

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Medizinische Klinik m.S. Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Dörken

Habilitationsschrift

Immuntherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Anne Flörcken

Eingereicht:	Juli 2016
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Herr
2. Gutachter:	Prof. Dr. Peter Lang

Inhalt

1. Einleitung.....	3
1.1. Epidemiologie und Pathogenese des Nierenzell-Karzinoms.....	3
1.2. Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms: Historische Entwicklungen.....	4
1.3. Aktuelle Standards in der Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms.....	5
1.3.1. Erstlinientherapie.....	5
1.3.2. Therapie in der Zweit- und Drittlinie und Sequenz-Therapie.....	5
1.4. Immuntherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.....	7
1.4.1. Grundsätze der Immuntherapie.....	7
1.4.2. Strategien der Immuntherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.....	10
1.4.3. Zukünftige Perspektiven: Checkpoint-Inhibition beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.....	11
2. Zielsetzung der Arbeit	13
3. Originalarbeiten.....	14
3.1. Tumorstimmulierung beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.....	14
3.1.1. Allogene, partiell HLA-gematchte dendritische Zellen beladen mit autologem Tumorzellsat als Vakzine bei metastasiertem Nierenzell-Karzinom.....	14
3.1.2. Allogene, Gen-modifizierte Tumorzellen (RCC-26/IL-7/CD80) als Vakzine bei Patienten mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom: eine klinische Phase I-Studie.....	26
3.2. Tumor-induzierte Immunsuppression beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.....	37
3.2.1. Genexpressionsanalysen an PBMC während der Therapie mit einer Gen-modifizierten allogenen Tumorzell-Vakzinierung bei fortgeschrittenem Nierenzell-Karzinom: Tumor-induzierte Immunsuppression und eine mögliche Rolle für NF- κ B.....	37
3.2.2. Sorafenib, jedoch nicht Sunitinib induziert regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom.....	51
3.2.3. Myeloische Suppressorzellen im peripheren Blut: Optimierte Quantifizierung bei gesunden Spender(inne)n und Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom.....	57
3.2.4. Immunmodulatorische Moleküle beim metastasierten Nierenzell-Karzinom: CD80 und CD86 werden auf Tumorzellen exprimiert.....	66
4. Diskussion.....	79
4.1. Induktion von Antitumorimmunität bei Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom.....	79
4.2. Tumor-induzierte Immunsuppression.....	82
5. Zusammenfassung	89
6. Literaturangaben	91
7. Danksagung	98
8. Erklärung	99

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Pathogenese des Nierenzell-Karzinoms

Das Nierenzell-Karzinom (englisch: renal cell carcinoma, RCC) gehört zu den häufigsten malignen Tumoren des Erwachsenenalters. Mit 3,8% aller Krebserkrankungen steht es an 6. Stelle beim Mann, mit etwa 2,4% der Erkrankungen an 10. Stelle bei der Frau. Das RCC ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem mittleren Erkrankungsalter im ca. 70. Lebensjahr. Aktuell werden etwa drei Viertel der Fälle in frühen Stadien diagnostiziert, bei etwa 25% der Fälle findet sich bei Erstdiagnose bereits ein lokal weit fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium. Die Prognose des RCC insbesondere in frühen Stadien ist relativ günstig, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 76% für Männer und 78% für Frauen, diese Prognose ist jedoch stark abhängig vom zugrundeliegenden Tumorstadium [1]. In der histologischen Untersuchung dominiert mit 80-85% der klarzellige Subtyp [2]. Bei ca. 1-4% aller Patient(inn)en ist das RCC erblicher Genese [3]. Die häufigste hereditäre Form des RCC ist das dominant vererbte Von-Hippel-Lindau (VHL)–Syndrom, bedingt durch VHL-Mutationen auf Chromosom 3 [4]. Dieses Syndrom hat wesentlich zur Erklärung der molekularen Pathogenese des RCC beigetragen: das VHL-Gen hat Funktionen eines Tumorsuppressorgens und ist bei 70% aller sporadischen Fälle ebenfalls mutiert [5-7]. Bei Vorliegen dieser Mutationen oder unter dem Einfluss von Hypoxie wird der Abbau eines VHL-Protein-Komplexes verhindert und es kommt zu einer konsekutiven Akkumulation von Heat Inducible Factor (HIF) 1- α und nachfolgend zu einer Überexpression von Genen wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor (TGF)- α . Diese Faktoren führen in Folge zu einer gesteigerten Proliferation und Angiogenese. Die betroffenen Signalwege bieten Angriffspunkte für moderne zielgerichtete Therapien, die heutzutage als Standard in der Therapie des metastasierten Nierenzell-

Karzinoms (mRCC) gelten. Bei lokalisierter Nierenzell-Karzinom-Erkrankung wird eine operative Resektion des Primärtumors empfohlen. Bei Nichtoperabilität sind lokale Ablationsverfahren bzw. bei kleinen Tumoren auch eine aktive Überwachung denkbar [8]. Beim Auftreten von limitierter Metastasierung kann eine Resektion mit lokal-kurativer oder lokal-kontrollierender Intention erwogen werden [8].

1.2. Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms: Historische Entwicklungen

In der metastasierten Krankheitssituation hat die klassische Chemotherapie keine Bedeutung, da gegenüber den gebräuchlichen Zytostatika Resistenzen bestehen und nur mit einigen Substanzen geringe Ansprechraten meist ohne signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (englisch: overall survival, OS) erreicht werden konnten [9]. Aufgrund von Spontanremissionen (<1% der Patient(inn)en) bestand die Annahme, dass es sich beim RCC um einen „immunresponsiven“ Tumor handeln könnte. Daher wurden seit den 1980er Jahren Zytokine wie Interferon-alpha (IFN- α) und Interleukin-2 (IL-2) als unspezifische Immuntherapie des mRCC eingesetzt [10]. Hier konnten geringe Ansprechraten von bis zu 10% für die Monotherapie gezeigt werden, in der Kombination wurden Ansprechraten von bis zu 20% erreicht. Weiterhin wurde hochdosiertes IL-2 eingesetzt. Hier wurden höhere Ansprechraten von teilweise mehr als 20% erreicht, jedoch wurde kein verbessertes Gesamtüberleben gezeigt [11, 12]. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine systemische Immuntherapie mit IFN- α beim primär metastasierten Nierenzell-Karzinom signifikant wirksamer ist und mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert ist wenn eine vorherige Tumornephrektomie stattgefunden hat [13, 14]. Zuletzt ist die Zytokin-Therapie zunehmend in den Hintergrund getreten, da zielgerichtete Therapien entwickelt wurden. Hierzu zählen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) oder Antikörper gegen VEGF, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (raf)-Kinase oder Inhibitoren des Mammalian Target of Rapamycin

(mTOR). Diese modernen Substanzen führten in den entsprechenden Zulassungsstudien jeweils zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFS) gegenüber IFN- α und wurden als neuer Standard etabliert. Eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte jedoch nur selten gezeigt werden [15-18].

1.3. Aktuelle Standards in der Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms

1.3.1. Erstlinientherapie

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zielgerichtete Substanzen als neue Standardtherapien beim mRCC etabliert. Als erste Substanz wurde der TKI Sorafenib zugelassen und konnte eine signifikante Verbesserung des PFS gegenüber einer Placebo-Therapie zeigen [19]. Der TKI Sunitinib und der mTOR-Inhibitor Temsirolimus wurden in der Erstlinienbehandlung des mRCC im Vergleich zu einer IFN- α -Therapie untersucht und konnten ebenfalls eine Verbesserung des PFS erreichen [15, 16]. Schließlich wurde die Substanz Pazopanib (ebenfalls ein TKI) in die Erstlinientherapie integriert [20]. In einer Vergleichsstudie konnten Sunitinib und Pazopanib als gleichwertige Alternativen in der Erstlinientherapie etabliert werden [21]. Weiterhin wurde die Kombination von Bevacizumab und IFN- α in die Erstlinientherapie eingegliedert [17, 18].

1.3.2. Therapie in der Zweit- und Drittlinie und Sequenz-Therapie

Für mehrere zielgerichtete Substanzen konnte die Wirksamkeit in der Zweit- und Drittlinien-Therapie des mRCC gezeigt werden. Für den TKI Axitinib wurde in der Zweitlinientherapie nach Sunitinib oder Zytokinen ein verlängertes PFS im Vergleich mit Sorafenib dokumentiert [22]. In der Zweitlinientherapie nach Zytokinen sind zusätzlich Sorafenib oder Pazopanib einsetzbar [20, 23]. Kürzlich ist die Wirksamkeit von zwei weiteren Substanzen gezeigt worden: Durch den TKI Cabozantinib, der sowohl VEGF als auch die Tyrosinkinase MET (auch Hepatozyten-

Wachstumsfaktor-Rezeptor) und AXL hemmt, wurde in der Zweitlinientherapie nach anti-VEGF-gerichteter Therapie ein verbessertes PFS und OS im Vergleich zum mTOR-Inhibitor Everolimus beobachtet [24, 25]. Weiterhin wurde für den Antikörper gegen das Programmed Death 1 (PD-1)-Molekül Nivolumab Wirksamkeit in der Zweitlinientherapie nach antiangiogenetischer Therapie gezeigt: Im Vergleich mit Everolimus konnte durch eine Therapie mit Nivolumab ein verbessertes medianes Gesamtüberleben erreicht werden [26]. Für Everolimus wurde (gegenüber einer Placebo-Therapie) nach dem Versagen von mindestens einer VEGF-inhibierenden Therapie jedoch grundsätzlich ein verlängertes PFS dokumentiert [27]. Auch gibt es erste Hinweise, dass Kombinationstherapien nach Versagen einer anti-VEGF-gerichteten Therapie tolerabel und wirksam sein könnten: So wurde der TKI Lenvatinib mit Everolimus kombiniert und konnte zu einem verbesserten PFS und OS im Vergleich zu Everolimus alleine führen [28]. Die Gabe des TKI Dovitinib versus Sorafenib wurde nach Versagen eines mTOR-Inhibitors und einer anti-VEGF-gerichteten Therapie getestet, hier konnte kein relevanter Unterschied im PFS oder Gesamtüberleben gezeigt werden [29]. In den letzten Jahren wurden zunehmend Versuche unternommen, die optimale Therapiesequenz bei Patient(inn)en mit mRCC herauszuarbeiten, die beste Abfolge für den gesamten Therapieverlauf konnte jedoch bisher nicht etabliert werden. Es wurde aber gezeigt, dass die Sequenz von Sunitinib gefolgt von Everolimus der umgekehrten Sequenz in Bezug auf PFS und objektives Ansprechen überlegen ist [30]. In der Sequenz Sunitinib gefolgt von Sorafenib oder umgekehrt konnten keine relevanten Unterschiede bezüglich PFS, objektiver Ansprechrates oder Gesamtüberleben beobachtet werden [31]. Die Wahl der Medikamente sollte sich daher am individuellen Ziel der Therapie sowie an den Begleiterkrankungen und den Wünschen der Patient(inn)en orientieren.

1.4. Immuntherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

1.4.1. Grundsätze der Immuntherapie

Die Immuntherapie bei malignen Erkrankungen hat das Ziel, eine Tumor-induzierte Immunsuppression zu überwinden und gezielte Immunantworten auszulösen. Hierzu werden verschiedene therapeutische Strategien unterschieden (siehe Abbildung 1). Die Wirksamkeit der Immuntherapien wird jedoch durch unterschiedliche tumoreigene Mechanismen limitiert. Hierzu zählen die Entwicklung von peripherer oder zentraler Toleranz, das Fehlen definierter tumor-spezifischer Antigene und komplexe „Immune-Escape“-Mechanismen. So können z.B. kostimulatorische Signale fehlen oder Immun-Checkpoint-Moleküle hochreguliert sein, die zu „T-Zell-Erschöpfung“ führen oder eine Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen inhibieren [32-34]. Ein weiterer Grund für das Versagen von Immuntherapien war bisher die häufig fehlende Identifikation eines Tumor-spezifischen bzw. assoziierten Antigens. Tumor-assoziierte Antigene (TAA) gelten als Grundbedingung für die Induktion von spezifischen T-Zell-Antworten und als Ausgangs- bzw. Zielstruktur von Immuntherapien [35]. Zusätzlich nehmen dendritische Zellen (DC) als potente antigen-präsentierende Zellen (APC) eine wichtige Rolle bei der Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten ein [36-38]. Häufig sind die gegen bestimmte Antigene gerichteten Immuntherapien entweder zu komplikationsträchtig oder zu unspezifisch und damit nicht ausreichend wirksam. Einen relevanten „Immune-Escape“-Mechanismus stellt die Tumor-induzierte Limitierung einer Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-gesteuerten T-Zell-Antwort dar [39]. So können Tumorzellen die MHC-I-Komplex-Expression auf ihrer Oberfläche verlieren [40]. Zusätzlich können intrazelluläre Transportwege limitiert werden, die normalerweise eine adäquate Antigen-Präsentation an der Oberfläche ermöglichen [41, 42]. Immuntherapeutische Ansätze haben das Ziel, diese komplexen Mechanismen der Tumor-induzierten Immunsuppression zu

überwinden. Es sind folgende Strategien zu unterscheiden: Aktive Immuntherapien und passive Therapiestrategien. Aktive Immuntherapien beinhalten z.B. Tumorstimmungsstrategien zur Bereitstellung von Tumorantigenen mittels Peptiden, Proteinen, Tumorzellen, Tumorzelllysaten oder Tumor-RNA sowie Vakzinierungen mit genetisch modifizierten Tumorzellen oder DC-basierten Vakzinen [43, 44]. Passive Ansätze beinhalten unter anderem Zytokine: bei Patient(inn)en mit malignem Melanom und RCC konnte durch hoch-dosiertes IL-2 ein objektives Ansprechen demonstriert werden [45]. Weitere passive Immuntherapien, z.B. mit monoklonalen Antikörpern, sind zum festen Bestandteil von modernen Therapieregimen bei multiplen Tumorentitäten geworden [46]. Seit einiger Zeit stehen auch bifunktionelle Antikörper zur Verfügung, die gezielt T-Zell-Antworten gegen den Tumor induzieren können [47]. Weiterhin sind in jüngerer Vergangenheit vor allem Ansätze des adoptiven T-Zell-Transfers weiterentwickelt worden. Hier kommen autologe und allogene Ansätze zum Einsatz [48]. Kürzlich sind sogenannte chimäre Antigen-Rezeptor T-Zellen (CAR) entwickelt worden, die bisher insbesondere bei hämatologischen Neoplasien eingesetzt wurden [47]. Diese bestehen in der Regel aus autologen T-Zellen, die genetisch so modifiziert werden, dass sie extrazellulär die variable Region z.B. eines anti-CD19-Antikörpers mit einer intrazellulären Komponente (CD3 ζ) sowie einem kostimulatorischen Element verbinden, welches eine konsekutive T-Zell-Aktivierung gegen das Zielantigen (z.B. CD19) bewirkt. Andere Ansätze verfolgen die Rückgabe von ex-vivo expandierten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten [45, 49, 50]. Weiterhin sind Strategien mit transgenen T-Zellen verfolgt worden. Hier werden T-Zellen mit antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) transduziert und diese dann therapeutisch verabreicht [48, 51, 52]. Limitierend für diese Strategien ist bisher eine erhebliche Therapie-assoziierte Toxizität, da die verwendeten Antigene wie z.B. das Melanom-assoziierte Antigen (MAGE)-A3/A12 nicht nur streng auf den Zielgeweben vorkommende Antigene sind, sondern

zum Teil auch im Normalgewebe der behandelten Patient(inn)en exprimiert werden [51]. Zukünftig sind daher Mutations-spezifische adoptive T-Zell-Strategien denkbar, um therapie-limitierende Nebenwirkungen an Normalgeweben zu reduzieren [53]. Diese Strategie ist gegen Neo-Antigene im Tumor gerichtet, welche in der Regel als streng tumorspezifisch gelten können [54].

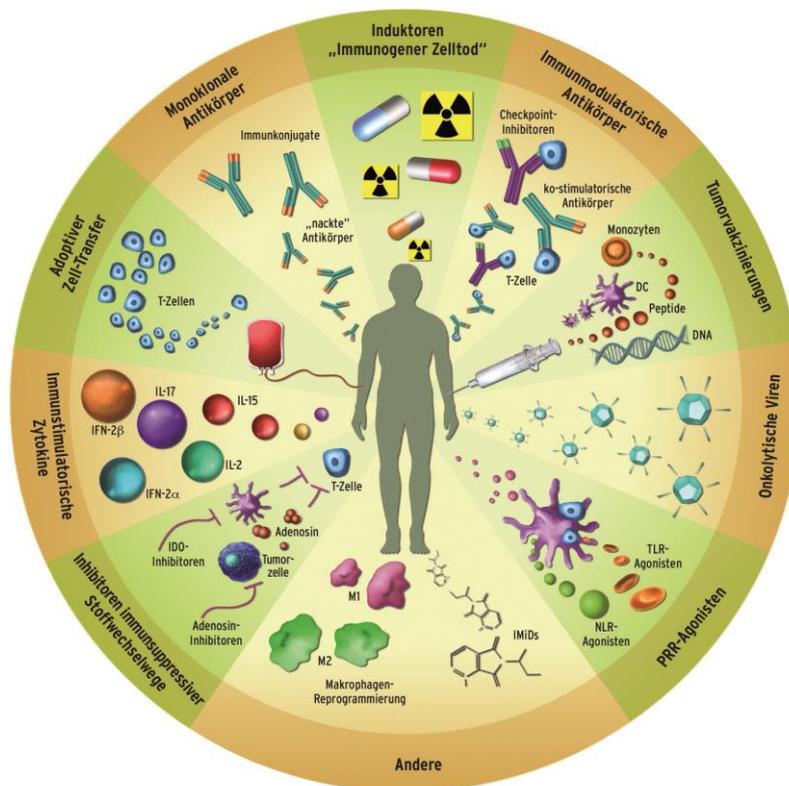


Abbildung 1.

Immuntherapeutische Strategien bei malignen Erkrankungen

Unterschiedliche immuntherapeutische Ansätze sind in den letzten Jahrzehnten zum Einsatz gekommen: monoklonale Antikörper, Tumorvakzinierungen, onkolytische Viren, Pattern Recognition Rezeptor (PRR)-Agonisten, immunstimulatorische Zytokine, Induktoren des „immunogenen Zelltods“, Inhibitoren immunsuppressiver Signalwege und adoptiver Zell-Transfer.

DC, dendritische Zellen; IDO, Indolamin 2,3-Dioxygenase; IFN, Interferon; IMiD, immunmodulatorische Medikamente; NLR, NOD-like-Rezeptor; TLR, Toll-like-Rezeptor. Modifiziert nach [55].

1.4.2. Strategien der Immuntherapie beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

Trotz der Entwicklung und Etablierung moderner zielgerichteter Substanzen bleibt die langfristige Prognose von Patient(inn)en mit mRCC ungünstig und mehr als die Hälfte aller Patient(inn)en nach Tumornephrektomie entwickeln ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen [56]. Daher werden weiterhin dringend innovative therapeutische Ansätze benötigt. Beim mRCC wurden bisher multiple Versuche mit therapeutischen Tumorstimmungen unternommen. Bisher sind die Erfahrungen nur bedingt erfolgreich, insbesondere konnte meist kein klinisch relevantes Ansprechen gezeigt werden [57-59]. Im therapeutischen Setting sind bisher unterschiedliche Strategien der Tumorstimmung verfolgt worden. So sind z.B. Tumorzellen nach Transfektion mit kostimulatorischen Molekülen und/oder Zytokinen zum Einsatz gekommen, um die Immunogenität der Vakzine zu verstärken [60, 61]. Auch DC-basierte Ansätze wurden verfolgt. Der Einsatz von DC in der Tumorstimmung beim mRCC ist jedoch limitiert, da wenige definierte TAA beim mRCC bekannt sind, die als Zielstruktur einer möglichen Immunantwort dienen können. Unterschiedliche Strategien haben daher darauf abgezielt, eine eher heterogene TAA-Quelle bereitzustellen, z.B. Tumor-assoziierte Peptide oder Tumor-RNA. Diese Ansätze konnten jedoch nur limitierte klinische Resultate erzielen [62-64]. Zusätzlich sind Tumorzellen oder Tumorstimmungslysate sowie DC-Tumorstimmung-Hybride als TAA-Quelle in der DC-basierten Vakzination verwendet worden, auch hier konnte nur sehr selten relevantes klinisches Ansprechen beobachtet werden [65-70]. Zusätzlich besteht eine durch den Tumor bedingte Immunsuppression, insbesondere bei hoher Tumorstimmungslast [71]. Für den Einsatz einer Tumorstimmung könnte daher eher die klinische Situation der minimalen Resttumorkrankung (nach erfolgreicher Operation oder systemischer Therapie) erfolgversprechend sein [72]. Zusätzlich könnten kombinierte Therapieansätze sinnvoll sein [73], z.B. mit Sunitinib, da hier eine Reduktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) und

myeloischen Suppressorzellen (MDSC) während der Therapie beobachtet werden konnte [74, 75]. Eine Studie zur Kombination mit Sunitinib und DC-basierter Vakzine bei mRCC-Patient(inn)en konnte primär die Sicherheit und Durchführbarkeit der Kombinationsbehandlung zeigen. Zusätzlich konnten eine Reduktion von Treg und MDSC sowie Therapie-induzierte T-Zell-Antworten beobachtet werden [76]. Die Optimierung therapeutischer Vakzinen oder adoptiver T-Zell-Therapien bzw. die Kombination mit modernen zielgerichteten Substanzen oder Immuntherapeutika bleibt daher Gegenstand weiterer Untersuchung.

1.4.3. Zukünftige Perspektiven: Checkpoint-Inhibition beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

Kürzlich sind sogenannte „Checkpoints“ des Immunsystems (inhibitorische Rezeptor-Ligand-Interaktionen) vermehrt in den Fokus getreten. Neue innovative Therapieansätze bei multiplen Entitäten-so auch beim mRCC-sind durch Hemmung dieser inhibitorischen Moleküle entstanden [33, 77-79]. Immunologische Checkpoints stellen wichtige Regulations-Mechanismen des Immunsystems dar. Im Rahmen von Tumorerkrankungen kommt es häufig zu einer Hochregulation dieser inhibitorischen Moleküle, die dem Tumor helfen, sich der immunologischen Kontrolle zu entziehen. Schlüsselstellen innerhalb dieser „Checkpoints“ haben das Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und das Programmed Death 1 (PD-1) Protein [33, 80]. CTLA-4 ist ein Protein, das in der Regulation von Immunantworten eine wichtige Rolle spielt. Es wird speziell an der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert und führt nach T-Zell-Aktivierung zur Limitierung der T-Zell-Antwort, um eine „Überreaktion“ des Immunsystems zu verhindern. CTLA-4 wird ausschließlich auf T-Zellen exprimiert und seine Inhibition führt zu vermehrter T-Zell Aktivierung via gesteigerter Kostimulation durch CD28 [33, 80-83]. Auch PD-1 ist ein Protein, das limitierend in Immunantworten eingreift. Es findet

sich auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Bei Patient(inn)en mit Tumorerkrankungen konnte beobachtet werden, dass PD-1 (auf der T-Zelle) an die immunsuppressiven Liganden PD-L1 und PD-L2 auf der Oberfläche der Tumorzellen und im Tumormilieu bindet [33]. PD-L1 findet sich zusätzlich auf Makrophagen, MDSC, DC, B- und T-Zellen [84]. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von PD-1 über die Reaktivierung der T-Zell-Funktion eine signifikante Antitumorwirkung beim mRCC hat [77, 79]. Hier spielt vor allem die relativ hohe Frequenz von somatischen Mutationen beim Nierenzell-Karzinom eine Rolle, die zu vielen sogenannten Neo-Antigenen führt [54]. Diese Neo-Antigene führen zu vermehrten lymphozytären Infiltraten im Tumorgewebe und erhöhen die Wirksamkeit von modernen Checkpoint-Inhibitoren [80]. Diese Wirksamkeit konnte bisher vor allem in der Zweit- oder Drittlinien-Therapie gezeigt werden [79], eine Zulassung des ersten PD-1 Inhibitors für Patient(inn)en mit mRCC in Deutschland ist kürzlich erfolgt.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der hier zusammengefassten Originalarbeiten war die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien sowie die Analyse der Mechanismen von Tumor-induzierter Toleranz bei Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom. Zusätzlich sollte der Einfluss von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf diese Mechanismen untersucht werden. Zunächst wurden die klinischen und immunologischen Effekte immuntherapeutischer Vakzinierungs-Strategien beim metastasierten Nierenzell-Karzinom untersucht: eine Phase I/II-Studie mit allogenen, partiell HLA-gematchten dendritischen Zellen, die mit autologem Tumorlysat beladen waren, sowie eine Phase I-Studie mit allogenen, Gen-modifizierten (Interleukin-7 (IL-7)/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen. Zum besseren Verständnis der immunmodulatorischen Effekte der zweiten Tumorkonvakzinierungs-Studie wurden Genexpressionsanalysen (GEP) aus peripherem Blut dieses Patientenkollektivs durchgeführt. Zur Analyse einer zugrundeliegenden Immunsuppression sowie der immunmodulatorischen Effekte systemischer Therapie wurden schließlich Untersuchungen an Lymphozytensubpopulationen (Treg und MDSC) bei mRCC-Patient(inn)en vor und nach Therapie durchgeführt. Zusätzlich wurden immunhistochemische Analysen von immunmodulatorischen Molekülen an Nierenzell-Karzinom-Gewebeproben unterschiedlicher Patienten-Subgruppen (Ansprechen vs. kein Ansprechen auf Therapie) durchgeführt.

3. Originalarbeiten

3.1. Tumorstimmung beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

3.1.1. Allogene, partiell HLA-gematchte dendritische Zellen beladen mit autologem Tumorlysate als Vakzine bei metastasiertem Nierenzell-Karzinom

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J. Human Vaccines and Immunotherapeutics 2013, 9(6): 1217-27.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt die Ergebnisse einer Phase I/II-Studie bei mRCC-Patient(inn)en mit einer Tumorstimmung aus allogenen, partiell HLA-gematchten dendritischen Zellen, beladen mit autologem Tumorlysate. 7 Patient(inn)en konnten repetitiv mit 1×10^7 Zellen über 20 Wochen vakziniert werden und erhielten begleitend 3 Mio. IE IL-2 s.c. 1x/Tag. Primäre Endpunkte der Studie waren Sicherheit und Machbarkeit, sekundäre Endpunkte waren das immunologische und klinische Ansprechen. Die Vakzinierte erwies sich als machbar und sicher, eine relevante therapieassoziierte Toxizität wurde nicht beobachtet. Ein objektives Ansprechen konnte nicht dokumentiert werden. Es wurde jedoch bei 29% der Patient(inn)en eine Krankheitsstabilisierung während der Studie gezeigt, mit einer medianen Zeit zur Progression von 24,6 Wochen (5-96). Bei 3 von 7 Patient(inn)en konnte eine TH1-polarisierte Immunantwort gegen RCC-assoziierte Tumorantigene beobachtet werden. Interessanterweise konnte bei einer Patientin zusätzlich eine Vakzine-induzierte klonale T-Zell-Antwort ausgelöst werden. Zusammenfassend erwies sich die Vakzinierte als sicher und durchführbar, konnte jedoch kein relevantes klinisches Ansprechen erreichen.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study.

Flörcken A, Kopp J, van Lessen A, Movassaghi K, Takvorian A, Jöhrens K, Möbs M, Schönemann C, Sawitzki B, Egerer K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Hum Vaccin Immunother. 2013 Jun;9(6):1217-27.

<http://dx.doi.org/10.4161/hv.24149>

Epub 2013 Mar 4. PubMed PMID: 23458999.

3.1.2. Allogene, Gen-modifizierte Tumorzellen (RCC-26/IL-7/CD80) als Vakzine bei Patienten mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom: eine klinische Phase I-Studie

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A. Gene Therapy 2011, 18: 354–363

Zusammenfassung

Die vorliegende Publikation zeigt die Ergebnisse einer klinischen Phase I-Studie bei mRCC-Patient(inn)en mit einer allogenen, Gen-modifizierten Tumorzell-Linie (RCC-26/IL-7/CD80). 10 (HLA)-A*0201+ Patient(inn)en mit progredientem mRCC wurden über 22 Wochen mit 2,5–40x10⁶ IL-7/CD80-kotransfizierten allogenen HLA-A*0201+ Tumorzellen immunisiert. Primäre Endpunkte der Studie waren die Sicherheit und Durchführbarkeit, sekundäre Endpunkte waren das klinische und immunologische Ansprechen. Es wurde gezeigt, dass die Vakzine-Behandlung sicher und durchführbar ist. Die Hälfte aller Patient(inn)en zeigte eine stabile Erkrankung während der Studie mit einer medianen Zeit bis zur Tumorprogression (TTP) von 18 Wochen, es konnte jedoch keine TH1-polarisierte Immunantwort induziert werden. Lediglich ein TH2-polarisiertes Zytokin-Profil mit antigen-spezifischer Interleukin-10 (IL-10)-Sekretion wurde bei der Mehrheit der Patient(inn)en beobachtet. Zusätzlich wurde vor und nach Vakzinierung eine deutlich verminderte IFN- γ -Sekretion der Lymphozyten nach antigen-spezifischer und unspezifischer Stimulation nachgewiesen, welches vermutlich auf eine zugrundeliegende Tumor-induzierte Immunsuppression zurückzuführen ist. In Zusammenfassung ist die Vakzinierung durchführbar und sicher, es wurde jedoch keine adäquate TH1-polarisierte Immunantwort induziert.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

Allogeneic gene-modified tumor cells (RCC-26/IL-7/CD80) as a vaccine in patients with metastatic renal cell cancer: a clinical phase-I study

Westermann J, Flörcken A, Willimsky G, van Lessen A, Kopp J, Takvorian A, Jöhrens K, Lukowsky A, Schönemann C, Sawitzki B, Pohla H, Frank R, Dörken B, Schendel DJ, Blankenstein T and Pezzutto A.

Gene Ther. 2011 Apr;18(4):354-63.

<http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.143>

Epub 2010 Nov 11. PubMed PMID: 21068778.

3.2. Tumor-induzierte Immunsuppression beim metastasierten Nierenzell-Karzinom

3.2.1. Genexpressionsanalysen an PBMC während der Therapie mit einer Gen-modifizierten allogenen Tumorzell-Vakzinierung bei fortgeschrittenem Nierenzell-Karzinom: Tumor-induzierte Immunsuppression und eine mögliche Rolle für NF- κ B

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A (**geteilte Erstautorenschaft**), Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J. International Journal of Cancer 2015, 36(8):1814-26.

Zusammenfassung

In dieser Untersuchung wurden GEP an mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von mRCC-Patient(inn)en durchgeführt, die im Rahmen der beschriebenen Phase I-Tumorvakzinierungsstudie mit allogenen, Gen-modifizierten (IL-7/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen therapiert worden waren. GEP an PBMC wurden vor und nach Vakzinierung durchgeführt und mit dem Profil von gesunden Spender(inne)n verglichen. Vor Vakzinierung war bei mRCC-Patient(inn)en versus Normalkontrollen eine deutliche Herunterregulation von Gensignaturen erkennbar, die mit Antigenpräsentation, T-zellulärer Immunantwort, Zytokinen/Chemokinen und Signalwegen/Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Interessanterweise konnte die vorbestehende Immunsuppression zusätzlich mit einem alterierten Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B)-Signalweg assoziiert werden. Die Vakzinierung der mRCC-Patient(inn)en führte zu einer Abschwächung der vorbestehenden Immunsuppression, jedoch konnte auch mittels GEP keine TH1-polarisierte Immunantwort nachgewiesen werden. Die Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs wurde durch Western Blot-Analysen und den Nachweis einer reduzierten Zytokin-Sekretion in Proliferationsassays nach Stimulation und zusätzlicher Gabe eines selektiven NF- κ B-Inhibitors unterstützt.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A , Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A , Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A , Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A , Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells during treatment with a gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in advanced renal cell cancer: Tumor-induced immunosuppression and a possible role for NF- κ B.

Flörcken A, Grau M, Wolf A, Weilemann A, Kopp J, Dörken B, Blankenstein T, Pezzutto A, Lenz P, Lenz G, Westermann J.

Int J Cancer. 2015 Apr 15;136(8):1814-26.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29230>

Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25242680.

3.2.2. Sorafenib, jedoch nicht Sunitinib induziert regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J. *Anti-Cancer Drugs* 2012, 23:298-302.

Zusammenfassung

Diese Analyse wurde durchgeführt, um den Einfluss von Sorafenib und Sunitinib auf die Entwicklung von Treg bei mRCC-Patient(inn)en zu untersuchen. Treg wurden mittels Durchflußzytometrie im peripheren Blut von Patient(inn)en (n=19) vor und während der Therapie untersucht (Sunitinib 50 mg/d, n=11, Sorafenib 800 mg/d, n=8). Durchflußzytometrische Analysen der PBMC wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt (CD3, CD4, CD25, und FOXP3). Während des ersten Therapiemonats mit Sorafenib war ein signifikanter und persistierender Anstieg der FOXP3+CD3+CD4+CD25+ Treg zu beobachten. Während einer Therapie mit Sunitinib war keine Veränderung der Treg-Zahlen erkennbar. Dieser immunmodulatorische Effekt von TKI könnte für das zukünftige Design von Kombinationstherapien mit immuntherapeutischen Strategien von großer Bedeutung sein. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sorafenib nicht die optimale Substanz für eine solche Kombination darstellt.

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Anticancer Drugs. 2012 Mar;23(3):298-302.

<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834ee2b1>

PubMed PMID: 22156795.

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Anticancer Drugs. 2012 Mar;23(3):298-302.

<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834ee2b1>

PubMed PMID: 22156795.

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Anticancer Drugs. 2012 Mar;23(3):298-302.

<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834ee2b1>

PubMed PMID: 22156795.

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Anticancer Drugs. 2012 Mar;23(3):298-302.

<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834ee2b1>

PubMed PMID: 22156795.

Sorafenib, but not Sunitinib induces regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, van Lessen A, Singh A, Hopfenmueller W, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Anticancer Drugs. 2012 Mar;23(3):298-302.

<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834ee2b1>

PubMed PMID: 22156795.

3.2.3. Myeloische Suppressorzellen im peripheren Blut: Optimierte Quantifizierung bei gesunden Spender(inne)n und Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J. Immunology Letters 2015, 168; 260-267.

Zusammenfassung

Tumor-induzierte MDSC führen zu verringerter Antitumor-Immunität und wurden beim mRCC mit schlechterer Prognose assoziiert. Bisher hat die Phänotypisierung von MDSC heterogene Populationen monozytärer und granulozytärer Differenzierung gezeigt. Zielsetzung dieser Untersuchung war es, die diffizile Quantifizierung sehr kleiner MDSC-Populationen zu optimieren. Daher wurden unterschiedliche Zell-Präparations-Techniken und ihr Einfluss auf die MDSC-Zahl bei gesunden Spender(inne)n untersucht. Folgendes wurde untersucht: (1) Analyse im peripheren Voll-Blut versus in PBMC und (2) die sofortige Analyse versus Analyse 1 Tag nach Blutentnahme. Schließlich wurde die optimierte Methode bei 15 mRCC-Patient(inn)en während einer TKI-Therapie angewendet. Als optimale Methode der MDSC-Bestimmung konnte die sofortige Analyse aus peripherem Voll-Blut gezeigt werden, es ergab sich kein Unterschied zwischen der Analyse aus peripherem Blut und PBMC. Als substantielle Fehlerquelle konnte jedoch die spätere Analyse (1 Tag nach Blutentnahme) identifiziert werden.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma.

Flörcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J.

Immunol Lett. 2015 Dec;168(2):260-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.10.001>

Epub 2015 Oct 14. PubMed PMID: 26462434.

3.2.4. Immunmodulatorische Moleküle beim metastasierten Nierenzell-Karzinom: CD80 und CD86 werden auf Tumorzellen exprimiert

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 2017;10(2):1443-1454.

Zusammenfassung

Auch im Zeitalter der zielgerichteten Substanzen erschwert eine Tumor-induzierte Immunsuppression die Therapie und innovative Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren werden zunehmend in die Therapie integriert. Zum besseren Verständnis einer zugrundeliegenden Immunsuppression und des Therapieansprechens wurde die vorliegende Untersuchung initiiert. Mittels Immunhistochemie wurden in RCC-Tumorgewebe unterschiedliche Moleküle untersucht, die immunologisch relevant sind: HIF-1- α , VEGFR-1, FOXP3, TGF- β 1, CD80, CD86, PD-1 und PD-L1. Bei dieser Untersuchung wurde Tumorgewebe verschiedener Patient(inn)en-Subgruppen (Ansprechen vs. kein Ansprechen auf Therapie) verglichen. Interessanterweise konnte eine „low-level“ CD80- und CD86-Expression auf RCC-Gewebe nachgewiesen werden. Diese Beobachtung konnte durch Nachweis einer CD86-Expression auf RCC-Tumorzell-Linien bestätigt werden. Nach unserem besten Wissen stellt diese Untersuchung die Erstbeschreibung einer CD80- und CD86-Expression auf Nierenzell-Karzinom-Gewebe dar und ist möglicherweise Ausdruck eines immunmodulatorischen Mechanismus des Tumors.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K.

Int J Clin Exp Pathol 2017;10(2):1443-1454.

4. Diskussion

Trotz der Einführung moderner zielgerichteter Substanzen bleibt die Therapie des metastasierten Nierenzell-Karzinoms eine Herausforderung. Die bisher zugelassenen zielgerichteten Substanzen beim mRCC beinhalten vor allem Anti-VEGF-gerichtete Substanzen sowie mTOR-Inhibitoren. Obwohl diese Medikamente die Therapie für mRCC-Patient(inn)en deutlich verbessert haben, sind komplette Remissionen selten und die Therapiestrategien im metastasierten Stadium bleiben meist bisher palliative Ansätze [85, 86]. Zusätzlich können therapieassoziierte Nebenwirkungen sehr einschränkend für die betroffenen Patient(inn)en sein und die Lebensqualität beeinflussen. Daher besteht weiterhin die Rationale, innovative immuntherapeutische Strategien zu entwickeln, zudem das Nierenzell-Karzinom neben dem malignen Melanom als klassischer „immunresponsiver“ Tumor gilt.

4.1. Induktion von Antitumorimmunität bei Patient(inn)en mit metastasiertem Nierenzell-Karzinom

Zum Zeitpunkt der Durchführung der beschriebenen Tumorstimmungs-Studien (Originalarbeiten 1+2) standen moderne zielgerichtete Therapieoptionen für den klinischen Einsatz noch nicht zur Verfügung, lediglich unspezifische Immuntherapien wie Zytokine waren einsetzbar. Doch auch im Zeitalter der zielgerichteten Therapien sind klinische Situationen denkbar, in denen Tumorstimmungen eine Rolle spielen könnten: so z.B. bei minimaler Resterkrankung nach erfolgreicher systemischer Therapie oder Operation [72]. Auch die Kombination von Tumorstimmungsstrategien mit zielgerichteten Substanzen ist in präklinischen Modellen eingesetzt worden und konnte relevante Anti-Tumor-Immunantworten auslösen [87-89].

In der vorliegenden Phase I/II-Studie bei mRCC-Patient(inn)en mit einer Tumorstimmung aus allogenen, partiell HLA-gematchten dendritischen Zellen, beladen mit autologem

Tumorlysat, konnten die Sicherheit und die Machbarkeit demonstriert werden, jedoch kein relevantes klinisches Ansprechen beobachtet werden. Allerdings wurde bei 3 von 7 Patient(inn)en eine TH1-polarisierte Immunantwort gegen RCC-assoziierte Tumorantigene beobachtet. Insgesamt scheint der Einsatz der beschriebenen Tumorzell-Vakzinierung nicht geeignet zu sein, adäquate bzw. klinisch relevante tumorspezifische T-Zell-Antworten zu induzieren. Zwar konnten Antworten gegen RCC-assoziierte Tumorantigene nachgewiesen werden, aber diese Immunantworten korrelierten nicht mit relevantem klinischen Ansprechen der metastasierten Tumorerkrankung, so dass davon auszugehen ist, dass die gemessenen T-Zell-Antworten nicht als verlässlicher Surrogatmarker einer klinisch relevanten Immunantwort gelten können [90]. Es ist wahrscheinlich, dass die Vakzine durch zu wenig immunogene oder zu wenig immunologisch relevante Zielantigene keine ausreichende Immunogenität besaß. Diese Annahmen werden durch folgende Beobachtungen unterstützt: Im Verlauf der Studie durchgeführte Proliferationsassays zeigten keinen adäquaten Anstieg auf Stimulation mit Tumorlysat-beladenen DC und bei 4 von 7 Patient(inn)en konnten vermehrte regulatorische T- Zellen beobachtet werden. Dennoch wurden bei einigen Patient(inn)en– insbesondere bei denen mit Peptid-spezifischer T-Zell-Antwort und „delayed type hypersensitivity“ (DTH)-Hautreaktion- lange TTP-Zeiten beobachtet. Hier konnte jedoch aufgrund der kleinen Patientenzahl keine klare Korrelation etabliert werden. Zusätzlich wurde bei einer Patientin eine (oligo-)klonale T-Zell-Antwort nachgewiesen. Dennoch bleibt anzumerken, dass neben regulatorischen Schwierigkeiten bei der Gewinnung und Verarbeitung autologen Tumormaterials die TAA-Quelle schlecht definiert bleibt. Daher scheint die Verwendung von klar definierten allogenen, modifizierten Vakzinen wie z.B. RCC-26/IL-7/B7.1 und RCC-26/IL-2/B7.1 (siehe Originalarbeit 2 + [61]) zukunftssträchtiger und praktikabler, da diese sowohl eine allogene Stimulation bieten, als auch ein klar definiertes

Antigen-Profil aufweisen können. In unserer Gruppe wurde daher zusätzlich das Konzept der Tumorstabilisierung mit allogenen, Gen-modifizierten (IL-7/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen in einer Phase I-Studie untersucht. In dieser Studie konnte die Sicherheit und Durchführbarkeit dieser Strategie gezeigt werden und bei 5 von 10 Patient(inn)en wurde eine Krankheitsstabilisierung mit einer medianen Zeit zur Progression von 18 Wochen erreicht. Jedoch konnten auch hier nur wenige TH1-polarisierte Immunantworten nachgewiesen werden, die Immunantworten zeigten wiederum ein TH2-Profil mit gesteigerter IL-10-Sekretion. Eine mögliche Erklärung für die fehlende klinische Effektivität der Vakzine ist eine schwere zugrundeliegende Tumor-induzierte Immunsuppression, welche weiterhin eine schwere Hürde für aktive immuntherapeutische Strategien darstellt (reviewed in [91-93]). Hier sind neuere Erkenntnisse aus dem Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren hoch interessant: Definierte Schlüsselstellen des Immunsystems wie CTLA-4 und PD-1 hemmen nach vorheriger T-Zell-Aktivierung überschießende T-Zell-Antworten [33, 80]. Die Inhibition von CTLA-4 führt zu T-Zell-Reaktivierung via gesteigerter Kostimulation durch CD28 [33, 80-83]. Durch medikamentöse PD-1-Inhibition wird die immunsuppressive Interaktion mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 gehemmt [33] und eine Reaktivierung der T-Zell-Funktion erreicht [26, 77, 79]. Diese reaktivierten T-Zellen scheinen sich in der Folge insbesondere gegen vermehrte Neo-Antigene zu richten, die durch eine hohe Frequenz von somatischen Mutationen verursacht werden [54]. Diese Annahme wurde insbesondere durch Beobachtungen bei einer Patienten-Subgruppe mit kolorektalem Karzinom (mCRC) unterstützt: Es wurde gezeigt, dass eine PD-1-Blockade bei einer definierten Subgruppe von mCRC-Patient(inn)en, nämlich denjenigen mit defizientem Mismatch-Repair-Status, deutlich bessere klinische Wirksamkeit zeigte, als bei Patient(inn)en mit normalen Mismatch-Repair-Status [94]. Auch hier besteht die Annahme, dass der defiziente Mismatch-Repair-Status zu vermehrten Mutationen und

somit zu Neo-Antigenen führt. Dadurch kann ein besseres Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren erklärt werden [95-97]. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass auch bei einer Reihe von anderen Tumoren die Frequenz von somatischen Mutationen und das Konzept von Neo-Antigenen eine signifikante Rolle spielt. Auch Nierenzell-Karzinome zeigen eine relativ hohe Frequenz von somatischen Mutationen [54] und es wurde nachgewiesen, dass Nierenzell-Karzinome eine relevante Expression von PD-1 und PD-L1 aufweisen und die PD-L1-Expression teilweise mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist [80, 98-103]. Daher ist anzunehmen, dass die hohe Frequenz von somatischen Mutationen auch beim Nierenzell-Karzinom zu vermehrten Neo-Antigenen führt, die ein Ansprechen auf immuntherapeutische Strategien unterstützen. Dieser Theorie folgend wäre eine zusätzliche bzw. gleichzeitige Gabe von Checkpoint-Inhibitoren mit z.B. einer Tumorzellvakzinierung sinnvoll [104]. Sollten zukünftig ein geeignetes Tumor-spezifisches Antigen oder charakteristische, ggf. auch Patientenspezifische somatische Mutationen beim Nierenzell-Karzinom identifiziert werden, wären auch adoptive T-Zell-Strategien einsetzbar.

4.2. Tumor-induzierte Immunsuppression

Um die limitierte klinische Effektivität der beschriebenen Vakzinierungsstrategien (Originalarbeiten 1+2) und die beobachtete Tumor-induzierte Immunsuppression besser zu verstehen, wurden GEP an PBMC der therapierten mRCC-Patient(inn)en vor und nach Vakzinierung mit allogenen, Gen-modifizierten (IL-7/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen durchgeführt (Originalarbeit 3). Die PBMC wurden auf Gensignaturen untersucht, die immunologisch relevant sind und mit Antigenpräsentation, T-zellulärer Immunantwort, Zytokinen/Chemokinen und Signalwegen/Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Vor der Vakzinierung war bei mRCC-Patient(inn)en versus Normalkontrollen eine deutliche Herunterregulation von multiplen Gensignaturen aus diesen immunologisch relevanten

Kategorien erkennbar. Es konnte so eine schwerwiegende systemische Tumor-induzierte Immunsuppression in diesem mRCC-Patientenkollektiv gezeigt werden. Besonders auffällig war eine schwere Einschränkung des NF- κ B-Signalwegs. Dieser Signalweg ist im Kontext von Immuntherapien zunehmend in den Fokus getreten, seit gezeigt werden konnte, dass er erhebliche Relevanz für die Regulation der T-Zell-Aktivierung hat und dass reduzierte NF- κ B-Aktivierung mit T-Zell-Anergie assoziiert ist [105]. Die in GEP nachgewiesene Einschränkung des NF- κ B-Signalwegs konnte mittels Western Blot-Analysen und einem mechanistischem Modell bestätigt werden: PBMC gesunder Spender(innen) wurden in vitro mit RCC26-IL-7/CD80-Tumorzellen stimuliert. Unter zusätzlicher Gabe des hoch-selektiven NF- κ B-Inhibitors MLN120B [106-108] war eine deutliche eingeschränkte Proliferation im ³H-Thymidin-Proliferationsassay sowie eine verminderte Zytokinsekretion zu beobachten. Die Ursache der Herunterregulation von NF- κ B ist bisher weitgehend unklar [109-111]. Jedoch gibt es in diesem Zusammenhang interessante Ergebnisse. Neben eingeschränktem Signaling über TCR und kostimulatorische Moleküle werden lösliche, vom Tumor sezernierte Substanzen für die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs verantwortlich gemacht [112, 113]. Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtung unterstützt, dass der NF- κ B-Signalweg nach Resektion des Tumors besser aktiviert werden kann [114] und somit eine zugrundeliegende Immunsuppression auch durch eine große Tumorlast mitverursacht wird [71]. Die Vakzinierung mit allogenen, Gen-modifizierten (IL-7/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen führte zu einer Abschwächung der vorbestehenden Immunsuppression (insoweit sie durch GEP gemessen wurde), jedoch gelang es durch die Vakzinierung nicht, eine TH1-Immunantwort zu induzieren, vielmehr war eine deutliche TH2-Polarisierung zu beobachten. Als wahrscheinliche Ursache konnte eine verstärkte IL-10-Sekretion identifiziert werden, die sowohl auf Proteinebene (Originalarbeit 2) als auch mittels GEP nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend ist dies eine der

wenigen Analysen, die GEP zum Monitoring und weiteren Verständnis einer therapeutischen Tumorstimmulierung nutzt [115, 116]. Frühere Analysen konnten mittels GEP bereits veränderte Genexpressionsprofile bei mRCC- Patient(inn)en demonstrieren [117-120] sowie prädiktiv aussagekräftige Gensignaturen beim mRCC herausarbeiten [119, 121, 122]. Die Assoziation einer Tumor-induzierten Immunsuppression mit dem NF- κ B-Signalweg und der Einfluss einer Tumorstimmulierung sind jedoch bisher nicht beschrieben worden. So ist zu schlussfolgern, dass GEP ein wertvolles Instrument zur Prädiktion von Immunsuppression und zum Monitoring von Immunantworten bei Immuntherapien sein könnte.

Zum weiteren Verständnis der limitierten Effektivität der allogenen, Gen-modifizierten Vakzine (RCC-26/IL-7/CD80) wurden PD-L1 Serumlevel bei Studien-Patient(inn)en und Normalkontrollen analysiert [Flörcken, Manuskript in Vorbereitung]. Diese Werte wurden mit klinischen und immunologischen Verlaufsparemtern korreliert. Bei Patient(inn)en vor Vakzination konnten im Vergleich zu den Normalkontrollen deutlich erhöhte PD-L1-Serumlevel gemessen werden. Interessanterweise wurde im Verlauf der Vakzination eine Reduktion der PD-L1-Serumlevel beobachtet, diese Reduktion der PD-L1-Werte schien zusätzlich mit einem längeren PFS zu korrelieren. Allerdings waren diese Tendenzen aufgrund der geringen Patient(inn)enzahl nicht signifikant. Eine Reduktion der PD-L1-Werte in den Normbereich konnte nicht erreicht werden. Dieses deckt sich mit unseren bisherigen Beobachtungen, die gezeigt haben, dass die Vakzination (RCC-26/IL-7/CD80) keine ausreichende Effektivität besitzt, eine schwere zugrundeliegende Immunsuppression umzukehren (Originalarbeit 2).

Um die Rolle inhibitorischer Moleküle noch besser zu verstehen, wurden immunmodulatorische Marker mittels Immunhistochemie bei verschiedenen Subgruppen von mRCC-Patient(inn)en analysiert (Originalarbeit 6). Interessanterweise konnte hier erstmals

eine geringgradige Expression von CD80 und CD86 auf Nierenzell-Karzinom-Gewebe nachgewiesen werden. Diese Beobachtung konnte durch Nachweis einer CD86-Expression auf RCC-Tumorzell-Linien unterstützt werden. Die Expression von CD80 und CD86 ist auf unterschiedlichen Tumorgeweben und Tumor-infiltrierenden Lymphozyten beschrieben, nach unserem besten Wissen stellt unsere Analyse jedoch die Erstbeschreibung einer CD80/CD86-Expression auf RCC-Gewebe dar [123-131]. Es bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen, ob es sich bei dieser Beobachtung um einen inhibitorischen oder immunstimulatorischen Mechanismus handelt. Unsere Analyse zeigt jedoch eine „low-level“ Expression von CD80 und CD86. Hierbei handelt es sich möglicherweise- im Gegensatz zu starker CD80-Expression- um einen CTLA-4-vermittelten „Immune-Escape“-Mechanismus [132]. Dieser könnte von hoher Relevanz für Planung und Monitoring zukünftiger Immuntherapien sein.

Immunmodulatorische Wirkung lässt sich auch bei modernen zielgerichteten Substanzen (z.B. Anti-VEGF-gerichteten TKI) neben ihrer eigentlichen antiproliferativen und Angiogenese-hemmenden Funktion nachweisen [133, 134]. Dieses ist einerseits dadurch zu erklären, dass VEGF-Rezeptoren unverzichtbar sind für suppressiv-wirkende Tumor-infiltrierende Zellen, z.B. MDSC oder Makrophagen [135, 136]. Andererseits konnte unsere Gruppe (neben anderen) zeigen, dass TKI einen direkten Effekt auf suppressiv wirkende Immuneffektorzellen, wie z.B. Treg und MDSC haben [74, 75, 137-139]. In der vorliegenden Arbeit (Originalarbeit 4) wurde analysiert, welchen Einfluss die Therapie mit Sorafenib oder Sunitinib auf Treg im peripheren Blut bei mRCC-Patient(inn)en hat. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Einnahme von Sorafenib im ersten Therapiemonat zu einem signifikanten und persistierenden Anstieg von FOXP3+CD3+CD4+CD25+ Treg führte. Die Analyse der Treg-Zahlen sowie der Ratio aus FoxP3+ versus FoxP3- Zellen (innerhalb der CD3+CD4+CD25+ Zellen) konnte zeigen, dass dieser Effekt nicht lediglich auf veränderte CD4-Zahlen zurückzuführen war. Auch konnte ausgeschlossen

werden, dass es relevante Unterschiede in den untersuchten Patientengruppen gab. Die immunmodulatorische Wirkung von Sorafenib ist nicht letztendlich geklärt: Die Sorafenib-vermittelte Hemmung der Raf-Kinase könnte eine Rolle spielen, hier wurde jedoch gezeigt, dass Raf-Signaling für die Treg-Differenzierung benötigt wird und eine Hemmung der Raf-Kinase zu reduzierten Treg-Zahlen führt [140]. Die vermehrte immunsuppressive Wirkung von Sorafenib ist also möglicherweise auf andere Mechanismen zurückzuführen: Es ist bekannt, dass Sorafenib einen hemmenden Effekt auf die Ausreifung und Antigenpräsentation von DC hat, so dass vermutet werden kann, dass der beobachtete Anstieg von Treg DC-vermittelt sein könnte [141]. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen gibt es auch Analysen, die zwar unter Sorafenib einen Anstieg von Treg im peripheren Blut, jedoch gleichzeitig eine Reduktion von Treg im Tumor zeigten [138]. Während einer Therapie mit Sunitinib war in unserem Patientenkollektiv keine Veränderung der Treg-Zahlen erkennbar. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten, die eine Reduktion der Treg-Zahlen nach Gabe von Sunitinib gezeigt haben [74, 137]. Hier ist es möglich, dass Unterschiede in den Patientenkollektiven eine Rolle gespielt haben: In dem von Finke et al. beschriebenen Kollektiv waren die Treg-Zahlen vor Therapie deutlich höher als in unserer Patientengruppe. Somit könnte ein inhibitorischer Effekt von Sunitinib auf Treg in dieser Patientengruppe deutlich ausgeprägter gewesen sein [74]. Zusätzlich ist bekannt, dass Sunitinib zu einer Reduktion von MDSC im peripheren Blut von mRCC- Patient(inn)en führt. Dies korrelierte jedoch nicht mit einer Verbesserung des klinischen Verlaufs und konnte nicht für Tumor-infiltrierende MDSC gezeigt werden [75, 139]. Erste Analysen zu den TKI der zweiten Generation konnten ebenfalls immunmodulatorische Wirkung nachweisen. Im murinen Modell konnte gezeigt werden, dass Axitinib die Akkumulation von MDSC hemmt [142]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Axitinib den Phänotyp und die Funktion dendritischer Zellen verändert bzw. inhibiert, die Proliferation

von T Zellen sowie den NF- κ B-Signalweg hemmt [143, 144]. Eine signifikante Reduktion von Treg nach Gabe von Axitinib konnte bisher nicht gezeigt werden [144]. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die beschriebenen immunmodulatorischen Effekte von TKI für zukünftige therapeutische Strategien, insbesondere für das Design von Kombinationstherapien von großer Bedeutung sind. Zusätzlich war die Analyse von MDSC in der Literatur mit sehr heterogener Methodik beschrieben. Daher entschieden wir uns, die vorher wenig definierte und heterogene Analyse von MDSC bei mRCC-Patient(inn)en zu optimieren und mögliche Einflussfaktoren auf die Analyse zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die optimale Methode der MDSC-Bestimmung die sofortige Analyse aus peripherem Blut ist, während die Bestimmungen aus peripherem Voll-Blut und aus PBMC als gleichwertig gelten können, sofern eine sofortige Analyse direkt nach der Blutentnahme stattfindet (Originalarbeit 5) [145, 146]. Auch in unserem Kollektiv (15 mRCC-Patient(inn)en) konnte ein Einfluss von TKI auf die Zahl von MDSC gezeigt werden: Sunitinib führte zu einer Reduktion monozytärer MDSC im peripheren Blut von mRCC-Patient(inn)en, nach Sorafenib konnte keine wesentliche Veränderung in der MDSC-Zahl beobachtet werden. Der Einfluss zielgerichteter Substanzen bleibt dennoch unzureichend untersucht und aufgrund heterogener Ergebnisse nicht ausreichend verstanden. Es ist jedoch klar gezeigt, dass ihre Wirkung sich nicht auf direkte antiproliferative oder Anti-Angiogenese-Effekte beschränkt, sondern dass immunmodulatorische Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen. Insbesondere Treg und MDSC sind zentrale Effektoren einer relevanten Toleranzentwicklung bei Tumorpatient(inn)en und tragen zu erheblichen Resistenzen gegen Anti-VEGF-gerichtete Therapien bei [147-150]. Daher ist es entscheidend, diese Immuneffektorzellen exakt identifizieren und quantifizieren zu können, um moderne Therapien mit zielgerichteten Substanzen und Checkpoint-Inhibitoren zu steuern. Auch für kommende Kombinationstherapien könnte dies zunehmend

relevant werden. Erste Ansätze, Sunitinib mit Vakzinierungsstrategien zu kombinieren, ergaben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der immunmodulatorischen Kapazitäten [89, 134]. In einer ersten klinischen Studie konnte jedoch Sicherheit und Durchführbarkeit der Kombination von Sunitinib mit einer DC-basierten Tumorstimmung bei mRCC-Patient(inn)en gezeigt werden [76].

Zusammenfassend tragen die hier gezeigten Arbeiten entscheidend zur Klärung der Limitationen von Vakzinierungsstrategien bei mRCC-Patient(inn)en bei. Zusätzlich erweitern sie die Grundlagen zur Identifikation Tumor-induzierter immunsuppressiver Mechanismen und zur Analyse des Einflusses von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf Immuneffektorzellen.

5. Zusammenfassung

Das metastasierte Nierenzell-Karzinom ist eine Modellerkrankung für Immuntherapien. Innovative immuntherapeutische Strategien wie z.B. Checkpoint-Inhibitoren werden hier zunehmend in die Therapie integriert. Diese Arbeit trägt maßgeblich zur Klärung der Limitationen von Tumorzellvaksinierungsstrategien bei und untersucht immunsuppressive Mechanismen beim metastasierten Nierenzell-Karzinom.

Ein wichtiger Fokus dieser Arbeit waren zwei Tumorzellvaksinierungs-Studien: In einer Phase I/II-Studie mit allogenen, partiell HLA-gematchten dendritischen Zellen, die mit autologem Tumorzelllysate beladen waren, konnte Sicherheit und Durchführbarkeit gezeigt werden (Originalarbeit 1). In einer zweiten Phase I-Studie mit allogenen, Gen-modifizierten (IL-7/CD80-kotransfizierten) Tumorzellen wurde ebenfalls Sicherheit und Durchführbarkeit nachgewiesen (Originalarbeit 2). In beiden Studien wurde ein umfangreiches Immunmonitoring zum besseren Verständnis einer zugrundeliegenden Immunsuppression und der Vakzine-induzierten Immunantworten durchgeführt.

Dabei konnte mittels Genexpressionsanalysen aus peripherem Blut der behandelten Patient(inn)en eine Suppression wichtiger immunologischer Gen-Signaturen sowie eine Assoziation der beobachteten Tumor-induzierten Immunsuppression zum NF- κ B-Signalweg gezeigt werden (Originalarbeit 3).

Zum besseren Verständnis der immunmodulatorischen Effekte systemischer Therapie konnte schließlich nachgewiesen werden, dass sowohl Sunitinib als auch Sorafenib Immuneffektorzellen wie z.B. Treg und MDSC beeinflussen (Originalarbeiten 4+5).

Mittels immunhistochemischer Analysen an Tumorgewebeproben unterschiedlicher mRCC-Subgruppen konnte erstmalig eine „low-level“ CD80- und CD86-Expression beim Nierenzell-

Karzinom nachgewiesen werden, die möglicherweise ein weiter zu definierendes „Immune Escape“-Phänomen darstellt (Originalarbeit 6).

Insgesamt tragen die hier zusammengefassten Arbeiten zu einem besseren Verständnis der Tumor-induzierten Immunsuppression und deren Effektormechanismen bei.

6. Literaturangaben

1. Robert-Koch-Institut (Hrsg.), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), *Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe*. 2015.
2. Delahunt, B., et al., *International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on renal neoplasia: rationale and organization*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(10): p. 1463-8.
3. Decker, H.J., *Hereditäre Nierentumore*. medgen, 2007. **19**(2): p. 239-244.
4. Decker, H.J., *Von-Hippel-Lindau-Syndrom*. medgen, 2006. **18**(4): p. 355.
5. Gossage, L., T. Eisen, and E.R. Maher, *VHL, the story of a tumour suppressor gene*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 55-64.
6. Latif, F., et al., *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1317-20.
7. Foster, K., 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**(12): p. 2169-73.
8. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.0, 2015, AWMF Registernummer: 043/017OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am: 18.06.2016)*, 2015.
9. Buti, S., et al., *Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review*. Anticancer Drugs, 2013. **24**(6): p. 535-54.
10. Coppin, C., et al., *Immunotherapy for advanced renal cell cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. CD001425.
11. Yang, J.C., et al., *Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(16): p. 3127-32.
12. McDermott, D.F., 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**(1): p. 133-41.
13. Flanigan, R.C., 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**(23): p. 1655-9.
14. Mickisch, G.H., et al., *Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial*. Lancet, 2001. **358**(9286): p. 966-70.
15. Hudes, G., et al., *Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(22): p. 2271-81.
16. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115-24.
17. Escudier, B., et al., *Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial*. Lancet, 2007. **370**(9605): p. 2103-11.
18. Rini, B.I., et al., *Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5422-8.
19. Escudier, B., et al., *Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(20): p. 3312-8.
20. Sternberg, C.N., et al., *Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial*. J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 1061-8.
21. Motzer, R.J., L. McCann, and K. Deen, *Pazopanib versus sunitinib in renal cancer*. N Engl J Med, 2013. **369**(20): p. 1970.
22. Motzer, R.J., et al., *Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. 552-62.
23. Escudier, B., et al., *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 125-34.

24. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(19): p. 1814-23.
25. Choueiri, T.K., et al., *Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016.
26. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial*. J Clin Oncol, 2015. **33**(13): p. 1430-7.
27. Motzer, R.J., et al., *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9637): p. 449-56.
28. Motzer, R.J., et al., *Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(15): p. 1473-82.
29. Motzer, R.J., et al., *Dovitinib versus sorafenib for third-line targeted treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma: an open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(3): p. 286-96.
30. Motzer, R.J., et al., *Phase II randomized trial comparing sequential first-line everolimus and second-line sunitinib versus first-line sunitinib and second-line everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2014. **32**(25): p. 2765-72.
31. Eichelberg, C., et al., *SWITCH: A Randomised, Sequential, Open-label Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Sorafenib-sunitinib Versus Sunitinib-sorafenib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Cancer*. Eur Urol, 2015. **68**(5): p. 837-47.
32. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
33. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
34. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-98.
35. Rosenberg, S.A., *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 281-7.
36. Steinman RM, C.Z., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
37. Banchereau J, S.R., *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
38. Banchereau J, S.-T.B., Palucka AK, Schuler G., *Dendritic cells as vectors for therapy*. Cell, 2001. **106**(3): p. 271-4.
39. Greenberg, P.D., *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells*. Adv Immunol, 1991. **49**: p. 281-355.
40. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
41. Maeurer, M.J., et al., *Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen*. J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1633-41.
42. Johnsen, A.K., et al., *Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4224-31.
43. Butterfield, L.H., *Cancer vaccines*. BMJ, 2015. **350**: p. h988.
44. Melief, C.J., et al., *Therapeutic cancer vaccines*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3401-12.
45. Rosenberg, S.A., *IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer*. J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5451-8.
46. Gharwan, H. and H. Groninger, *Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2015.
47. Batlevi, C.L., et al., *Novel immunotherapies in lymphoid malignancies*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(1): p. 25-40.

48. Bonini, C. and A. Mondino, *Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells.* Eur J Immunol, 2015. **45**(9): p. 2457-69.
49. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.* Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
50. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
51. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy.* J Immunother, 2013. **36**(2): p. 133-51.
52. Robbins, P.F., et al., *A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(5): p. 1019-27.
53. Blankenstein, T., et al., *Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy.* Curr Opin Immunol, 2015. **33**: p. 112-9.
54. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes.* Nature, 2013. **499**(7457): p. 214-8.
55. Galluzzi, L., et al., *Classification of current anticancer immunotherapies.* Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.
56. Janzen NK, K.H., Figlin RA, Belldegrun AS, *Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease.* Urol Clin North Am, 2003. **30**(4): p. 843-52.
57. Fournier P, S.V., *Randomized clinical studies of anti-tumor vaccination: state of the art in 2008.* Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(1): p. 51-66.
58. Mocellin S, M.S., Bronte V, Lise M, Nitti D. , *Part I: Vaccines for solid tumors.* Lancet Oncol, 2004. **5**: p. 681-689.
59. De Grujil TD, v.d.E.A., Pinedo HM, Scheper RJ. , *Whole-cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines.* . Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**: p. 1569-1577.
60. Pardoll, D., *Cancer vaccines.* Nat Med, 1998. **4**: p. 525-531.
61. Buchner, A., et al., *Phase 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma.* Hum Gene Ther, 2010. **21**(3): p. 285-97.
62. Dannull J, S.Z., Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, , et al., *Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3623-33.
63. Wieriecky J, M.M., Wirths S et al. , *Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cell cancer patients.* . Cancer Res. **66**: p. 5910-5918.
64. Bleumer I, T.D., Oosterwijk-Wakka JC, Voller MC, De Weijer K, Mulders PF, Oosterwijk E., *Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells.* J Immunother, 2007. **30**(1): p. 116-22.
65. Holtl, L., et al., *Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3369-76.
66. Marten A, F.D., Renoth S, *Therapeutic vaccination against renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial.* . Cancer Immunol Immunother, 2002. **2002**(51): p. 637-644.
67. Kim, J.H., et al., *Phase I/II study of immunotherapy using autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma.* Clin Immunol, 2007. **125**(3): p. 257-67.
68. Avigan, D.E., et al., *Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma.* J Immunother, 2007. **30**(7): p. 749-61.

69. Barbuto, J.A., et al., *Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(12): p. 1111-8.
70. Avigan D, V.B., Gong J et al. , *Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical response*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**: p. 4699-4708.
71. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
72. Sobol, R., *The rationale for prophylactic cancer vaccines and need for a paradigm shift*. *Cancer Gene Ther*, 2006. **13**: p. 725-731.
73. Hodge, J.W., et al., *The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors*. *Semin Oncol*, 2012. **39**(3): p. 323-39.
74. Finke, J.H., et al., *Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(20): p. 6674-82.
75. Ko, J.S., et al., *Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(6): p. 2148-57.
76. Matsushita, H., et al., *A pilot study of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination combined with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma*. *J Immunother Cancer*, 2014. **2**: p. 30.
77. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
78. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
79. Motzer, R.J., et al., *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2015.
80. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 450-61.
81. Chambers, C.A., et al., *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 565-94.
82. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. *Science*, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
83. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 233-58.
84. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. *Int Immunol*, 2007. **19**(7): p. 813-24.
85. Kroeger, N., et al., *Metastatic non-clear cell renal cell carcinoma treated with targeted therapy agents: characterization of survival outcome and application of the International mRCC Database Consortium criteria*. *Cancer*, 2013. **119**(16): p. 2999-3006.
86. Soerensen, A.V., et al., *Improved overall survival after implementation of targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results from the Danish Renal Cancer Group (DARENCA) study-2*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(3): p. 553-62.
87. Draghiciu, O., et al., *A rationally designed combined treatment with an alphavirus-based cancer vaccine, sunitinib and low-dose tumor irradiation completely blocks tumor development*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(10): p. e1029699.
88. Draghiciu, O., et al., *Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(3): p. e989764.
89. Jaini, R., et al., *Combination of sunitinib with anti-tumor vaccination inhibits T cell priming and requires careful scheduling to achieve productive immunotherapy*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(7): p. 1695-705.
90. Malyguine, A.M., S.L. Strobl, and M.R. Shurin, *Immunological monitoring of the tumor immunoenvironment for clinical trials*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(2): p. 239-47.
91. Mocellin, S., et al., *Part I: Vaccines for solid tumours*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(11): p. 681-9.

92. de Gruijl, T.D., et al., *Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(10): p. 1569-77.
93. Fournier, P. and V. Schirmacher, *Randomized clinical studies of anti-tumor vaccination: state of the art in 2008*. *Expert Rev Vaccines*, 2009. **8**(1): p. 51-66.
94. Le, D.T., et al., *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(26): p. 2509-20.
95. Segal, N.H., et al., *Epitope landscape in breast and colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(3): p. 889-92.
96. Timmermann, B., et al., *Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15661.
97. Llosa, N.J., et al., *The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(1): p. 43-51.
98. Thompson, R.H., H. Dong, and E.D. Kwon, *Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 709s-715s.
99. Thompson, R.H., et al., *Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up*. *Cancer Res*, 2006. **66**(7): p. 3381-5.
100. Choueiri, T.K., et al., *PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(11): p. 2178-84.
101. Shin, S.J., et al., *Clinicopathologic Analysis of PD-L1 and PD-L2 Expression in Renal Cell Carcinoma: Association with Oncogenic Proteins Status*. *Ann Surg Oncol*, 2015.
102. Leite, K.R., et al., *PD-L1 expression in renal cell carcinoma clear cell type is related to unfavorable prognosis*. *Diagn Pathol*, 2015. **10**(1): p. 189.
103. Herbst, R.S., et al., *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 563-7.
104. Intlekofer, A.M. and C.B. Thompson, *At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy*. *J Leukoc Biol*, 2013. **94**(1): p. 25-39.
105. Sun, S.C., J.H. Chang, and J. Jin, *Regulation of nuclear factor-kappaB in autoimmunity*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(6): p. 282-9.
106. Nagashima, K., et al., *Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta*. *Blood*, 2006. **107**(11): p. 4266-73.
107. Nogai, H., et al., *IkappaB-zeta controls the constitutive NF-kappaB target gene network and survival of ABC DLBCL*. *Blood*, 2013. **122**(13): p. 2242-50.
108. Hailfinger, S., et al., *Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(47): p. 19946-51.
109. Li, X., et al., *T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: a preliminary report*. *Cancer Res*, 1994. **54**(20): p. 5424-9.
110. Ling, W., et al., *Impaired activation of NFkappaB in T cells from a subset of renal cell carcinoma patients is mediated by inhibition of phosphorylation and degradation of the inhibitor, IkappaBalpha*. *Blood*, 1998. **92**(4): p. 1334-41.
111. Ng, C.S., et al., *Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NFkappaB suppression*. *Urology*, 2002. **59**(1): p. 9-14.
112. Kolenko, V., et al., *Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas*. *J Immunol*, 1997. **159**(6): p. 3057-67.
113. Miescher, S., et al., *Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes*. *J Immunol*, 1986. **136**(5): p. 1899-907.
114. Uzzo, R.G., et al., *Alterations in NFkappaB activation in T lymphocytes of patients with renal cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(8): p. 718-21.

115. Schwarzer, A., et al., *Regulatory T-cells and associated pathways in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients undergoing DC-vaccination and cytokine-therapy*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46600.
116. Wolf, B., et al., *Gene expression profile of peripheral blood lymphocytes from renal cell carcinoma patients treated with IL-2, interferon-alpha and dendritic cell vaccine*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50221.
117. Zaatar, A.M., et al., *Whole blood transcriptome correlates with treatment response in nasopharyngeal carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 76.
118. Showe, M.K., et al., *Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells can distinguish patients with non-small cell lung cancer from patients with nonmalignant lung disease*. Cancer Res, 2009. **69**(24): p. 9202-10.
119. Twine, N.C., et al., *Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 6069-75.
120. Baine, M.J., et al., *Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17014.
121. Burczynski, M.E., et al., *Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1181-9.
122. Atkins, M.B., et al., *Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 909-18.
123. Agathangelou, A., et al., *Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas with prominent lymphoid stroma. Evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells*. Am J Pathol, 1995. **147**(4): p. 1152-60.
124. Chang, C.S., et al., *Expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules are potential markers for better survival in nasopharyngeal carcinoma*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 88.
125. Pope, B., et al., *B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1274-9.
126. Graf, M., et al., *High expression of costimulatory molecules correlates with low relapse-free survival probability in acute myeloid leukemia (AML)*. Ann Hematol, 2005. **84**(5): p. 287-97.
127. Tamura, H., et al., *Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5708-17.
128. Hersey, P., et al., *Expression of the co-stimulatory molecule B7 on melanoma cells*. Int J Cancer, 1994. **58**(4): p. 527-32.
129. Bernsen, M.R., et al., *On the biological relevance of MHC class II and B7 expression by tumour cells in melanoma metastases*. Br J Cancer, 2003. **88**(3): p. 424-31.
130. Thurnher, M., 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**(5): p. 559-64.
131. Baine, M.K., et al., *Characterization of tumor infiltrating lymphocytes in paired primary and metastatic renal cell carcinoma specimens*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24990-5002.
132. Tirapu, I., et al., *Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2442-50.
133. Farsaci, B., J.P. Higgins, and J.W. Hodge, *Consequence of dose scheduling of sunitinib on host immune response elements and vaccine combination therapy*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1948-59.
134. Bose, A., et al., *Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination*. Int J Cancer, 2011. **129**(9): p. 2158-70.
135. Gabilovich, D., 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**(11): p. 4150-66.

136. Dineen, S.P., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4340-6.
137. Adotevi, O., et al., *A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients*. *J Immunother*, 2010. **33**(9): p. 991-8.
138. Desar, I.M., et al., *Sorafenib reduces the percentage of tumour infiltrating regulatory T cells in renal cell carcinoma patients*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(2): p. 507-12.
139. Ko, J.S., et al., *Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained*. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3526-36.
140. Willoughby, J.E., et al., *Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development*. *J Immunol*, 2007. **179**(10): p. 6836-44.
141. Hipp, M.M., et al., *Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses*. *Blood*, 2008. **111**(12): p. 5610-20.
142. Yuan, H., et al., *Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation*. *Biomed Pharmacother*, 2014. **68**(6): p. 751-6.
143. Heine, A., et al., *The VEGF-Receptor Inhibitor Axitinib Impairs Dendritic Cell Phenotype and Function*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128897.
144. Stehle, F., et al., *Reduced immunosuppressive properties of axitinib in comparison with other tyrosine kinase inhibitors*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(23): p. 16334-47.
145. Duffy, A., et al., *Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies*. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. **62**(2): p. 299-307.
146. Damuzzo, V., et al., *Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014.
147. Serafini, P., et al., *Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(2): p. 64-72.
148. Ochoa, A.C., et al., *Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 2): p. 721s-726s.
149. Gajrlovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 162-74.
150. Finke, J., et al., *MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(7): p. 856-61.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich auf meinem akademischen Weg begleitet haben.

- Zuerst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Jörg Westermann, der mich seit Beginn meiner ärztlichen Arbeit mit großer inhaltlicher Kompetenz, konstruktiver Kritik und viel Loyalität unterstützt hat. Das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Gesprächsbereitschaft waren mir in den letzten Jahren eine sehr große Hilfe.
- Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken für die Möglichkeit, an der Medizinischen Klinik m.S. Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie tätig sein zu dürfen und dafür, exzellente Bedingungen und den nötigen Freiraum für meine klinische Ausbildung und Forschungstätigkeit vorgefunden zu haben.
- Mein Dank gilt allen Kolleg(inn)en meiner Klinik, die mich und meine Projekte immer unterstützt haben und von denen ich viel lernen durfte. Besonders danke ich den Kolleginnen aus dem Labor für Hämatologische Diagnostik.
- Ich bedanke mich bei allen Patient(inn)en sowie deren Angehörigen, die durch ihre Teilnahme an den verschiedenen Projekten meine Arbeit unterstützt haben.
- Vielen Dank an meinen großartigen Freundeskreis für das viele Zuhören, die sehr hilfreichen Korrekturen und die große Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit.
- Der allergrößte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Familie: Sie sind meine wichtigsten Vorbilder und mein größter Rückhalt.

8. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

-weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

-die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

-mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 20.07.2016