proliferativen und stimulatorischen Kapazität von PBMC mit dem klinischen Ansprechen. Insbesondere Patienten mit PD wiesen – im Gegensatz zu Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD) – trotz ansteigender Aktivierungsparameter auf T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur eine rückläufige proliferative und stimulatorische Kapazität auf. Progression korrelierte hierbei insbesondere mit einem Anstieg von T-Zellen, die die kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86 koexprimierten. Dieser erstmalige Nachweis und Anstieg von CD80⁺-T-Zellen und CD86⁺-T-Zellen unter einer zytokinbasierten Therapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom stellt eine Besonderheit dieser Arbeit und einen neuen Aspekt der Immuntherapie dar. Nachdem die Rolle und Funktion dieser CD80 bzw. CD86 exprimierenden T-Zellen nicht genau geklärt ist, sind in diesem Zusammenhang phänotypische und funktionelle Charakterisierungen von Interesse. Zudem kann in weiterführenden Studien untersucht werden, ob die Expression von CD80 und CD86 auf entsprechenden T-Zellpopulationen ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen zytokinbasierter Therapien ist.

In letzter Zeit haben sich mit der Einführung von Substanzen mit gezieltem molekularem Angriff (sog. „*targeted therapy*“) neue Wege in der Behandlung des mNZK eröffnet. Zytokine bieten aber dennoch, insbesondere bei Patienten mit einem günstigen Risikoprofil, die Option langandauernder kompletter Remissionen. Dahingehend und auch im Hinblick auf mögliche synergistische Effekte stellen diese Therapieformen keine konkurrierenden Behandlungsansätze dar. Da der palliative Charakter der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms bestehen bleiben wird, werden Zytokine zum einen für Patienten mit günstigem Risikoprofil, zum anderen im Rahmen von kombinierten Therapiemodalitäten mit Substanzen der „*targeted therapy*“ oder als Erhaltungstherapie zu prüfen sein.

6 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die niedrigdosierte, sequentielle Applikation von GM-CSF in Kombination mit den Zytokinen IL-2 und IFN- α sowie dem Zytostatikum 5-FU zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms hinsichtlich der Verträglichkeit, ambulanten Durchführbarkeit und der klinischen sowie immunologischen Effekte geprüft. Durch die Kombination von GM-CSF mit den T-Zell- und NK-Zell-aktiven Zytokinen IL-2 und IFN- α sollte eine simultane Steigerung der Antigenpräsentation und zellulären Immunantwort herbeigeführt werden. Zusätzlich wurde aufgrund der bei Initiierung der Studie bestehenden Datenlage und der weiten Verbreitung der kombinierten Chemoimmuntherapie das Zytostatikum 5-FU in das Behandlungsprotokoll integriert.

Im Rahmen einer offenen einarmigen Phase-I/II-Studie wurden 20 nicht immun- oder chemotherapeutisch vorbehandelte Patienten mit gesichertem metastasierten Nierenzellkarzinom, die sich größtenteils einer Nephrektomie unterzogen hatten, mit vier Zyklen eines sequentiellen Schemas, bestehend aus 5-FU und IFN- α in Woche 1 und 2, gefolgt von einer Kombination von GM-CSF und IL-2 in Woche 3 und 4, behandelt. Die Therapie wurde insgesamt moderat toleriert und konnte weitgehend ambulant durchgeführt werden. Ein nebenwirkungsbedingter Therapieabbruch war bei zwei Patienten (10%), eine Dosismodifikation bei acht Patienten (40%) notwendig. Diese waren zumeist auf die Gabe von 5-FU (6 Patienten; 30%) zurückzuführen. Komplette (CR) oder partielle Remissionen (PR) wurden nicht beobachtet, so dass mit 21% (4/19 Patienten) gemischten Remissionen (MR) und 32% (6/19 Patienten) Erkrankungsstabilisierungen (SD) das klinische Ansprechen hinter den Erwartungen zurückblieb. Auffallend war, dass diejenigen Patienten, bei denen eine Dosismodifikation von 5-FU vorgenommen wurde, ein besseres klinisches Ansprechen und verlängertes progressionsfreies Intervall aufwiesen.

Bei den durchgeführten immunologischen Untersuchungen war durchflusszytometrisch ein Anstieg von Monozyten, NK-Zellen sowie (aktivierten) CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten zu verzeichnen. Trotz Erhöhung der CD8⁺-T- und NK-Zellen unter der Therapie war insgesamt keine vermehrte NK-Zell- und Nicht-NK-Zell-abhängige In-vitro-Zytotoxizität der PBMC festzustellen. Es fand sich jedoch eine Korrelation des klinischen Ansprechens mit der proliferativen und stimulatorischen

Kapazität der PBMC. In der gemischten Lymphozytenkultur (MLR) war bei Patienten mit PD – im Gegensatz zu Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD) – trotz ansteigender Aktivierungsparameter auf T-Zellen ein Rückgang der proliferativen und stimulatorischen Kapazität festzustellen. Möglicherweise war diese Inhibition 5-FU-bedingt. Interessanterweise war eine Erkrankungsprogression zudem mit einem Anstieg von T-Zellen, die die kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86 koexprimierten, assoziiert. Dieser Befund wird hier erstmals nach Anwendung einer zytokinbasierten Therapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom beschrieben und stellt eine Besonderheit dieser Arbeit sowie einen neuen Aspekt der Immuntherapie dar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die klinischen und immunologischen Ergebnisse die Prüfung dieses Therapieprotokolls beim metastasierten Nierenzellkarzinom im Rahmen einer Phase-III-Studie nicht rechtfertigen, da die Ansprechraten im Vergleich zu den bisher publizierten Daten der Einzelsubstanzen und Kombinationstherapien nicht verbessert werden konnten. Hingegen wären weiterführende Studien zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der CD80 und CD86 exprimierenden T-Zellen auch hinsichtlich einer möglichen prädiktiven Funktion für das Ansprechen zytokinbasierter Therapien von Interesse.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1a: Gegenüberstellung der TNM-Klassifikation und der Einteilung nach HOLLAND und ROBSON.	9
Tab. 1b: 5-Jahres-Überlebensraten (%) und TNM-Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms.	9
Tab. 2: Algorithmus zur Behandlung des metastasierten, vorwiegend klarezzeligen Nierenzellkarzinoms nach den Empfehlungen der NCCN (Kategorien 1-3).	15
Tab. 3: Übersicht über Ergebnisse ausgewählter Studien zum Einsatz zytokinbasierter Therapien beim metastasierten Nierenzellkarzinom.	30
Tab. 4: Zusammenfassung der Patientencharakteristika und des Therapieansprechens.	53
Tab. 5: Auflistung der einzelnen Patientencharakteristika und des klinischen Ansprechens.	54
Tab. 6: Häufigkeit und Ausprägungsgrad der Nebenwirkungen nach CTC.	56
Tab. 7: Therapieansprechen entsprechend der Prognosegruppen nach JONES ET AL. und PALMER ET AL..	61

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des 5-FU-Metabolismus, der Effekte der 5-FU-Stoffwechselprodukte und des Synergismus mit IFN- α .	29
Abb. 2: Darstellung möglicher synergistischer Effekte einer Immuntherapie mit GM-CSF, IL-2, IFN- α und 5-FU.	34

Abb. 3: Darstellung eines Behandlungszyklus’.	37
Abb. 4: Schematische Darstellung des Evaluationsschemas.	40
Abb. 5: Schematische Darstellung der immunologischen Untersuchungen.	43
Abb. 6: Darstellung der Häufigkeit unerwünschter Wirkungen.	56
Abb. 7: Schematische Darstellung des Therapieansprechens.	59
Abb. 8: Darstellung des progressionsfreien Intervalls für die Gesamtheit der Patienten sowie für Patienten der guten und intermediären Prognosegruppe nach JONES ET AL. und PALMER ET AL..	60
Abb. 9: Veränderung der Gesamtleukozytenzahlen sowie der eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (in Zellen/ μ l) im Therapieverlauf.	63
Abb. 10: Veränderungen der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker in der PBMC-Population im Therapieverlauf.	64
Abb. 11: Veränderung der zytolytischen Aktivität der Patienten-PBMC unter der Therapie gegenüber der Nierenzellkarzinom-Zelllinie SLO, der NK-Zell-sensitiven Zelllinie K562 und der NK-Zell-resistenten Zelllinie Raji.	67
Abb. 12: Veränderung der proliferativen und stimulatorischen Kapazität für die Gesamtheit der Patienten und aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen.	69
Abb. 13a: Veränderung der proliferativen Kapazität bei Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD).	70
Abb. 13b: Veränderung der proliferativen Kapazität bei Patienten mit Erkrankungsprogression (PD).	70
Abb. 14a: Veränderung der stimulatorischen Kapazität bei Patienten ohne Erkrankungsprogression (MR+SD).	71

Abb. 14b: Veränderung der stimulatorischen Kapazität bei Patienten mit Erkrankungsprogression (PD).	71
Abb. 15a: Veränderung der CD80- bzw. CD86-Expression auf T-Zellen im Therapieverlauf, dargestellt für die Gesamtheit der analysierten Patienten.	73
Abb. 15b: Veränderung der CD80- bzw. CD86-Expression auf T-Zellen, aufgegliedert nach dem therapeutischen Ansprechen.	74

8 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
13-CRA	13-cis-retinoic acid (engl.); 13- <i>cis</i> -Retinsäure
Abk.	Abkürzung
ADH	Antidiuretisches Hormon (Adiuretin, Vasopressin)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	AKT-Genprodukt, entspricht der Proteinkinase B
APC	Antigen presenting cells (engl.); antigen-präsentierende Zellen
ASCO	American Society of Clinical Oncology, Amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie
ASSURE	Phase-III- Studie der ECOG : “Adjuvant Sorafenib or Sunitinib in Unfavorable Renal Cell Carcinoma” (ECOG 2805)
ATP	Adenosintriphosphat
AVOREN	Avastin® for Renal Cell Cancer
AZ	Allgemeinzustand
bzgl.	Bezüglich
CBC	Cullin-2-Elongin-B/C-Komplex
CD	Cluster of differentiation (engl.); Differenzierungsantigene an der Zelloberfläche
CI	Confidence intervall (engl.); Konfidenzintervall
CML	Chronisch myeloische Leukämie
cpm	Counts per minute (engl.); gemessener radioaktiver Zerfall pro Minute
CR	Complete Response/ Remission (engl.); Vollremission
CRECY-Studie	Cancer Renal Cytokine Studie
CRP	C-reaktives Protein
Cs-137	Cäsium-137
CT	Computer Tomographie
CTC	Common Toxicity Criteria; allgemeine Toxizitätskriterien des National Cancer Institutes Version 2.0 vom 30.01.1998
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (engl.); zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4 (engl.)

DC	Dendritic cells (engl.); dendritische Zellen
DGCIN	Deutsche Gruppe zur Chemoimmuntherapie des Nierenkarzinoms
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.); Desoxribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
dTMP	Desoxythymidin-Monophosphat
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
EORTC	European Organisation of Research and Treatment of Cancer
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorter (engl.); Durchflusszytometer
FdUMP	Fluorodeoxyuridin-Monophosphat
FdUTP	Fluorodeoxyuridin-Triphosphat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOX-P3	Transcription Factor Forkhead box P3
FSC	Forward angle light scatter (engl.); Vorwärtsstreulicht
FUDR	Fluorodesoxyuridin
FUTP	Fluorouridin-Triphosphat
<i>g</i>	Gravitation (engl.); Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (engl.); Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (= AST; Aspartat-Aminotransferase)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (= ALT; Alanin-Aminotransferase)
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin

HD	Hochdosis, hochdosiert
HIF-1 α /1 β	Hypoxieinduzierbarer Faktor 1 α / 1 β
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems; Internationale Klassifikation von Krankheiten der Weltgesundheitsorganisation (WHO)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-2-R	Interleukin-2 Rezeptor
im.	Intramuskulär
IMDM	Iscoves modifiziertem Dulbeccos Medium
IU	International Units (engl.); internationale Einheiten
iv.	Intravenös
JAM-Test	„ <i>Just Another Method</i> “ (engl.); Zytotoxizitäts-Test
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KÜ	Kumulatives Überleben
KI	Kinaseinhibitor
KÖF	Körperoberfläche
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzelle
LC	Langerhans cells (engl.); Langerhans-Zelle
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
m, m ²	Meter, Quadratmeter
M	Metastase
mAb	Monoclonal Antibody (engl.); monoklonaler Antikörper
MDR	Multi Drug Resistance (engl.); chemotherapeutische Multiresistenz
mediast.	mediastinal
MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.); Haupthistokompatibilitätskomplex
MKI	Multikinaseinhibitoren
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction (engl.); gemischte Lymphozytenkultur
mNZK	metastasiertes Nierenzellkarzinom

MPA	Medroxyprogesteronazetat
MR	Mixed Response/ Remission (engl.); gemischtes Ansprechen
MRC	Medical Research Council
MRCRCC	Medical Research Council Renal Cancer Collaborators
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NCI	National Cancer Institute
nd-IL-2	niedrigdosiertes IL-2
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NZK	Nierenzellkarzinom
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NSAR	Nicht steroidales Antirheumatikum
NYHA	New York Heart Association
o.g.	oben genannt
OP	Operation
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (engl.); mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline (engl.); Phosphatpuffer
PD	Progressive Disease (engl.); Erkrankungsprogression
PDGF	Platelet derived Growth Faktor (engl.)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PERCY	Programme Etude Rein Cytokines
PFI	Progressionsfreies Intervall
PHA	Phytohämagglutinin
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
p.o.	Per os; oral
PR	Partial Response/ Remission (engl.); Teilremission
prätherap.	Prätherapeutisch, vor der Therapie
PT	Primärtumor
pVHL	VHL-Protein
rh-GM-CSF	rekombinantes humanes GM-CSF
R	Radiatio, Bestrahlung
RKI	Robert Koch Institut

RNA	Ribonucleic acid (engl.); Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sc.	subcutan
sc-IL-2	subcutan appliziertes IL-2
SD	Stable Disease (engl.); Erkrankungsstabilisierung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
sog.	sogenannt
SORCE	Phase-III-Studie: "Sorafenib in Patients with Resected Renal Cell Carcinoma"
SSC	Side angle light scatter (engl.); Seitwärtsstreulicht
STAR	Phase-III-Studie : "Sunitinib Trial in Advanced Renal Cancer"
SWOG	Southwest Oncology Group
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TARGET	Phase-II-Studie: "Treatment Approaches in Renal Cell Cancer Global Evaluation"
TGF- α	Transforming Growth Factor α (engl.)
tgl.	täglich
T _H 1	T-Helfer-Zelle Typ1
T _H 2	T-Helfer-Zelle Typ2
T _H 17	IL-17 produzierende T-Helfer-Zelle
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
T-TIL	Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen Stadieneinteilung maligner Tumore, die in den Jahren 1943-1952 von P. Denoix entwickelt wurde und seit 1950 von der UICC angewandt wird. T beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors, N den Lymphknotenbefall und M das Vorhandensein von Metastasen.
Tox	Toxizität
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TS	Thymidilat-Synthetase
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TP	Thymidinphosphorylase

u. a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
UKG	Ultraschallgestützte Kardiographie; Echokardiographie
USA	United States of Amerika; Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
VBL	Vinblastin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
VHL	von-Hippel-Lindau
vs.	versus
Z	Zyklus
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

1. Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S et al. Niere und ableitende Harnwege. In: Robert-Koch-Institut (RKI), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister (GEKID), Hrsg.. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin: 2008; 78-81.
2. Martel CL, Lara PN. Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2003; 45: 177-90.
3. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2005; 353: 2477-90.
4. Bleumer I, Oosterwijk E, De Mulder P, Mulders PF. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur.Urol.* 2003; 44: 65-75.
5. Figlin RA. Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J.Urol.* 1999; 161: 381-6.
6. Rohrmann K, Staehler M, Haseke N, Bachmann A, Stief CG, Siebels M. Immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *World J.Urol.* 2005; 23: 196-201.
7. Oberneder R, Wagner H, Siebels M, Stieber P, Busch M, Weiss M. Nierenzellkarzinom. In: *Manual Urogenitale Tumoren.* Tumorzentrum München, 2003; 79-97.
8. Holland JM. Natural history and staging of renal cell carcinoma. *CA Cancer J Clin* 1975; 25: 121-33.
9. Fischer C, Oberneder R. Nierenzellkarzinom. In: *Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft.* 2007; 251-8.
10. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol.Clin North Am.* 2003; 30: 467-80.
11. Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J.Urol.* 2005; 173: 1853-62.
12. Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors, 6th ed.* UICC International Union Against Cancer. New York: Wiley-Liss, 2003.
13. Royston P, Sauerbrei W, Ritchie A. Is treatment with interferon-alpha effective in all patients with metastatic renal carcinoma? A new approach to the investigation of interactions. *Br.J Cancer* 2004; 90: 794-9.

14. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 1999; 17: 2530-40.
15. Jones M, Philip T, Palmer P et al. The impact of interleukin-2 on survival in renal cancer: a multivariate analysis. *Cancer Biother.* 1993; 8: 275-88.
16. Palmer PA, Vinke J, Philip T et al. Prognostic factors for survival in patients with advanced renal cell carcinoma treated with recombinant interleukin-2. *Ann.Oncol.* 1992; 3: 475-80.
17. Störkel S, Eble JN, Adlakha K et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80: 987-9.
18. Thoenes W, Störkel S. Pathologie der benignen und malignen Nierenzelltumoren. *Urologe A* 1991; 30: W41-W50.
19. Latif F, Tory K, Gnarra J et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260: 1317-20.
20. Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER. Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum.Mol.Genet.* 1996; 5: 639-44.
21. Gnarra JR, Tory K, Weng Y et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat.Genet.* 1994; 7: 85-90.
22. Foster K, Prowse A, van den BA et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum.Mol.Genet.* 1994; 3: 2169-73.
23. Eto M, Naito S. Molecular targeting therapy for renal cell carcinoma. *Int.J.Clin.Oncol.* 2006; 11: 209-13.
24. Schöffski P, Dumez H, Clement P et al. Emerging role of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of advanced renal cell cancer: a review. *Ann.Oncol.* 2006; 17: 1185-96.
25. Shah RN, Ahmad T, Eisen TG. Treatment of recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 2004; 4: 1069-80.
26. Sulzbacher I, Birner P, Traxler M, Marberger M, Haitel A. Expression of platelet-derived growth factor-alpha alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Am.J.Clin.Pathol.* 2003; 120: 107-12.
27. van Spronsen DJ, Mulders PF, De Mulder PH. Novel treatments for metastatic renal cell carcinoma. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2005; 55: 177-91.

28. Mickisch GH, Garin A, Van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 966-70.
29. Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N.Engl.J.Med.* 2001; 345: 1655-9.
30. Mickisch GH, Mattes RH. Combination of surgery and immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *World J.Urol.* 2005; 23: 191-5.
31. Escudier B. Advanced renal cell carcinoma: current and emerging management strategies. *Drugs* 2007; 67: 1257-64.
32. Lau WKO, Blute ML, Weaver AL, Torres VE, Zincke H. Matched comparison of radical nephrectomy vs nephron-sparing surgery in patients with unilateral renal cell carcinoma. *Mayo Clin Proc.* 2000; 75: 1236-42.
33. Permpongkosol S, Bagga HS, Romero FR, Sroka M, Jarrett TW, Kavoussi LR. Laparoscopic versus open partial nephrectomy for the treatment of pathological T1N0M0 renal cell carcinoma: a 5-year survival rate. *J.Urol.* 2006; 176: 1984-8.
34. Permpongkosol S, Chan DY, Link RE et al. Long-term survival analysis after laparoscopic radical nephrectomy. *J.Urol.* 2005; 174: 1222-5.
35. Wersall PJ, Blomgren H, Lax I et al. Extracranial stereotactic radiotherapy for primary and metastatic renal cell carcinoma. *Radiother.Oncol* 2005; 77: 88-95.
36. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J.Urol.* 2000; 163: 408-17.
37. Amato RJ. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 177-86.
38. Huland E, Heinzer H, Timm S, Alamian M, Huland H. Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms in Deutschland. Eine Standortbestimmung. [Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma in Germany. An assessment of the current status]. *Urologe A* 2002; 41: 282-7.
39. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). www.nccn.org/professionals/physicians_gls/f_guidelines/PDF/kidney.pdf . zuletzt aufgerufen am 02. September 2008.
40. Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J.Sci.Am.* 2000; 6 Suppl 1: S55-S57.
41. Negrier S, Perol D, Ravaud A et al. Medroxyprogesterone, interferon alfa-2a, interleukin 2, or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis : results of a randomized controlled trial. *Cancer* 2007; 110: 2448-57.

42. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2007; 356: 115-24.
43. Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2007; 356: 2271-81.
44. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; 370: 2103-11.
45. Melichar B, Koralewski P, Ravaud A et al. First-line bevacizumab combined with reduced dose interferon- α 2a is active in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann.Oncol* 2008.
46. Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 2007; 356: 125-34.
47. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al. RAD0001 vs placebo in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) after progression on VEGFr-TKI therapy: Results from a randomized, double-blind, multicenter Phase-III study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008; 20: Abstr. LBA5026.
48. Green JR. Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 2003; 97: 840-7.
49. Yuasa T, Nogawa M, Kimura S et al. A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), augments the interferon alpha/beta-mediated inhibition of renal cell cancer cell growth both in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.* 2005; 11: 853-9.
50. Deeks ED, Keating GM. Sunitinib. *Drugs* 2006; 66: 2255-66.
51. McKeage K, Wagstaff AJ. Sorafenib: in advanced renal cancer. *Drugs* 2007; 67: 475-83.
52. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24: 16-24.
53. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24: 2505-12.
54. Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24: 5601-8.
55. Young RC. Metastatic renal-cell carcinoma: what causes occasional dramatic regressions? *N.Engl.J.Med.* 1998; 338: 1305-6.

56. Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Mancini M, Rosenberg SA. Specific release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- α , and IFN- γ by human tumor-infiltrating lymphocytes after autologous tumor stimulation. *J Immunol.* 1991; 146: 3674-81.
57. Hoffman DM, Gitlitz BJ, Belldegrun A, Figlin RA. Adoptive cellular therapy. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 221-33.
58. Finke JH, Rayman P, Alexander J et al. Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1990; 50: 2363-70.
59. Margolin KA. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 194-203.
60. Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin.Oncol.* 2002; 29: 5-11.
61. Wyss-Coray T, Mauri-Hellweg D, Baumann K, Bettens F, Grunow R, Pichler WJ. The B7 adhesion molecule is expressed on activated human T cells: functional involvement in T-T cell interactions. *Eur.J.Immunol.* 1993; 23: 2175-80.
62. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 1993; 177: 845-50.
63. Jeannin P, Herbault N, Delneste Y et al. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J.Immunol.* 1999; 162: 2044-8.
64. Gajewski TF, Meng Y, Blank C et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol.Rev.* 2006; 213: 131-45.
65. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol.Rev.* 2006; 211: 81-92.
66. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* 2004; 4: 11-22.
67. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 2007; 19: 281-6.
68. Schoof DD, Terashima Y, Peoples GE et al. CD4+ T cell clones isolated from human renal cell carcinoma possess the functional characteristics of Th2 helper cells. *Cell Immunol.* 1993; 150: 114-23.
69. Cozar JM, Canton J, Tallada M et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol.Immunother.* 2005; 54: 858-66.
70. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat.Rev.Immunol.* 2002; 2: 389-400.

71. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat.Rev.Cancer* 2005; 5: 263-74.
72. Kondo T, Nakazawa H, Ito F et al. Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response. *Cancer Sci.* 2006; 97: 780-6.
73. Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol.Rev.* 2002; 188: 9-21.
74. Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F et al. Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2006; 68: 303-10.
75. Schwaab T, Schned AR, Heaney JA et al. In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J.Urol.* 1999; 162: 567-73.
76. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 1998; 4: 585-93.
77. Radmayr C, Bock G, Hobisch A, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. Dendritic antigen-presenting cells from the peripheral blood of renal-cell-carcinoma patients. *Int.J.Cancer* 1995; 63: 627-32.
78. Song EY, Shurin MR, Tourkova IL, Chatta G, Shurin GV. Human renal cell carcinoma inhibits dendritic cell maturation and functions. *Urologe A* 2004; 43 Suppl 3: 128-30.
79. Crocenzi TS, Tretter CP, Schwaab T et al. Impaired cytolytic activity in peripheral blood T cells from renal cell carcinoma patients. *Clin.Immunol.* 2005; 117: 6-11.
80. Onishi T, Ohishi Y, Goto H, Tomita M, Abe K. An assessment of the immunological status of patients with renal cell carcinoma based on the relative abundance of T-helper 1- and -2 cytokine-producing CD4+ cells in peripheral blood. *BJU.Int.* 2001; 87: 755-9.
81. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S et al. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24: 1169-77.
82. Koo AS, Tso CL, Shimabukuro T, Peyret C, deKernion JB, Belldegrun A. Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma. *J Immunother.* 1991; 10: 347-54.
83. Verra N, de Jong D, Bex A et al. Infiltration of activated dendritic cells and T cells in renal cell carcinoma following combined cytokine immunotherapy. *Eur.Urol.* 2005; 48: 527-33.
84. Fossa SD. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 187-93.

85. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity*. 2001; 14: 661-4.
86. Luft T, Pang KC, Thomas E et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J.Immunol*. 1998; 161: 1947-53.
87. Dauer M, Schad K, Junkmann J et al. IFN-alpha promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4. *J Leukoc.Biol*. 2006; 80: 278-86.
88. Le Bon A, Durand V, Kamphuis E et al. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol*. 2006; 176: 4682-9.
89. deKernion JB, Sarna G, Figlin R, Lindner A, Smith RB. The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J.Urol*. 1983; 130: 1063-6.
90. Quesada JR, Swanson DA, Gutterman JU. Phase II study of interferon alpha in metastatic renal-cell carcinoma: a progress report. *J.Clin.Oncol*. 1985; 3: 1086-92.
91. Gleave ME, Elhilali M, Fradet Y et al. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. Canadian Urologic Oncology Group. *N.Engl.J.Med*. 1998; 338: 1265-71.
92. Bukowski RM. Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin.Oncol*. 2000; 27: 204-12.
93. Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane.Database.Syst.Rev*. 2005; CD001425.
94. MRCRCC. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. *Lancet* 1999; 353: 14-7.
95. Pyrhönen S, Salminen E, Ruutu M et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J.Clin.Oncol*. 1999; 17: 2859-67.
96. Figlin RA, Itri LM. Anti-interferon antibodies: a perspective. *Semin.Hematol*. 1988; 25: 9-15.
97. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin.Oncol*. 2002; 29: 18-26.
98. Bukowski RM, Tendler C, Cutler D, Rose E, Laughlin MM, Statkevich P. Treating cancer with PEG Intron: pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation. *Cancer* 2002; 95: 389-96.
99. Antony PA, Restifo NP. CD4+CD25+ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother.(1997.)* 2005; 28: 120-8.

100. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N.Engl.J.Med.* 1985; 313: 1485-92.
101. Lopez HE, Kirchner H, Atzpodien J. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J.Urol.* 1996; 155: 19-25.
102. Sleijfer DT, Janssen RA, Buter J, de Vries EG, Willemsse PH, Mulder NH. Phase II study of subcutaneous interleukin-2 in unselected patients with advanced renal cell cancer on an outpatient basis. *J.Clin.Oncol.* 1992; 10: 1119-23.
103. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J.Clin.Oncol.* 2003; 21: 3127-32.
104. McDermott DF, Regan MM, Clark JI et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 133-41.
105. Negrier S, Maral J, Drevon M, Vinke J, Escudier B, Philip T. Long-term follow-up of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with intravenous recombinant interleukin-2 in Europe. *Cancer J.Sci.Am.* 2000; 6 Suppl 1: S93-S98.
106. Negrier S, Escudier B, Lasset C et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N.Engl.J.Med.* 1998; 338: 1272-8.
107. Middleton M, Sarno M, Agarwala SS et al. Pharmacokinetics of histamine dihydrochloride in healthy volunteers and cancer patients: implications for combined immunotherapy with interleukin-2. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42: 774-81.
108. Atkins MB. Interleukin-2: clinical applications. *Semin.Oncol.* 2002; 29: 12-7.
109. Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92: 4491-508.
110. Inaba K, Inaba M, Romani N et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 1992; 176: 1693-702.
111. Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J.Immunol.* 1988; 141: 3882-8.
112. Hornell TM, Beresford GW, Bushey A, Boss JM, Mellins ED. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 2003; 171: 2374-83.

113. Correale P, Campoccia G, Tsang KY et al. Recruitment of dendritic cells and enhanced antigen-specific immune reactivity in cancer patients treated with hr-GM-CSF (Molgramostim) and hr-IL-2. results from a phase Ib clinical trial. *Eur.J.Cancer* 2001; 37: 892-902.
114. Santoli D, Clark SC, Kreider BL, Maslin PA, Rovera G. Amplification of IL-2-driven T cell proliferation by recombinant human IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.* 1988; 141: 519-26.
115. Masucci G, Ragnhammar P, Wersall P, Mellstedt H. Granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor augments the interleukin-2-induced cytotoxic activity of human lymphocytes in the absence and presence of mouse or chimeric monoclonal antibodies (mAb 17-1A). *Cancer Immunol.Immunother.* 1990; 31: 231-5.
116. Stewart-Akers AM, Cairns JS, Tweardy DJ, McCarthy SA. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on lymphokine-activated killer cell induction. *Blood* 1993; 81: 2671-8.
117. Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG et al. Enhanced human lymphokine-activated killer cell function after brief exposure to granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. *Cancer* 1995; 76: 1253-60.
118. Steger GG, Kaboo R, deKernion JB, Figlin R, Belldegrun A. The effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on tumour-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 1995; 72: 101-7.
119. al Aoukaty A, Giaid A, Sinoff C, Ho AD, Maghazachi AA. Priming effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are coupled to cholera toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein in human T lymphocytes. *Blood* 1994; 83: 1299-309.
120. Sisson SD, Dinarello CA. Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1988; 72: 1368-74.
121. Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shaddock RK. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* 1989; 73: 643-6.
122. Hill AD, Redmond HP, Naama HA, Bouchier-Hayes D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor growth during the postoperative period. *Surgery* 1996; 119: 178-85.
123. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 3539-43.

124. Zhou X, Jun DY, Thomas AM et al. Diverse CD8+ T-cell responses to renal cell carcinoma antigens in patients treated with an autologous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced renal tumor cell vaccine. *Cancer Res.* 2005; 65: 1079-88.
125. Simons JW, Jaffee EM, Weber CE et al. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res.* 1997; 57: 1537-46.
126. Schwaab T, Tretter CP, Gibson JJ et al. Immunological effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and autologous tumor vaccine in patients with renal cell carcinoma. *J.Urol.* 2004; 171: 1036-42.
127. Bukowski RM, Murthy S, McLain D et al. Phase I trial of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with lung cancer: clinical and immunologic effects. *J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.* 1993; 13: 267-74.
128. Wos E, Olencki T, Tuason L et al. Phase II trial of subcutaneously administered granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1149-53.
129. Rini BI, Stadler WM, Spielberger RT, Ratain MJ, Vogelzang NJ. Granulocyte-macrophage--colony stimulating factor in metastatic renal cell carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 1998; 82: 1352-8.
130. Cebon JS, Bury RW, Lieschke GJ, Morstyn G. The effects of dose and route of administration on the pharmacokinetics of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur.J Cancer* 1990; 26: 1064-9.
131. Hotton KM, Khorsand M, Hank JA et al. A phase Ib/II trial of granulocyte-macrophage-colony stimulating factor and interleukin-2 for renal cell carcinoma patients with pulmonary metastases: a case of fatal central nervous system thrombosis. *Cancer* 2000; 88: 1892-901.
132. Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005; 20: 391-414.
133. Lilleby W, Fossa SD. Chemotherapy in metastatic renal cell cancer. *World J.Urol.* 2005; 23: 175-9.
134. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat.Rev.Cancer* 2003; 3: 330-8.
135. Reiter Z, Ozes ON, Blatt LM, Taylor MW. A dual anti-tumor effect of a combination of interferon-alpha or interleukin-2 and 5-fluorouracil on natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1992; 62: 103-11.
136. Lee M, Pierce A, Mahaffey W, Specht S, Stemmler N, Kato A. Interleukin-2 in neoadjuvant therapy potentiates inhibitory activity of 5-fluorouracil and interferon in experimental liver metastases. *Anticancer Drugs* 1994; 5: 239-43.

137. Wadler S, Goldman M, Lyver A, Wiernik PH. Phase I trial of 5-fluorouracil and recombinant alpha 2a-interferon in patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1990; 50: 2056-9.
138. Mitchell MS. Combinations of anticancer drugs and immunotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 2003; 52: 686-92.
139. Morita T, Tokue A. Biomodulation of 5-fluorouracil by interferon-alpha in human renal carcinoma cells: relationship to the expression of thymidine phosphorylase. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1999; 44: 91-6.
140. Fachinfo-Service. Hrsg.. Ribofluor. Rote Liste Service GmbH. 2005.
141. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur.J Cancer* 2004; 40: 939-50.
142. Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U et al. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J.Clin.Oncol.* 2004; 22: 1188-94.
143. Gore ME. Interferon alpha (IFN), interleukin-2 (IL-2), and 5-fluorouracil (5FU) vs IFN alone in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Results of the randomised MRC/EORTC RE04 trail. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008; 20.
144. Sella A, Kilbourn RG, Gray I et al. Phase I study of interleukin-2 combined with interferon-alpha and 5-fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer. *Cancer Biother.* 1994; 9: 103-11.
145. Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ et al. IL-2 in combination with IFN- alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial. *Br.J.Cancer* 2001; 85: 1130-6.
146. Hofmockel G, Langer W, Theiss M, Gruss A, Frohmuller HG. Immunochemotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regimen of interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil. *J.Urol.* 1996; 156: 18-21.
147. Allen MJ, Vaughan M, Webb A et al. Protracted venous infusion 5-fluorouracil in combination with subcutaneous interleukin-2 and alpha-interferon in patients with metastatic renal cell cancer: a phase II study. *Br.J.Cancer* 2000; 83: 980-5.
148. Negrier S, Caty A, Lesimple T et al. Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with a combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa with or without fluorouracil. Groupe Francais d'Immunotherapie, Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J.Clin.Oncol.* 2000; 18: 4009-15.
149. O'Brien MF, Rea D, Rogers E et al. Interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma: the all Ireland experience. *Eur.Urol.* 2004; 45: 613-8.

150. Joffe JK, Banks RE, Forbes MA et al. A phase II study of interferon-alpha, interleukin-2 and 5-fluorouracil in advanced renal carcinoma: clinical data and laboratory evidence of protease activation. *Br.J.Urol.* 1996; 77: 638-49.
151. van Herpen CM, Jansen RL, Kruit WH et al. Immunochemotherapy with interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil for progressive metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II study. Dutch Immunotherapy Working Party. *Br.J.Cancer* 2000; 82: 772-6.
152. Dutcher JP, Logan T, Gordon M et al. Phase II trial of interleukin 2, interferon alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: a cytokine working group study. *Clin.Cancer Res.* 2000; 6: 3442-50.
153. Ravaud A, Audhuy B, Gomez F et al. Subcutaneous interleukin-2, interferon alfa-2a, and continuous infusion of fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II trial. *Groupe Francais d'Immunotherapie. J.Clin.Oncol.* 1998; 16: 2728-32.
154. Westermann J, Reich G, Kopp J, Haus U, Dorken B, Pezzutto A. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor plus interleukin-2 plus interferon alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol.Immunother.* 2001; 49: 613-20.
155. Lummen G, Sperling H, Luboldt H, Otto T, Rubben H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-alpha 2B in patients with advanced renal cell carcinoma. *Urol.Int.* 1998; 61: 215-9.
156. de Gast GC, Klumpen HJ, Vyth-Dreese FA et al. Phase I trial of combined immunotherapy with subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor, low-dose interleukin 2, and interferon alpha in progressive metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 2000; 6: 1267-72.
157. Verra N, Jansen R, Groenewegen G et al. Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN-alpha in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 2003; 88: 1346-51.
158. Schmidinger M, Steger G, Wenzel C et al. Sequential administration of interferon-gamma, GM-CSF, and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial. *J.Immunother.(1997.)* 2001; 24: 257-62.
159. Schiller JH, Hank JA, Khorsand M et al. Clinical and immunological effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor coadministered with interleukin 2: a phase IB study. *Clin.Cancer Res.* 1996; 2: 319-30.
160. Koulova L, Novik Y, Caliendo G, Wiernik P, Dutcher J. A phase 2 study of moderate dose interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma. *J.Immunother.(1997.)* 2005; 28: 576-81.

161. Baxevanis CN, Tsavaris NB, Papadhimitriou SI et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves immunological parameters in patients with refractory solid tumours receiving second-line chemotherapy: correlation with clinical responses. *Eur.J.Cancer* 1997; 33: 1202-8.
162. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1981; 166: 546-50.
163. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J.Immunol.Methods* 1991; 145: 185-92.
164. Samland D, Steinbach F, Reiher F, Schmidt U, Gruss A, Allhoff EP. Results of immunochemotherapy with interleukin-2, interferon-alpha2 and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic renal cell cancer. *Eur.Urol.* 1999; 35: 204-9.
165. Ravaud A, Trufflandier N, Ferriere JM et al. Subcutaneous interleukin-2, interferon alpha-2b and 5-fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma as second-line treatment after failure of previous immunotherapy: a phase II trial. *Br.J.Cancer* 2003; 89: 2213-8.
166. Ryan CW, Vogelzang NJ, Dumas MC, Kuzel T, Stadler WM. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in combination immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results of two phase II clinical trials. *Cancer* 2000; 88: 1317-24.
167. Younes E, Haas GP, Dezso B et al. Radiation-induced effects on murine kidney tumor cells: role in the interaction of local irradiation and immunotherapy. *J.Urol.* 1995; 153: 2029-33.
168. Brinkmann OA, Bruns F, Gosheger G, Micke O, Hertle L. Treatment of bone metastases and local recurrence from renal cell carcinoma with immunochemotherapy and radiation. *World J.Urol.* 2005; 23: 185-90.
169. Escudier B, Lassau N, Angevin E et al. Phase I trial of sorafenib in combination with IFN alpha-2a in patients with unresectable and/or metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *Clin.Cancer Res.* 2007; 13: 1801-9.
170. Gollob JA, Rathmell WK, Richmond TM et al. Phase II trial of sorafenib plus interferon alfa-2b as first- or second-line therapy in patients with metastatic renal cell cancer. *J.Clin.Oncol.* 2007; 25: 3288-95.
171. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92: 4150-66.
172. Gohring B, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Schabel J, Langner J. Prognostic value of the immunomonitoring of patients with renal cell carcinoma under therapy with IL-2/IFN-alpha-2 in combination with 5-FU. *Urol.Res.* 1996; 24: 297-303.
173. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409-14.

174. Vasu C, Dogan RN, Holterman MJ, Prabhakar BS. Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4+/CD25+ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis. *J.Immunol.* 2003; 170: 5511-22.
175. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J.Immunol.* 2003; 170: 4986-95.
176. Quemeneur L, Beloeil L, Michallet MC et al. Restriction of de novo nucleotide biosynthesis interferes with clonal expansion and differentiation into effector and memory CD8 T cells. *J.Immunol.* 2004; 173: 4945-52.
177. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 6337-43.
178. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J.Immunol.* 1999; 162: 5728-37.
179. Tsuchiya Y, Igarashi M, Suzuki R, Kumagai K. Production of colony-stimulating factor by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. *J.Immunol.* 1988; 141: 699-708.
180. Sansom DM, Hall ND. B7/BB1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro. *Eur.J.Immunol.* 1993; 23: 295-8.
181. Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C et al. Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Immunol.* 1999; 19: 58-66.
182. Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur.J.Immunol.* 1994; 24: 71-5.
183. Ferlazzo G, Semino C, Meta M, Procopio F, Morandi B, Melioli G. T lymphocytes express B7 family molecules following interaction with dendritic cells and acquire bystander costimulatory properties. *Eur.J.Immunol.* 2002; 32: 3092-101.
184. Moosig F, Csernok E, Wang G, Gross WL. Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells. *Clin.Exp.Immunol.* 1998; 114: 113-8.
185. Thurnher M, Radmayr C, Hobisch A et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes from renal-cell carcinoma express B7-1 (CD80): T-cell expansion by T-T cell co-stimulation. *Int.J.Cancer* 1995; 62: 559-64.

186. Taylor PA, Lees CJ, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Blazar BR. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J.Immunol.* 2004; 172: 34-9.
187. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol.Rev.* 2005; 204: 195-207.
188. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101: 10398-403.
189. May KF, Jr., Chang X, Zhang H et al. B7-deficient autoreactive T cells are highly susceptible to suppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J.Immunol.* 2007; 178: 1542-52.

10 Lebenslauf

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

11 Publikationsliste

11.1 Peer-reviewed journals

Westermann J, Kopp J, van Lessen A, Hecker AC, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A. Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl⁺ chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2007; 137(4):297-306. Epub 2007 Apr 4.

11.2 Abstracts

1. Westermann J, Kopp J, v Lessen A, Hecker AC, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A. Vaccination with autologous Dendritic Cells in bcr/abl⁺ Chronic Myeloid Leukemia: Results of a clinical phase-I/II trial. DC 2007, 5th International Meeting on Dendritic Cell Vaccination and other strategies to tip the balance of the immunesystem; Bamberg (2007).
2. Westermann J, Kopp J, van Lessen A, Hecker A, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A. Dendritic cells as a vaccine in bcr/abl⁺ chronic myeloid leukemia: Final results of a phase I/II trial. *Onkologie* 28 (Suppl 3), 215 (2005)
3. Westermann J, Kopp J, van Lessen A, Hecker A, Baskaynak G, le Coutre P, Döhner K, Döhner H, Dörken B, Pezzutto A. Dendritic cells for vaccination in bcr/abl⁺ chronic myeloid leukemia – final results of a phase I/II study. *Blood* 104: 802a (2004)

12 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn PD Dr. med. Jörg Westermann für die Bereitstellung des Themas und die herausragende Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Promotion.

Seine stete Bereitschaft zu intensiven und konstruktiven Diskussionen während der Konzeption und Durchführung der Experimente sowie der Verfassung der Dissertationsschrift trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Tam Nguyen-Hoai, die mich mit großem Engagement im Labor betreute. Sie wies mich nicht nur in die immunologischen Arbeitstechniken ein, sondern stand mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite. Zudem danke ich Kerstin Daemen für die mir entgegengebrachte Unterstützung.

Vielen Dank an Frau Dr. rer. nat. Karin Schmelz aus der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Ingo Tamm für die Bereitstellung der Zelllinien.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité bedanke ich mich für die Einführung in SPSS und die statistische Beratung.

Des Weiteren danke ich:

Christiane Wagner und Wulf Wöntig sowie Sabine Katzki für die anregenden Kommentare, Sonja Oswald und Katja Brocke für die Durchsicht der Arbeit.

Elisabeth Butz und Hans Dittrich sowie Walter Mildenberger für ihre Hilfe in computer- und softwaretechnischen Angelegenheiten.

ganz besonders meinen Eltern, die mich stets unterstützten.

13 Erklärung

Ich, Ann-Christine Hecker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin-2 (IL-2), Interferon- α (IFN- α) und 5-Fluorouracil (5-FU) in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms - eine Phase-I/II-Studie“

selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt.

Ann-Christine Hecker

04. September 2008