

**Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Biomarker bei Immuntherapie: eine nicht-interventionelle klinische
Studie zur Analyse von verschiedenen immunologischen
Serumbiomarkern bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen
Tumorerkrankungen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anne Sophie Brückner

aus Solms/Niederbiehl

Würzburg, Juni 2022

Referent: Prof. Dr. med. V. Kunzmann

Korreferent/in: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Fragestellung | 1 |
| 1.1.1 | Prinzip Immuncheckpoint: Überblick PD-1 und CTLA-4 Signalweg | 1 |
| 1.1.2 | Pathophysiologie unter Tumoreinfluss..... | 3 |
| 1.1.3 | Immuncheckpoint-Inhibition | 4 |
| 1.2 | Chancen für die Tumorthherapie..... | 5 |
| 1.3 | Therapieansprechen messen..... | 5 |
| 1.3.1 | Biomarker für eine prädiktive Aussage über Therapieansprechen . | 5 |
| 1.3.2 | Auswahl von Granzym A/B, Perforin, IFN γ und IL-8 zur Messung.. | 6 |
| 1.3.3 | Granzyme und Perforin..... | 7 |
| 1.3.4 | Interferon γ | 8 |
| 1.3.5 | IL-8 | 8 |
| 2 | Material und Methoden | 9 |
| 2.1 | Studiendesign | 9 |
| 2.2 | Studienablauf | 9 |
| 2.2.1 | Ethikantrag | 9 |
| 2.2.2 | Aufklärung und Einverständnis | 9 |
| 2.2.3 | Blutproben | 10 |
| 2.3 | ELISA-Messungen | 11 |
| 2.3.1 | ELISA-KITs und Zusatzmaterial..... | 11 |
| 2.3.2 | Ablauf | 13 |
| 2.4 | Datenmanagement und statistische Auswertung | 15 |
| 2.4.1 | Zeitlicher Rahmen..... | 15 |
| 2.4.2 | Literaturrecherche..... | 15 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3 | Ergebnisse..... | 16 |
| 3.1 | Patientenkollektiv | 16 |
| 3.1.1 | Tumorentität/Stadium, Vortherapie, Studientherapie und - Ansprechen..... | 16 |
| 3.1.2 | Einteilung Patientenkollektiv | 20 |
| 3.2 | ELISA Messwerte..... | 21 |
| 3.2.1 | Messwerte Gruppe Non-Responder | 26 |
| 3.2.2 | Messwerte Gruppe Responder..... | 27 |
| 3.2.3 | Verlauf Messparameter unter Ausschluss von Patienten mit vorangegangener Antikörpertherapie | 27 |
| 3.2.4 | Zusammenführung Ergebnisse Responder und Non-Responder . | 28 |
| 3.2.5 | Vergleich Messwertverläufe Gruppe Responder und Non- Responder | 30 |
| 3.3 | Korrelation von Baseline-Werten mit dem Überleben | 32 |
| 3.4 | Nebenwirkungen unter Immuntherapie | 34 |
| 4 | Diskussion | 36 |
| 4.1 | Messwerte Gruppe Responder / Non-Responder | 36 |
| 4.1.1 | Granzym A und Perforin | 37 |
| 4.1.2 | Granzym B..... | 37 |
| 4.1.3 | IL-8 | 37 |
| 4.1.4 | Allgemeine Trends..... | 38 |
| 4.2 | Diskussion Korrelation von Baseline-Werten mit dem Überleben | 40 |
| 4.2.1 | Überblick Ergebnisse und Einordnung im Kontext der aktuellen Studienlage..... | 40 |
| 4.2.2 | Granzym B..... | 41 |
| 4.2.3 | Interferon γ | 41 |
| 4.2.4 | Granzym A und Perforin | 42 |

| | | |
|-------|-----------------------------------|----|
| 4.2.5 | IL-8 | 42 |
| 5 | Zusammenfassung | 43 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 45 |
| 7 | Appendix..... | 48 |
| 7.1 | Signifikanzen..... | 48 |
| 7.2 | Dokumente zum Studienablauf | 50 |
| 7.3 | Abkürzungsverzeichnis | 53 |
| 7.4 | Abbildungsverzeichnis..... | 54 |
| 7.5 | Tabellenverzeichnis..... | 55 |

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse von verschiedenen immunologischen Serumbiomarkern bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen unter Immuncheckpoint-Inhibition. Die folgenden Fragestellungen stehen dabei im Mittelpunkt:

- sind Serumspiegel von Mediatoren zytotoxischer T-Zellen (Interferon γ , Perforin, Granzym A/B, Interleukin 8) prädiktiv für das Ansprechen auf eine immunologisch vermittelte Tumorthherapie (Immuncheckpoint-Inhibition)?
- sind Änderungen der Serumspiegel von Mediatoren zytotoxischer T-Zellen (Interferon γ , Perforin, Granzym A/B, Interleukin 8) während einer Therapie prädiktiv für das Ansprechen auf eine immunologisch-vermittelte Tumorthherapie (Immuncheckpoint-Inhibition)?

Ein langfristiges Ziel soll die Etablierung von verlässlichen Biomarkern hinsichtlich Therapieansprechen bzw. -Versagen unter Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren darstellen.

1.1.1 Prinzip Immuncheckpoint: Überblick PD-1 und CTLA-4 Signalweg

Um die Funktion von Immuncheckpoints zu verstehen, muss man sich zu Beginn die Grundzüge der T-Zell-Aktivierung vor Augen führen. T-Zellen werden aktiviert, indem der T-Zell-Rezeptor (TCR) ein Antigen präsentiert bekommt und als körperfremd

erkennt. Dieses wird auf dem Major Histocompatibility Complex (MHC) dargeboten, welcher sich auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) befindet.

Die cytotoxische T-Zelle setzt nun Granula frei, deren Inhalt aus Granzymen und Perforin besteht. Diese cytotoxischen Proteasen lösen in der Zielzelle die Apoptose aus (1).

Die genannten Mechanismen reichen allerdings nicht aus, um eine komplette T-Zell-Aktivierung zu erreichen. Es gibt weitere co-stimulatorische und co-inhibitorische Signalwege, die die T-Zell-Antwort modulieren. Denn eine ungefilterte Aktivierung des Immunsystems kann ebenso schädlich für den Organismus sein, wie eine unzureichende (2). Ob eine T-Zelle also aktiviert oder herabreguliert wird, hängt von diesen zusätzlichen Signalwegen ab, die als sogenannte Immuncheckpoints Kontrollpunkte des Immunsystems darstellen. Bildlich lassen sie sich als eine Art Immunbremse darstellen (3).

Zwei co-inhibitorische Signalwege werden durch cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) und programmed death protein 1 (PD-1) repräsentiert. CTLA-4 stoppt die T-Zell-Aktivierung bereits zu Beginn (4), wohingegen PD-1 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Immunantwort inhibierend wirkt.

Der inhibitorische CTLA-4 Rezeptor konkurriert mit dem stimulatorischen CD28 Rezeptor (beide auf T-Zellen) um den Liganden B7, um die Immunantwort zu modulieren. Dabei zielt CD28 auf eine Aktivierung der T-Zell-Antwort und damit auf eine Hochregulierung des Immunsystems ab. Der CTLA-4 Signalweg wirkt inhibierend auf die Immunantwort (3, 5).

CTLA-4 ist wichtig für die Bewahrung der Homöostase in der Immunantwort. In einer Studie mit CTLA-4 defizienten Mäusen zeigte sich bei den betroffenen Tieren eine Lymphoproliferation, einhergehend mit Pankreatitis und Myokarditis bis hin zum Tod (5).

Das zeigt beispielhaft, dass ein Verlust oder Defekt von inhibitorischen Checkpoints wie CTLA-4 zum Verlust der peripheren Toleranz und somit zu überschießender Autoimmunität führt (6). Ziel ist ein Mittelweg zwischen der Elimination fremder und mutierter Zellen und gleichzeitiger Verhinderung einer Beschädigung körpereigener Zellen durch eine überschießende Immunantwort.

Der co-inhibitorische Immuncheckpoint PD-1 befindet sich als Rezeptor auf der Oberfläche von verschiedenen Immunzellen, PD-L1 und PD-L2, seine Liganden,

dementsprechend auf APCs. Kommt es zu einer Bindung von Rezeptor und Ligand, resultiert das in einer Herabregulierung des Immunsystems. Die Proliferation von Lymphozyten wird gehemmt, ebenso wie die Sekretion von Zytokinen (6, 7).

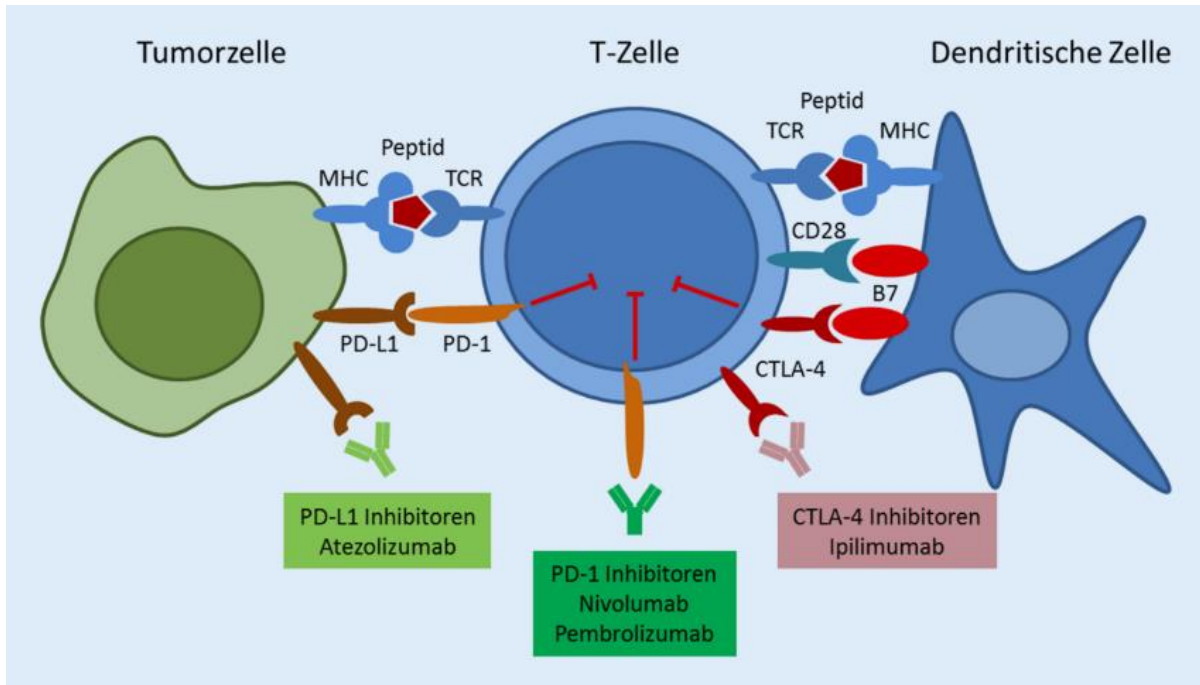


Abb. 1: Darstellung Immuncheckpoint CTLA-4 und PD-1 mit Beispielen von Inhibitoren, aus „Tumorimmuntherapie in der pädiatrischen Onkologie“ (Der Onkologe, 05.01.2021)

Abbildung (Abb.)1 wird mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. med. H. Lode (Universitätsmedizin Greifswald) (8) abgebildet.

1.1.2 Pathophysiologie unter Tumoreinfluss

Viele Tumoren sind imstande, die Immuncheckpoints so zu manipulieren, dass eine effektive Antitumor-Antwort des Immunsystems ausbleibt. Der Begriff, der dieses Verhalten beschreiben soll, ist die sogenannte Immunevasion (9). Durch ihre hohe Teilungsrates mit genetischer Instabilität entstehen Zellen, die weniger immunogen sind, als ihre Vorläuferzellen (9). Zusätzlich erzeugen Tumorzellen eine immunsuppressive Mikroumgebung (10). Durch Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen durch die Tumorzellen selbst, oder Zellen der Mikroumgebung, kann eine adäquate T-Zell-Antwort verhindert werden (9). Die malignen Zellen bleiben unentdeckt und können unter den Augen des Immunsystems weiterwachsen.

1.1.3 Immuncheckpoint-Inhibition

Die Immuncheckpoint-Inhibition stellt einen neuen, vielversprechenden Ansatz in der Therapie von Tumorerkrankungen dar. Durch die Blockade von Immuncheckpoints werden die malignen Zellen nicht direkt angegriffen, stattdessen wird die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen verstärkt (4). Ziel ist es, dem Immunsystem Zugang zu malignen Zellen zu ermöglichen, die vorher durch Immunevasion ungehindert wachsen konnten.

Zur Therapie wurden durch die Food and Drug Administration (FDA) der Vereinigten Staaten bis dato (Stand November 2021) sieben monoklonale Antikörper zugelassen. Im Jahr 2011 erfolgte die Zulassung für Ipilimumab (CTLA-4 Antikörper), gefolgt von Pembrolizumab und Nivolumab im Jahr 2014 (PD-1 Antikörper) und Atezolizumab (PD-L1 Antikörper) in 2016 (2). 2017 kamen Avelumab und Durvalumab hinzu, ebenso PD-L1 Antikörper (11). Zuletzt erfolgte im September 2018 die Zulassung für Cemiplimab, ein PD-1 Antikörper (12). Weitere Antikörper sind in Testung, so zum Beispiel Spartalizumab, ein weiterer PD-1 Antikörper (Phase III study) (13).

Die Aktualität der Thematik wird durch die Vergabe des Nobelpreises im Oktober 2018 unterstrichen. Die Wissenschaftler James P. Allison und Tasuku Honjo wurden für ihre Forschungsarbeit an den Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 ausgezeichnet (3, 14).

Tab. 1: durch die FDA zugelassene Immuncheckpointinhibitoren nach Zulassungsjahr

| Zulassung | | |
|-----------|--------------------------------------|-----------|
| 2011 | Ipilimumab | CTLA-4 AK |
| 2014 | Pembrolizumab, Nivolumab | PD-1 AK |
| 2016 | Atezolizumab | PD-L1 AK |
| 2017 | Avelumab, Durvalumab | PD-L1 AK |
| 2018 | Cemiplimab | PD-1 AK |
| ? | z.B. Spartalizumab (Phase III study) | PD-1 AK |

1.2 Chancen für die Tumorthherapie

Das Prinzip der Immuncheckpoint Inhibition stellt eine große Chance für die Behandlung von Tumorpatienten dar. Die Idee der Therapie besteht darin, das eigene Immunsystem so zielgerichtet zu nutzen, dass es aus eigener Kraft möglichst selektiv maligne Zellen eliminiert, die vorher durch die immunsuppressiven Eigenschaften des Tumors unentdeckt geblieben wären. Immuncheckpoint-Inhibitoren manipulieren die Tumorzelle nicht direkt, sondern erreichen durch die Heraufregulierung des Immunsystems eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort (15). In Kombination mit konventionellen Therapieansätzen wie Chemotherapie kann die Effektivität von Immuncheckpoint-Therapien noch verstärkt werden (16). Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass auch vorgeschaltete Chemotherapie das Therapieansprechen einer Monotherapie von Checkpoint-Inhibitoren positiv beeinflussen kann (17). Im Vergleich zur klassischen Chemotherapie besteht die Hoffnung, eine zielgerichtetere Therapie zu etablieren.

1.3 Therapieansprechen messen

1.3.1 Biomarker für eine prädiktive Aussage über Therapieansprechen

Die Etablierung von prädiktiven Biomarkern hinsichtlich des Ansprechens auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ist zurzeit Gegenstand der Forschung und auf dem Weg hin zu einer personalisierten Medizin unerlässlich. Gelingt es, verlässliche Biomarker zu etablieren, kann dem Patienten eine individuelle Therapie angeboten werden.

Mehrere mögliche Biomarker wurden bereits untersucht.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patienten, deren Tumorzellen PD-L1 exprimieren, besser auf eine PD-1 Blockade ansprechen, als Patienten mit PD-L1 negativen Tumoren. Allerdings gibt es auch Patienten, die trotz PD-L1 Negativität

von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitieren (18). Diese Tatsache mindert die Aussagekraft von PD-L1 Expression als verlässlichen Biomarker erheblich. Hohe Baseline Expression innerhalb des Tumors von FoxP3, Indoleamin 2-3-Dioxygenase und eine steigende Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Therapieverlauf konnten beispielsweise bereits mit einem Ansprechen auf die Therapie mit dem CTLA-Antikörper (AK) Ipilimumab in Verbindung gebracht werden (19). Gibney et al. untersuchten die Immunexpression im Tumorgewebe vor Therapiebeginn, unter anderem von Granzym A und B, Perforin und IFN γ und zeigten eine signifikante Korrelation zwischen dem Therapieansprechen bzw. dem progressionsfreien Überleben und erhöhter Expression der o.g. potentiellen Marker (18).

Interleukin 8 (IL-8) könnte die Rolle eines negativ prognostischen Markers übernehmen. Wie Schalper et. al. zeigten, korrelieren erhöhte Baselinewerte von IL-8 bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung mit einem schlechteren Outcome (20).

1.3.2 Auswahl von Granzym A/B, Perforin, IFN γ und IL-8 zur Messung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Serumspiegel der Mediatoren zytotoxischer T-Zellen Granzym A und B, Perforin (PRF) und Interferon γ (IFN γ) vor und während der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren gemessen. Die Freisetzung dieser proinflammatorischen Zytokine und Zytotoxine stellt einen wichtigen Faktor hinsichtlich der Elimination von Tumorzellen dar. Auf der Suche nach Serumbiomarkern stellt sich deshalb die Frage, ob Ausgangswerte oder Schwankungen dieser Mediatoren im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Immuntherapie stehen.

Verfolgt wurde die Frage, ob die aufgezählten Zytokine als potenzielle immunologische Serummarker dienen können und somit das Ansprechen von Patienten auf eine Immuntherapie besser als bislang vorhergesagt werden kann. Wie bereits erwähnt, gibt es bereits Anhaltspunkte für den Zusammenhang von Therapieansprechen und den genannten Mediatoren. Vorherige Studien bezogen sich jedoch überwiegend auf die Genexpression im Tumorgewebe, eine Messung

aus peripherem Blut ist weniger invasiv, kostengünstiger und angenehmer für den Patienten/die Patientin.

Ideal wäre die Etablierung von Biomarkern, die zusätzlich zu hoher Signifikanz und Sensitivität nicht-invasiv und ohne großen zeitlichen und technischen Aufwand zu gewinnen wären. Die Möglichkeit, verlässliche Serumbiomarker aus peripherem Blut zu gewinnen, wäre eine solche Entwicklung.

1.3.3 Granzyme und Perforin

Um Zielzellen zu eliminieren, setzen zytotoxische T-Zellen durch Exozytose Perforin und Granzym frei, wobei Perforin einen Membrantunnel bildet und Granzym im Zytoplasma der Zielzelle die Apoptose einleitet (21, 22).

Granzyme sind proapoptotische Serin-Proteasen, die gemeinsam mit Perforin von zytotoxischen Lymphozyten sezerniert werden, um in der Zielzelle eine Apoptose einzuleiten(23). Manche Tumorzellen können Einfluss auf Apoptose-Signalwege nehmen, die durch Granzyme vermittelt werden (24).

Perforin befindet sich in sekretorischen Granula im Zytosol der Immunzellen (24). Es ist unabdingbar für eine durch Granzym vermittelte Induktion der Apoptose in der Zielzelle und bindet calciumabhängig (25). Nach der Bindung bildet Perforin vorübergehend Poren auf der Oberfläche der Zielzelle, durch welche Granzyme ins Zytosol gelangen (26). Bereits nach einem Zeitraum von 2 Minuten nach Porenbildung beginnt in der Zielzelle die Einleitung der Apoptose (26). Ein Perforindefekt kann mit erhöhter Wahrscheinlichkeit von hämatologischen Krebserkrankungen einhergehen. Dieser Sachverhalt betont die Stellung von Perforin im Kampf gegen maligne Zellen (23). Es liegen bereits Daten vor, dass Granzym B unter Immuncheckpoint-Therapie als Marker dienen kann (27). Es zeigte sich erst im Mausmodell und später auch an Proben von menschlichen Melanombiopsien, dass das Therapieansprechen auf Checkpointinhibitoren (CTLA- und PD-1 AK) mit erhöhter Granzym B Expression vergesellschaftet war. Das Perforin in der T-Zell-Antwort direkt mit Granzym B verknüpft ist, erklärt das Bestreben, auch seine Serumwerte vor und während der Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren zu messen.

1.3.4 Interferon γ

Interferone zählen zur Gruppe der Zytokine, die als lösliche Botenstoffe fungieren und über Rezeptoren an ihren Zielzellen wirken (1). IFN γ gehört zur Gruppe der Typ II Interferone und wird von B-Zellen, T-Zellen, Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und APC-Zellen produziert (28). Es hat einen Einfluss auf die Antitumor-Antwort des Immunsystems, bzw. auf die Regulation des Tumorwachstums (29-31). Die genauen Mechanismen und Auswirkungen auf die Tumorzellen sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Durch CD4+ Th- und CD8+ T-Zellen produziertes IFN γ scheint allerdings einen hohen Stellenwert in der Bekämpfung und Unterdrückung von Tumorzellen, aber auch deren Wachstum zu haben (32). Zusätzlich dient IFN γ als Differenzierungssignal für naive CD8+ T-Zellen und wird von diesen auch produziert, seine Wirkung verstärkt sich im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen (31). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass PD-L1 und PD-L2 die Freisetzung von IFN γ herabregulieren (33). Auf der anderen Seite kann IFN γ auch zur Hochregulierung von PD-L1 führen und so Tumorwachstum unterstützen (34, 35). Auch für IFN γ als potenziellen Biomarker gibt es Anhaltspunkte. So wurden in einer Studie mit NSCLC (non-small-cell lung cancer) Patienten, die mit Durvalumab behandelt wurden, vor Therapiebeginn Tumorbiopsien gewonnen. Im Verlauf stellte sich heraus, dass IFN γ von allen getesteten Immungenen am besten mit dem Therapieansprechen vergesellschaftet war (36).

1.3.5 IL-8

IL-8 ist ebenso wie Interferon in die große Familie der Zytokine einzuordnen und wird von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert (1). In Folge von Gewebeschädigung bzw. Entzündung beeinflusst IL-8 durch Chemotaxis z.B. die Einwanderung von Granulozyten. Zusätzlich kann IL-8 die Angiogenese beeinflussen (37). Die Expression von IL-8 konnte in diversen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden, sowohl in soliden, als auch in nicht soliden (38). Dementsprechend wird auch in dieser Studie

untersucht, ob die Serumlevel von IL-8 mit dem Krankheitsverlauf unter Immuncheckpoint-Inhibition in Verbindung gebracht werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive, nicht-interventionelle klinische Studie zur Analyse von potenziellen Biomarkern bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen unter Immuncheckpoint-Inhibition.

Die gemessenen Serumspiegel der Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie werden mit dem Behandlungsverlauf in Verbindung gebracht.

2.2 Studienablauf

2.2.1 Ethikantrag

Zur durchgeführten Studie liegt ein genehmigter Ethikantrag vor (Aktenzeichen 15/18-me).

2.2.2 Aufklärung und Einverständnis

Für die Studie kamen Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung in Betracht, für die eine Immuncheckpoint-Inhibition als weitere Therapieoption geplant war. Zum Teil erfolgte der Einschluss direkt durch die Ärztinnen und Ärzte der Early Clinical

Trial Unit (ECTU) der Universitätsklinik Würzburg, die restlichen Patientinnen und Patienten wurden durch die Mithilfe der Chemoambulanz der Frauenklinik und der Urologie der Universitätsklinik Würzburg akquiriert.

Die teilnehmenden Patienten wurden im Vorfeld sowohl mündlich, als auch schriftlich über den Ablauf der Studie informiert und willigten mit ihrer Unterschrift ein, dass ihre Krankheitsdaten ohne Namensnennung zum Zweck der wissenschaftlichen Auswertung genutzt werden. Außerdem wurden sie darüber informiert, dass etwaige Ergebnisse dieser Studie aufgrund des zeitlichen Abstands zu ihrer Therapie in keiner Form Einfluss auf ihren individuellen Krankheitsverlauf haben konnten und sie dementsprechend keinen persönlichen Nutzen aus der Studienteilnahme ziehen würden.

Weitere Einschlusskriterien stellten die Volljährigkeit und die schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Biomarkeruntersuchung dar.

2.2.3 Blutproben

Im Studienverlauf wurden drei Serumproben der Patienten mit jeweils 10ml Blut (venöses Vollblut) abgenommen und nach einer Wartezeit von 10-15 Minuten bei 3200 U/min und 10°C 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Aufteilung auf 3-4 Aliquots à mindestens 300µl. Bis zum Zeitpunkt der Messungen wurden die Proben bei -80 Grad Celsius gelagert. Die erste Probe wurde vor Therapiebeginn mit Immuncheckpoint-Inhibitoren gewonnen. Dies geschah entweder im Zuge der Routineblutentnahme direkt vor dem Start der Immuntherapie, oder wenige Tage vorher. Die zweite Blutprobe wurde vor der zweiten Gabe der Immuntherapie entnommen und somit ca. 2 – 4 Wochen nach Therapiebeginn. Eine dritte Probe wurde drei Monate nach Therapiebeginn abgenommen und diente als Follow-up Blutentnahme.

2.3 ELISA-Messungen

Die Messung der gesammelten Blutproben mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) erfolgte im April 2020 im Labor für Tumorimmunologie der Medizinischen Klinik II im Uniklinikum Würzburg unter Leitung von Dr. B. Kimmel und ausdrücklich nicht durch die Doktorandin.

Für die Durchführung erfolgte die Verwendung von ELISA Kits von zwei Firmen:

- Invitrogen für IL-8, IFN γ , Perforin und Granzym B
- RayBiotech für Granzym A

2.3.1 ELISA-KITs und Zusatzmaterial

Tab. 2: Auführung der verwendeten ELISA-KITs inklusive enthaltener Komponenten

| ELISA Kit | enthaltene Komponenten |
|----------------------------------|--|
| Granzym B (BMS2027-2) | 96-well Platte, bedeckt mit monoklonalem Antikörper gegen Granzym B 70ul Biotin-Konjugat (Anti-Granzym B AK) 150ul HRP Streptavidin Granzym B lyophilisiert (960pg/ml nach Rekonstitution) 50ml Waschpuffer-Konzentrat 20x (PBS mit 1% Tween 20) 7ml Verdünnungspuffer 5x 15ml Substrat Solution (Tetramethyl- Benzidin) 15ml Stop Solution (1M Phosphorsäure) |
| IL-8 (KHC0081) | 96-well Platte, bedeckt mit monoklonalem AK gegen IL-8 6ml Biotin-Konjugat (Anti-IL-8 AK, 8mM Natriumazid) humanes IL-8 Standard (2 vials) 25ml Verdünnungspuffer (8mM Natriumazid) 0,125 ml Streptavidin HRP 100x (1,3 mM Thymol) |

| | |
|-----------------------------|--|
| | 25ml Streptavidin HRP Verdünner (0,05% Proclin 300) 100ml Waschpuffer-Konzentrat 25x 25ml stabilisiertes Chromogen, Tetramethylbenzidin 25ml Stop Solution |
| IFNy (EHIFNG) | 96-well Platte, bedeckt mit monoklonalem AK gegen IFNy 8ml Biotin-Konjugat (0,1% Natriumazid) 12ml Verdünnung (0,1% Natriumazid) 50ml Waschpuffer-Konzentrat 30x IFNy lyophilisiert (2 vials) 75ul Streptavidin HRP Konzentrat 14ml Streptavidin HRP Verdünnungspuffer 13ml Tetramethylbenzidin Substrat 13ml Stop Solution (0,16M Schwefelsäure) |
| Granzym A (ELH-GZMA) | 96 well Platte, bedeckt mit monoklonalem AK gegen Granzym A Biotin-Konjugat (Anti-Granzym A AK, 2 vials) Standard Protein (humanes Granzym A, 2 vials) 25ml Waschpuffer-Konzentrat 20x 200ul HRP Streptavidin 200x 12ml Tetramethylbenzidin Substrat 8ml Stop Solution (0,2M Schwefelsäure) 15ml Verdünnungspuffer 5x |
| Perforin (BMS2306) | 96 wells Platte, bedeckt mit monoklonalem AK gegen Perforin 70ul Biotin-Konjugat (Anti-Perforin AK) 150ul HRP Streptavidin Standard Protein (humanes Perforin, lyophilisiert, 3,6ng/ml) 12 ml Verdünnung 5ml Verdünnungspuffer 20x (PBS 1% Tween, 10% BSA) 50ml Waschpuffer 20x (PBS 1% Tween20) 15ml Tetramethylbenzidin Substrat 15ml Stop Solution (1M Phosphorsäure) |

Tabelle (Tab.) 2 zeigt die enthaltenen Komponenten der verwendeten ELISA-Kits. Zusätzlich zu den aufgeführten Komponenten waren in jedem Kit Abdeckplatten und Klebestreifen inkludiert.

Folgende zusätzliche Komponenten/Geräte waren für die Durchführung notwendig:

- Schüttelinkubator (Kombischüttler KL2; Bühler, Bodenhausen)
- Vortex: Vortex Genie 2 (Bender & Hobein, Zürich)
- Zentrifuge: Micro200 (Hettich, Tuttlingen)
- ELISA-Reader: Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge)
- Gerät zur Herstellung von Waschlösung
- Plattenwascher
- Destilliertes / deionisiertes Wasser
- Singlechannel und multichannel Pipetten (Eppendorf Research Plus; Eppendorf, Hamburg), Bechergläser, Kolben, Messzylinder
- Pipettierhilfe: Accu-Jet (Brand, Wertheim) / Multipette Plus (Eppendorf, Hamburg)
- Zusätzlicher Laborbedarf: sterile Pipettenspitzen, 96 well Flachboden Microtiterplatten (Cellstar), sterile Pipetten (Cellstar), Combitips. Sterile Röhren (Cellstar) wurden bezogen von den Firmen Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner Bio One (Frickhausen), Hartenstein (Würzburg).

2.3.2 Ablauf

Die ELISA-Durchführung wurde exakt nach Herstelleranleitung durchgeführt. Es ergeben sich je nach Messparameter und spezifischem Kit kleine Unterschiede in der Durchführung. Zusätzlich zur Probenauswertung wurden Kontroll-Standards durchgeführt.

In die wells, die je nach Messparameter bereits mit der passenden Antikörperbeschichtung ausgestattet waren, bindet das jeweilige Antigen der Blutprobe. Nach Waschen und Inkubationszeit wird ein Detektionsantikörper hinzugegeben, der das während der ersten Inkubation gebundene Antigen bindet. Im Fall von IFN γ erfolgt die Zugabe von 50ul biotinyliertem Antikörper je well, gefolgt von 50ul der Probe. Bei IL-8 werden 50ul der Probe und im Anschluss 50ul des biotinylierten AK hinzugefügt.

Bei Granzym A erfolgt zunächst die Hinzufügung von 100ul der verdünnten Probe. Die bedeckten wells werden für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt viermaliges Waschen mit 1X Waschlösung. Danach wird biotinylierter Antikörper hinzugefügt und es erfolgt die erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Danach erfolgt erneut viermaliges Waschen.

Bei Granzym B beginnt das Testprotokoll mit dem zweimaligen Waschen mit 400ul pro well mittels Waschpuffer. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von 75ul – 100ul Verdünnungspuffer (je nach well) und 75ul des biotinylierten AK, gefolgt von 50ul Verdünnungspuffer. Danach wird die bedeckte Platte für 1 Stunde bei 18-25°C inkubiert. Es folgt eine Hinzugabe von 100ul Biotinkonjugat und erneut fünfmaliges Waschen.

Bei Perforin startet das Protokoll mit zweimaligem Waschen (je 400ul je well). Im Anschluss erfolgt die Hinzugabe von 100ul Perforin-Standardlösung und der verdünnten Probe. In die Proben-Wells wird erneut 80ul Probenverdünnung pipettiert, dann erfolgt die Zugabe von 50ul Biotin-Konjugat.

Nun folgt bei allen Kits eine Inkubationszeit. Bei Granzym A, IFN γ und Perforin werden die bedeckten Platten für 2 Stunden bei 20-25°C inkubiert. Bei IL-8 wird die bedeckte Platte für 1 Stunde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bei Granzym B für 1h. Im Anschluss folgt erneutes Waschen (Anzahl abhängig von Kit: IFN γ dreimalig, IL-8 und Granzym A viermalig, Perforin sechsmalig, Granzym B fünfmalig).

Im nächsten Schritt wird Streptavidin HRP zugegeben. Dieses wiederum bindet an den Detektionsantikörper, also an den biotinylierten AK.

Bei allen Messparametern werden 100ul Streptavidin HRP pro well zugegeben. Danach folgt erneut Inkubationszeit bei Raumtemperatur (bei IL-8, IFN γ und Granzym B 30 Minuten, bei Perforin 1 Stunde, bei Granzym A 45 Minuten). Nach der Inkubation erfolgt ein erneutes Waschen (IFN γ ; dreimalig, IL-8 und Granzym A viermalig, Granzym B fünfmalig, Perforin sechsmalig) und nach 30 Minuten Ruhezeit (15 Minuten Ruhezeit bei Granzym B) im Dunkeln die Hinzugabe von Substratlösung (100ul TMB-Substrat). Diese ist für die Färbung verantwortlich. Durch Hinzugabe von 100ul Stopp-Lösung (50 ul bei Granzym A) wird die Reaktion beendet. Zuletzt wird die Absorption gemessen und mittels Statistiksoftware ausgewertet.

2.4 Datenmanagement und statistische Auswertung

Die verwendeten Patientendaten stammen aus dem SAP-System der Uniklinik Würzburg. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 9 und Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016; Excel Version 2019) durch die Verfasserin.

2.4.1 Zeitlicher Rahmen

Die Rekrutierung von Patientinnen und Patienten für die vorliegende Doktorarbeit fand im Zeitraum von November 2017 bis Juli 2018 statt. Die Messungen der Blutproben wurden im April 2020 durchgeführt.

2.4.2 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche erfolgte zu großen Teilen über pubmed.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzt sich zusammen aus 16 Patienten, die im Laufe ihrer Tumorerkrankung eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erhalten haben. Alle Patienten litten an soliden Tumoren (siehe Abb. 2) und hatten bereits mehrere Therapien vor Beginn der Immuntherapie erhalten (siehe Abb. 3).

3.1.1 Tumorentität/Stadium, Vortherapie, Studientherapie und -Ansprechen

In dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv betrachtet, welches innerhalb von Studien/individueller Heilversuche jeweils mit einem PD-1 Antikörper behandelt wurde. Die Patienten erhielten entweder Pembrolizumab, Nivolumab, oder Spartalizumab. Letzteres in Kombination mit Lcl-161, einem Antagonisten der IAP-Proteine (Inhibitors of apoptosis) (39).

Insgesamt erhielten 9 Patienten Nivolumab, 3 Patienten Spartalizumab und 4 Patienten Pembrolizumab (n=16).

Art und Anzahl der Vortherapien und Tumorstadium (TNM/UICC) unterscheiden sich von Patient zu Patient deutlich (siehe Tab. 2 und Abb. 2).

Tab. 3: Studienkollektiv mit Tumordiagnose, Tumorstadium/Therapie vor Einschluss, ICB und Therapieansprechen.

Definition: UICC-Stadium blau hinterlegt: aus Patientendaten übernommen. UICC-Stadium rot hinterlegt: abgeleitet aus vorhandenen Informationen. Cave: UICC Stadium zeitlich nicht simultan bestimmt. AK= Antikörper; bei Patient 25;28 und 30 Bevacizumab, bei Patient 46 Ramucirumab (beides VEGF-Rez.AK); bei Patient 30 zusätzlich Panitumumab (EGF-Rez. AK). Andere= bei Patient 26 FGFR-Inhibitor, bei Patient 27 Enzalutamid, Trenantone, Casodex; Pasotuxizumab. RECIST: response evaluation criteria in solid tumors.

| Pat. | m/w | Alter (Jahre) | Tumordiagnose | Stadium | Art und Anzahl Vortherapie | | | | | | ICB | | RECIST |
|------|-----|---------------|---|--|----------------------------|----------|----------|----|--------|-------|----------------|---------------|--------|
| | | | | | Chemo | Chemo+AK | Radiatio | OP | Andere | Summe | PD-1-Inhibitor | Zusatz | |
| 24 | w | 53 | Plattenepithelkarzinom Analkanal | UICC IV, rT2/3, rN+,M1 | 2 | x | 1 | x | x | 3 | Nivolumab | x | PD |
| 25 | m | 36 | Rektumkarzinom | UICC IV, ypT3,N1a,M1a | 3 | 1 | 1 | 4 | x | 9 | Spartalizumab | IAP Inhibitor | PD |
| 26 | w | 61 | Urothelkarzinom, Zweitmalignom Mamma | UICC III, pT2a,Nx,Mx; L0, V0, Rx; G2-3 | 1 | x | x | 1 | 1 | 3 | Pembrolizumab | x | PR |
| 27 | m | 62 | Prostatakarzinom | UICC IV, T2b, pN0,M1, R0, G2-3 | 1 | x | 4 | 4 | 4 | 13 | Pembrolizumab | x | PD |
| 28 | m | 63 | Rektumkarzinom | yUICC II, yT4b, yN0, M0 | 4 | 1 | 2 | 1 | x | 8 | Spartalizumab | IAP Inhibitor | PD |
| 30 | w | 59 | Adenokarzinom Colon ascendens | UICC IV, pT4a, N2b, M1 | x | 4 | x | 1 | x | 5 | Spartalizumab | IAP Inhibitor | PD |
| 32 | m | 66 | Zungengrundkarzinom, Mundbodenzweitkarzinom | UICC III, cT4,cN2c,M0 | 1 | x | 1 | 2 | x | 4 | Nivolumab | x | PD |
| 43 | w | 66 | Plattenepithelkarzinom Nasopharynx | UICC III, cT3, cN3,M0 | 2 | x | 2 | x | x | 4 | Nivolumab | x | PD |
| 46 | m | 52 | Adenokarzinom distaler Ösophagus | UICC IV, uT4a, uN+, M1 | 3 | 1 | 1 | 1 | x | 6 | Nivolumab | x | PD |
| 47 | m | 54 | großzellig anaplastisches Lungenkarzinom | UICC IV, Tx, Nx, M1 | 1 | x | 1 | x | x | 2 | Pembrolizumab | x | PR |
| 48 | m | 60 | CUP (zervikaler Tumor), Zweitmalignom Mamma | UICC IV, cT0,N2b, M1 | 2 | x | 3 | x | x | 5 | Nivolumab | x | PD |
| 49 | m | 47 | Plattenepithelkarzinom weicher Gaumen | UICC III, pT2,N2b | 2 | x | 2 | 2 | x | 6 | Nivolumab | x | PD |
| 50 | m | 68 | Plattenepithelkarzinom Mundboden | UICC II; cT4,N1,M0 | 2 | x | 2 | 5 | x | 9 | Nivolumab | x | PD |
| 51 | m | 67 | Hypopharynxkarzinom links | UICC III, pT4b, pN2b, cM0 | 1 | x | 1 | 1 | x | 3 | Nivolumab | Ipilimumab | SD |
| 53 | w | 54 | Bronchialkarzinom (Adeno.) | UICC IV; T1b,N3,M1b | 1 | x | 2 | x | x | 3 | Nivolumab | x | PD |
| 58 | m | 80 | fibröses Pleuramesotheliom | UICC IV, cT4c, Nx,M1b | 2 | x | 1 | 1 | x | 4 | Pembrolizumab | x | PR |

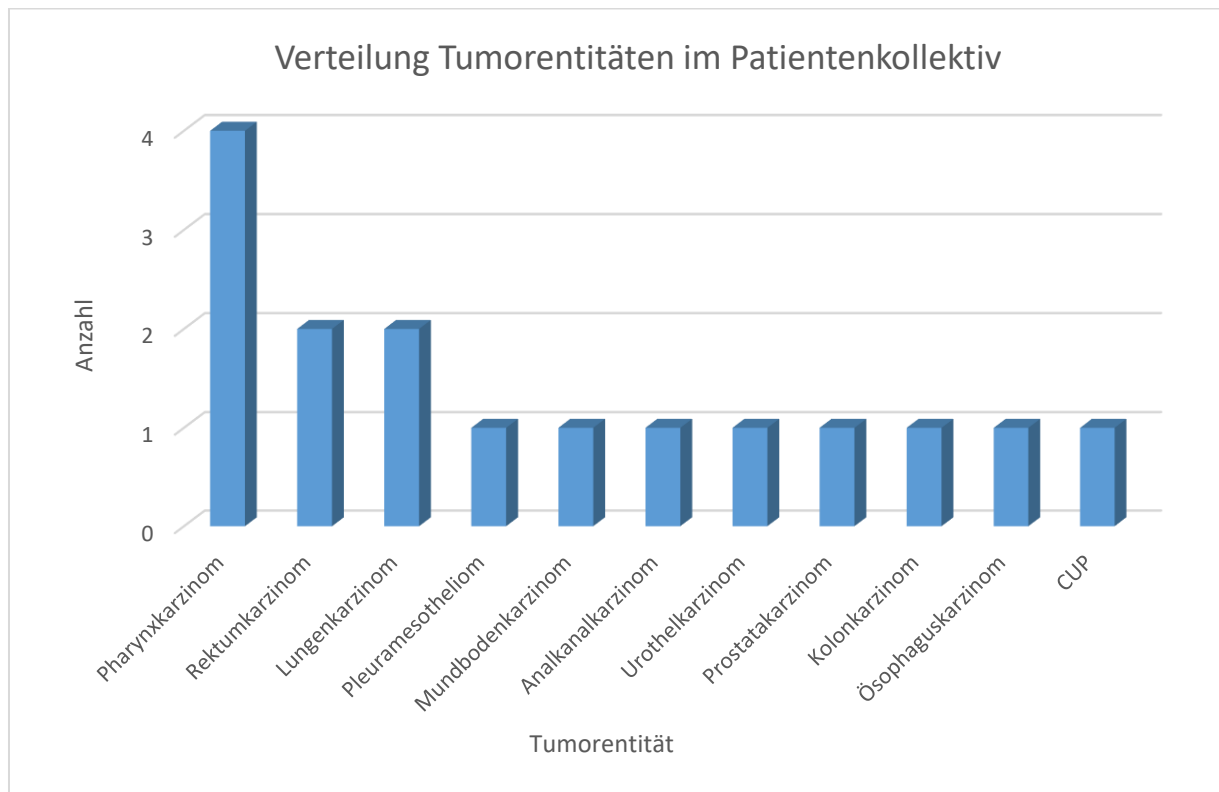


Abb. 2: Verteilung Tumorentitäten im Patientenkollektiv. CUP: cancer of unknown primary

Abb. 2 zeigt die diversen Tumorentitäten des Patientenkollektivs. Vertretene Tumorentitäten sind Pharynxkarzinom (n=4), Rektumkarzinom (n=2), Lungenkarzinom (n=2), Pleuramesotheliom (n=1), Mundbodenkarzinom (n=1), Analkanalkarzinom (n=1), Urothelkarzinom (n=1), Prostatakarcinom (n=1), Kolonkarzinom (n=1), Ösophaguskarzinom (n=1), sowie CUP (cancer of unknown primary) (n=1).

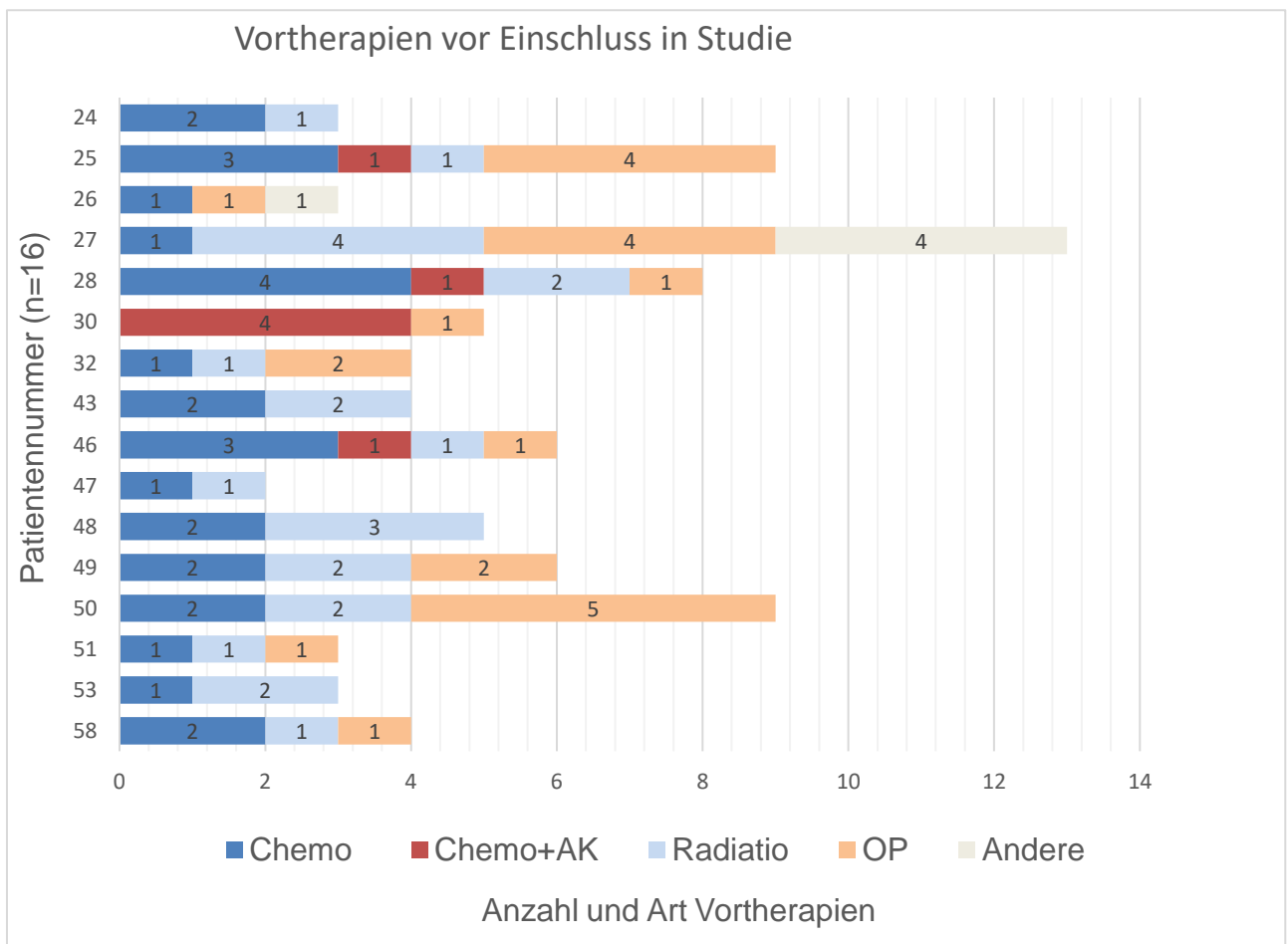


Abb. 3: Anzahl und Art Vorthherapien vor Einschluss in Studie, Definition AK und Andere siehe Tab. 2

Wie Abb. 3 zeigt, haben die meisten Patienten vor Studieneinschluss bereits diverse Therapien durchlaufen, der Median liegt bei 4,5, der Mittelwert beträgt 5,44.

Unter der Therapieoption „Andere“ sind in diesem Patientenkollektiv 5 diverse Wirkstoffe zusammengefasst. Ein Inhibitor des Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFRI), außerdem Bicalutamid und Enzalutamid (beides nichtsteroidale, selektive Antiandrogene), Leuprorelin (GnRH-Analogen) (40) und BiTE-Antikörper (bispezifischer Antikörper, bispecific T-cell engager)(41).

3.1.2 Einteilung Patientenkollektiv

Für die Auswertung der ELISA Messwerte wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt: Responder und Non-Responder.

Diese Einteilung beruht auf dem besten radiologischen Ansprechen. Von n=16 eingeschlossenen Patienten werden n=12 in die Gruppe Non-Responder, n=4 in die Gruppe Responder eingeteilt. In der Patientengruppe Responder sind partial response (PR) und stable disease (SD) vereint.

Das progressionsfreie Überleben (in Wochen) wird definiert als Zeitspanne zwischen dem Beginn der Immuntherapie und dem ersten radiologisch dokumentierten Progress.

Tab. 4: Darstellung progressionsfreies Überleben der Gruppe Responder

| Patient | Progressionsfreies Überleben | in Wochen |
|---------|------------------------------|-----------|
| 26 | 11/17- 28.11.19 | 113 |
| 47 | 03.03.18 -20.06.18 | 13,5 |
| 51 | 14.03.18-09.10.18 | 30 |
| 58 | 10.04.17-30.04.18 | 55 |

Tab. 5: Darstellung progressionsfreies Überleben der Gruppe Non-Responder

| Patient | Progressionsfreies Überleben | in Wochen |
|---------|------------------------------|-----------|
| 24 | 11.10.17-08.11.17 | 4 |
| 25 | 15.11.17-10.01.18 | 8,5 |
| 27 | 11/17-01/18 | 16 |
| 28 | 07.12.17-1.02.18 | 9 |
| 30 | 07.12.17-05.02.18 | 8,5 |
| 32 | 21.12.17-15.03.18 | 12 |
| 43 | 06.02.18 - 27.03.18 | 7 |
| 46 | 01.03.18-16.03.18 | 2 |
| 48 | 06.03.18-16.05.18 | 10 |
| 49 | 14.03.18-14.08.18 | 22 |
| 50 | 14.03.18-09.05.18 | 8 |
| 53 | 23.03.18-04.04.18 | 2,5 |

Der Median der Responder-Gruppe in Bezug auf progression free survival (PFS) in Wochen liegt bei 42,5; der Mittelwert bei 52,875.

Der Median der Non-Responder-Gruppe in Bezug auf PFS liegt bei nur 8,5 Wochen, der Mittelwert beträgt 8,96 Wochen.

3.2 ELISA Messwerte

In Tab. 6 erfolgt eine Betrachtung des Medians inklusive Standardabweichung und Mittelwert inklusive Interquartilsabstand als zentrale Tendenz der Messwerte. In Tab. 7 und 8 ist das Patientenkollektiv in Gruppe Responder und Non-Responder unterteilt.

Zur Bezeichnung der Messzeitpunkte:

Die 3 im Methodenteil genannten Messungen im Rahmen der Studienteilnahme werden im Folgenden als Baseline (BL), 1. Post-Treatment (1.PT) und 2. Post-Treatment (2.PT) benannt und entsprechen einer Abnahme vor Therapiebeginn, einer zweiten Blutentnahme 2-4 Wochen nach Therapiebeginn und letztlich einer dritten Blutentnahme 3 Monate nach Therapiebeginn.

Tab. 6: Messwerte ELISA gesamtes Patientenkollektiv, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern), PT= Post Treatment

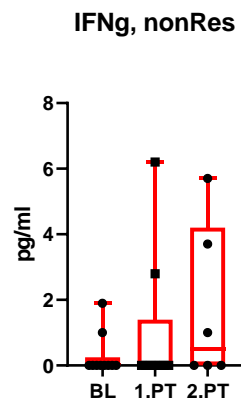
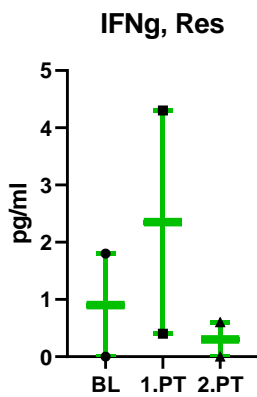
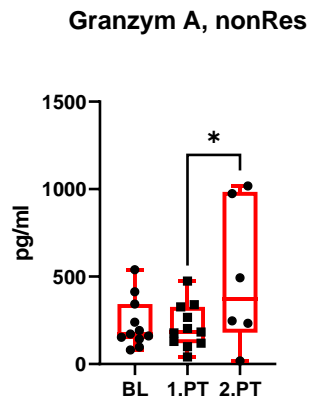
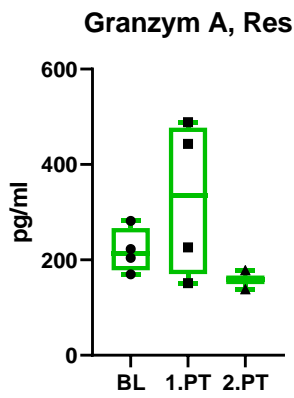
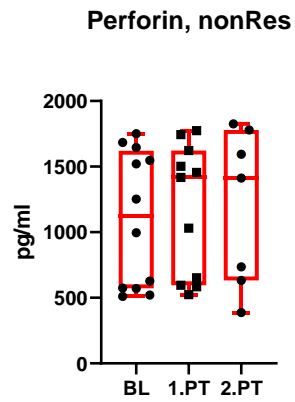
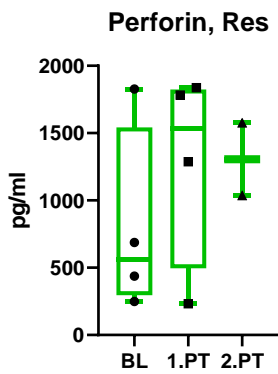
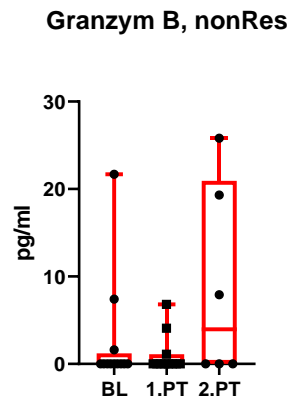
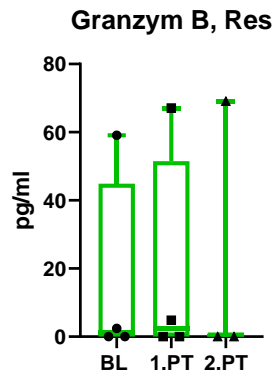
| Patient | Granzym B [pg/ml] | | | Perforin [pg/ml] | | | Granzym A [pg/ml] | | | IFNg [pg/ml] | | | IL-8 [pg/ml] | | |
|--------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | SCR | 1. PT | 2. PT |
| 24 | 0 | 0 | x | 1645,6 | 1744,1 | x | 342,8 | 267,2 | x | 0 | 0 | x | 27,9 | 70,8 | x |
| 25 | 21,7 | x | 25,8 | 1750,8 | x | 1412,5 | 413,3 | x | 973,8 | 1 | x | 1 | 0,15 | x | 10 |
| 26 | 2,4 | 4,8 | 0 | 1827,8 | 1837,1 | 1576,6 | 222,5 | 226,2 | 138,4 | 1,8 | 0,4 | 0 | 1 | 1,3 | 0 |
| 27 | 0 | 6,8 | 19,3 | 1547,2 | 1774 | 1825,3 | 160,5 | 327,3 | 1017,7 | 1,9 | 2,8 | 3,7 | 6,1 | 14,7 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 510,4 | 584,4 | 735,5 | 192,3 | 203 | 233,6 | 0 | 0 | 0 | 82,5 | 71 | 92,3 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 1520,2 | 1622,9 | 1593,5 | 539,5 | 474,5 | 493,4 | 0 | 0 | 0 | 11,9 | 35,9 | 68 |
| 32 | 0 | 0 | 7,9 | 520,9 | 652,2 | 387,5 | 142,8 | 128,8 | 18,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,3 | 3 |
| 43 | 0 | 0 | x | 995,1 | 523,9 | x | 238,8 | 183 | x | 0 | 0 | x | x | x | x |
| 46 | 0 | 0 | x | 1253,1 | 1503 | x | 97 | 40 | x | 0 | 0 | x | 85,1 | 162,8 | x |
| 47 | 0 | 0 | 0 | 436,8 | 1782,8 | 1035,5 | 281,6 | 488,9 | 178,2 | x | x | x | x | x | x |
| 48 | 7,4 | 4,1 | x | 1683,5 | 1455,9 | 1779,4 | 172 | 177,5 | x | 0 | 0 | 5,7 | 6,9 | 11,6 | 12,4 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 627 | 595,4 | 633,3 | nd | 119,2 | 246,5 | x | x | x | x | x | x |
| 50 | 0 | 0 | x | 571 | 1417,2 | x | 153,1 | 339,5 | x | x | x | x | x | x | x |
| 51 | 59,1 | 67,1 | 69,1 | 687,5 | 1286,7 | x | 204,1 | 443,2 | x | x | x | x | x | x | x |
| 53 | 1,6 | 1,1 | x | 574,3 | 1030,9 | x | 80,1 | 99,3 | x | 0 | 6,2 | x | 15,4 | 15,4 | x |
| 58 | 0 | 0 | x | 249,9 | 232,3 | x | 169,8 | 151,3 | x | 0 | 4,3 | 0,6 | 2 | 4 | x |
| Mittelwert inkl. SD | 5,76 (14,78) | 5,59 (16,57) | 13,57 (21,65) | 1025,07 (542,46) | 1202,85 (530,94) | 1219,9 (504,33) | 227,35 (118,99) | 244,59 (136,51) | 412,51 (359,29) | 1,25 (0,71) | 1,25 (2,09) | 1,38 (2,01) | 21,72 (30,31) | 38,98 (48,23) | 26,53 (34,81) |
| Median inkl. IQR | 0 (1,8) | 0 (2,6) | 0 (19,3) | 841,3 (1571,8) | 1417,2 (1059,7) | 1412,5 (858) | 192,3 (103,4) | 203 (193,35) | 240,05 (445,25) | 0 (0,25) | 0 (1,6) | 0,3 (1,675) | 6,9 (20,15) | 15,05 (56,18) | 10 (38,7) |

Tab. 7: Messwerte ELISA Gruppe Responder, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern)

| Patient | Granzym B [pg/ml] | | | Perforin [pg/ml] | | | Granzym A [pg/ml] | | | IFNg [pg/ml] | | | IL-8 [pg/ml] | | |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|--------------|----------------|-------|
| | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT |
| 26 | 2,4 | 4,8 | 0 | 1827,8 | 1837,1 | 1576,6 | 222,5 | 226,2 | 138,4 | 1,8 | 0,4 | 0 | 1 | 1,3 | 0 |
| 47 | 0 | 0 | 0 | 436,8 | 1782,8 | 1035,5 | 281,6 | 488,9 | 178,2 | x | x | x | x | x | x |
| 51 | 59,1 | 67,1 | 69,1 | 687,5 | 1286,7 | x | 204,1 | 443,2 | x | x | x | x | x | x | x |
| 58 | 0 | 0 | x | 249,9 | 232,3 | x | 169,8 | 151,3 | x | 0 | 4,3 | 0,6 | 2 | 4 | x |
| Mittelwert inkl. SD | 15,38 (25,26) | 17,98 (28,42) | 23,03 (32,57) | 800,5 (613,1) | 1284,73 (644,36) | 1306,05 (270,55) | 219,5 (40,54) | 327,4 (142,08) | 158,3 (19,9) | 0,9 (0,9) | 2,35 (1,95) | 0,3 (0,3) | 1,5 (0,5) | 2,65 (1,35) | 0 (0) |
| Median inkl. IQR | 1,2 (16,58) | 2,4 (20,38) | 0 (34,55) | 562,15 (582,5) | 1534,75 (773,28) | 1306,05 (270,55) | 213,3 (41,75) | 334,7 (247,15) | 158,3 (19,9) | 0,9 (0,9) | 2,35 (1,95) | 0,3 (0,3) | 1,5 (0,5) | 2,65 (1,35) | 0 (0) |

Tab. 8: Messwerte ELISA Gruppe non-Responder, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern)

| Patient | Granzym B [pg/ml] | | | Perforin [pg/ml] | | | Granzym A [pg/ml] | | | IFNg [pg/ml] | | | IL-8 [pg/ml] | | |
|--------------------------------|-------------------|----------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT | BL | 1. PT | 2. PT |
| 24 | 0 | 0 | x | 1645,6 | 1744,1 | x | 342,8 | 267,2 | x | 0 | 0 | x | 27,9 | 70,8 | x |
| 25 | 21,7 | x | 25,8 | 1750,8 | x | 1412,5 | 413,3 | x | 973,8 | 1 | x | 1 | 0,15 | x | 10 |
| 27 | 0 | 6,8 | 19,3 | 1547,2 | 1774 | 1825,3 | 160,5 | 327,3 | 1017,7 | 1,9 | 2,8 | 3,7 | 6,1 | 14,7 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 510,4 | 584,4 | 735,5 | 192,3 | 203 | 233,6 | 0 | 0 | 0 | 82,5 | 71 | 92,3 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 1520,2 | 1622,9 | 1593,5 | 539,5 | 474,5 | 493,4 | 0 | 0 | 0 | 11,9 | 35,9 | 68 |
| 32 | 0 | 0 | 7,9 | 520,9 | 652,2 | 387,5 | 142,8 | 128,8 | 18,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,3 | 3 |
| 43 | 0 | 0 | x | 995,1 | 523,9 | x | 238,8 | 183 | x | 0 | 0 | x | x | x | x |
| 46 | 0 | 0 | x | 1253,1 | 1503 | x | 97 | 40 | x | 0 | 0 | x | 85,1 | 162,8 | x |
| 48 | 7,4 | 4,1 | x | 1683,5 | 1455,9 | 1779,4 | 172 | 177,5 | x | 0 | 0 | 5,7 | 6,9 | 11,6 | 12,4 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 627 | 595,4 | 633,3 | nd | 119,2 | 246,5 | x | x | x | x | x | x |
| 50 | 0 | 0 | x | 571 | 1417,2 | x | 153,1 | 339,5 | x | x | x | x | x | x | x |
| 53 | 1,6 | 1,1 | x | 574,3 | 1030,9 | x | 80,1 | 99,3 | x | 0 | 6,2 | x | 15,4 | 15,4 | x |
| Mittelwert inkl. SD | 2,56 (6,12) | 1,09 (2,16) | 8,833 (10,27) | 1099,93 (494,61) | 1173,08 (479,69) | 1195,29 (550,79) | 230,2 (136,68) | 214,48 (121,12) | 497,25 (378,5) | 0,29 (0,61) | 1 (2,04) | 1,733 (2,2) | 26,22 (31,81) | 48,06 (49,95) | 30,95 (35,73) |
| Median inkl. IQR | 0 (0,4) | 0 (0,55) | 3,95 (16,45) | 1124,1 (998,33) | 1417,2 (939,15) | 1412,5 (1002,05) | 172 (142,85) | 183 (173,25) | 369,95 (616,88) | 0 (0) | 0 (0) | 0,5 (3,03) | 11,9 (21,8) | 25,65 (56,93) | 11,2 (49,35) |



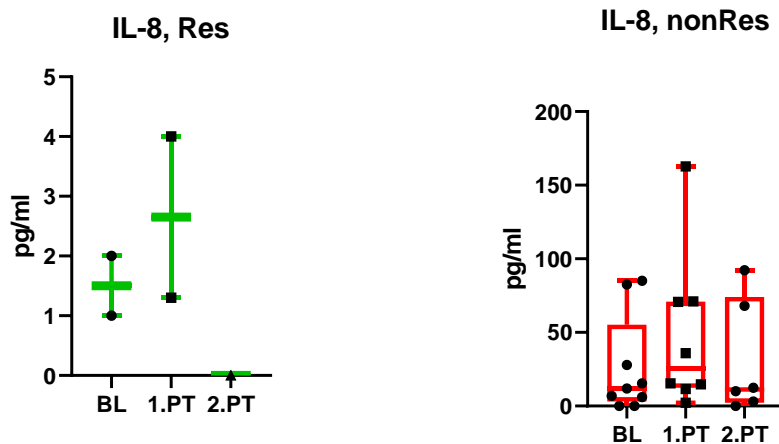


Abb. 4: Messung BL, 1.PT und 2.PT der Gruppe Res (Responder) und nonRes (nonResponder)

Die nachfolgenden Betrachtungen der Messwerte beziehen sich auf die Tab. 6-8 und Abb. 4 und 5.

3.2.1 Messwerte Gruppe Non-Responder

In der Gruppe der Non-Responder steigt von 1. auf 2. Messung (entsprechend BL und 1.PT) der Median bei Perforin, Granzym A und IL-8, nicht jedoch bei Granzym B und IFN γ . Die Mittelwerte von Granzym A und B sinken zwischen Messung 1 und 2 ab. Der Mittelwert in Messung 3 (2.PT) steigt bei den Messparametern an (Granzym A/B, Perforin, IFN γ). Eine Ausnahme bildet IL-8, hier kommt es zum Absinken. Der Median fällt bei Perforin und IL-8.

Zum Messzeitpunkt 2.PT steigen die Messparameter nicht nur im Vergleich zu 1.PT überwiegend an, sondern bei den meisten Probanden auch im Vergleich zur Baseline. Das betrifft sowohl Mittelwert, als auch Median. Nur IL-8 hat sein

Maximum in 1.PT. Die Ergebnisse sind nicht signifikant, bis auf den Messwertanstieg von Granzym A von Messung 1.PT zu 2.PT ($p=0,04$).

Die absoluten IL-8 Werte in pg/ml betragen in Messung BL= 26,21; in Messung 1.PT= 48,06 und in Messung 2.PT=30,95. Damit bestehen zu allen Messzeitpunkten höhere absolute Messwerte im Vergleich zu Gruppe nonPD.

3.2.2 Messwerte Gruppe Responder

In der Responder-Gruppe steigen Median und Mittelwert von Baseline zu Messung 1.PT bei allen Parametern an.

In Messung 2.PT steigt der Mittelwert bei Granzym B und Perforin. Der Mittelwert der restlichen Messparameter sinkt im Vergleich zu 1.PT. Der Median sinkt bei allen Messparametern der Responder-Gruppe in Messung 2.PT.

Im Fall von IFN γ und IL-8 liegen nur wenige Messergebnisse vor, daher ist eine Interpretation wenig sinnvoll.

3.2.3 Verlauf Messparameter unter Ausschluss von Patienten mit vorangegangener Antikörpertherapie

Im Zuge der Datenauswertung erfolgte zusätzlich eine Gegenüberstellung der Gruppen Responder und Non-Responder unter Ausschluss von Patienten, die im Vorfeld diverse Antikörpertherapien erhielten. Dies geschah im Hinblick auf die Frage, ob sich eine Antikörpertherapie vor Studieneinschluss auf das Therapieansprechen im Rahmen der Immuncheckpointblockade auswirkt. Die Ergebnisse bringen keine zusätzlichen Erkenntnisse und werden daher weder graphisch dargestellt, noch im Folgenden diskutiert.

3.2.4 Zusammenführung Ergebnisse Responder und Non-Responder

In Abb. 5 sind die Messergebnisse der Gruppen Responder und Non-Responder direkt gegenübergestellt. Die Messunterschiede sind nicht signifikant. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs und unvollständiger Messungen sind IFN γ und IL-8 exkludiert.

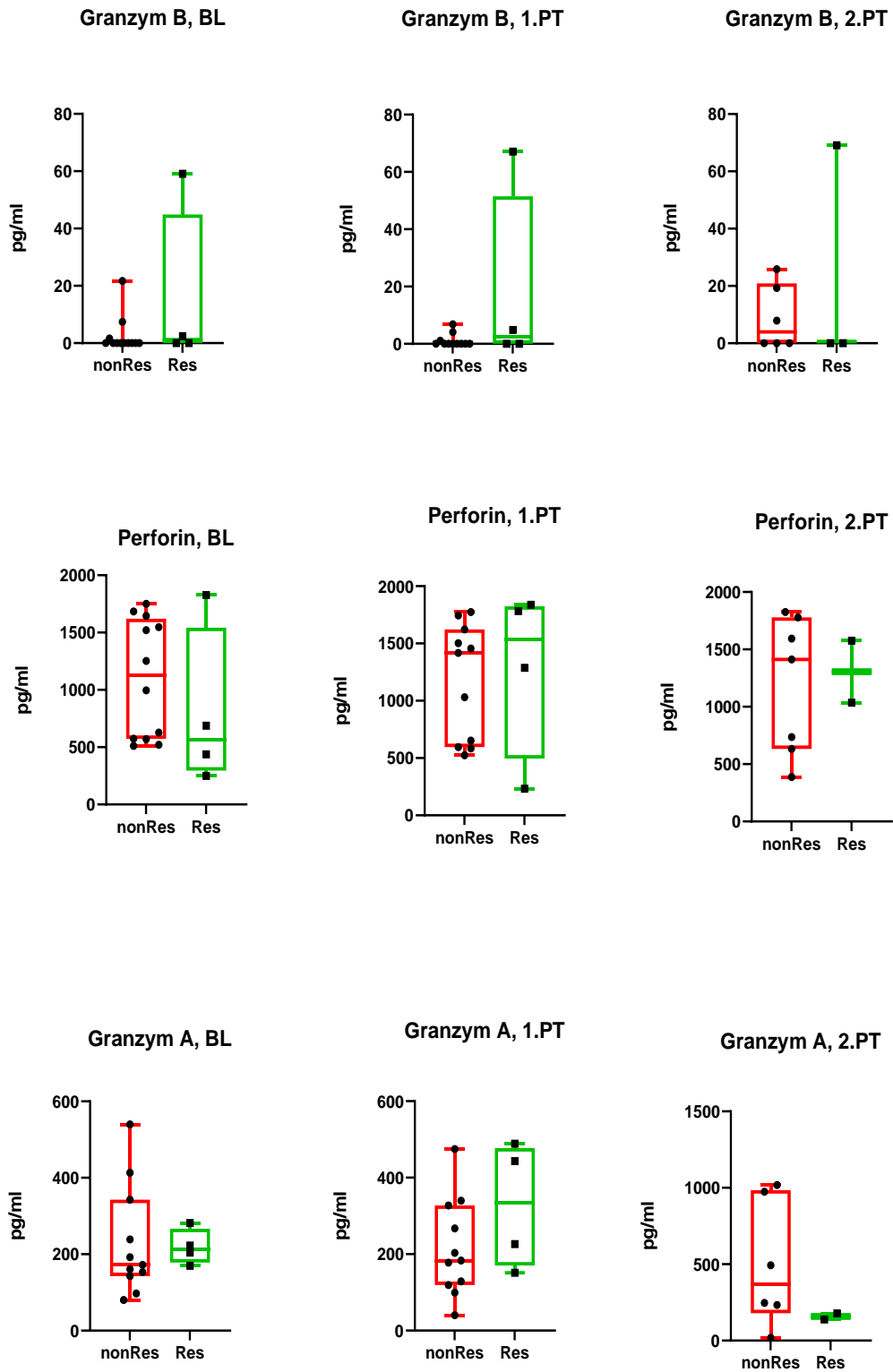


Abb. 5: direkte Gegenüberstellung der Messergebnisse Gruppe Non-Responder (nonRes) und Gruppe Responder (Res) zu allen 3 Messzeitpunkten

In Gruppe Responder steigen Median und Mittelwert von Baseline zu Messung 1.PT bei allen Messparametern an. Der Median fällt von 1.PT zu 2.PT ab. Der Mittelwert sinkt ebenfalls überwiegend, Ausnahmen bilden hier die Parameter Granzym B und Perforin.

In der Gruppe Non-Responder ist der 3. Messwert (2.PT) am höchsten, sowohl in Bezug auf den Median, als auch auf den Mittelwert. Bei den Non-Respondern steigen die Mittelwerte von Messung 1.PT auf 2.PT bei allen Parametern mit Ausnahme von IL-8 an. IL-8 hat den höchsten Messwert in 1.PT.

Der Baselinewert von Granzym B der Responder-Gruppe ist im Sinn eines statistischen Trends erhöht zur Non-Responder-Gruppe ($p=0,1518$). In Messung 1.PT setzt sich dieser Trend fort ($p=0,092$).

Die absoluten IL-8 Werte in pg/ml sind bei den Non-Respondern zu allen Messzeitpunkten höher, als bei den Respondern.

Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass Patienten der Gruppe Responder ein deutlich längeres Überleben zeigen. Es stellt sich somit ein prognostisch deutlicher Unterschied dar (vergleiche mit Tbl. 4 und 5).

3.2.5 Vergleich Messwertverläufe Gruppe Responder und Non-Responder

Im direkten Vergleich der Messwertverläufe bzw. -Unterschiede (Δ) zwischen Gruppe Responder und Non-Responder lassen sich einige statistische Trends aufzeigen. Im Messwertverlauf von BL-1.PT ist der Zytokinanstieg der Gruppe Responder bei Granzym A ($p=0,1494$) und Perforin ($p=0,1838$) im Vergleich zur Gruppe Non-Responder höher (siehe Abb. 6).

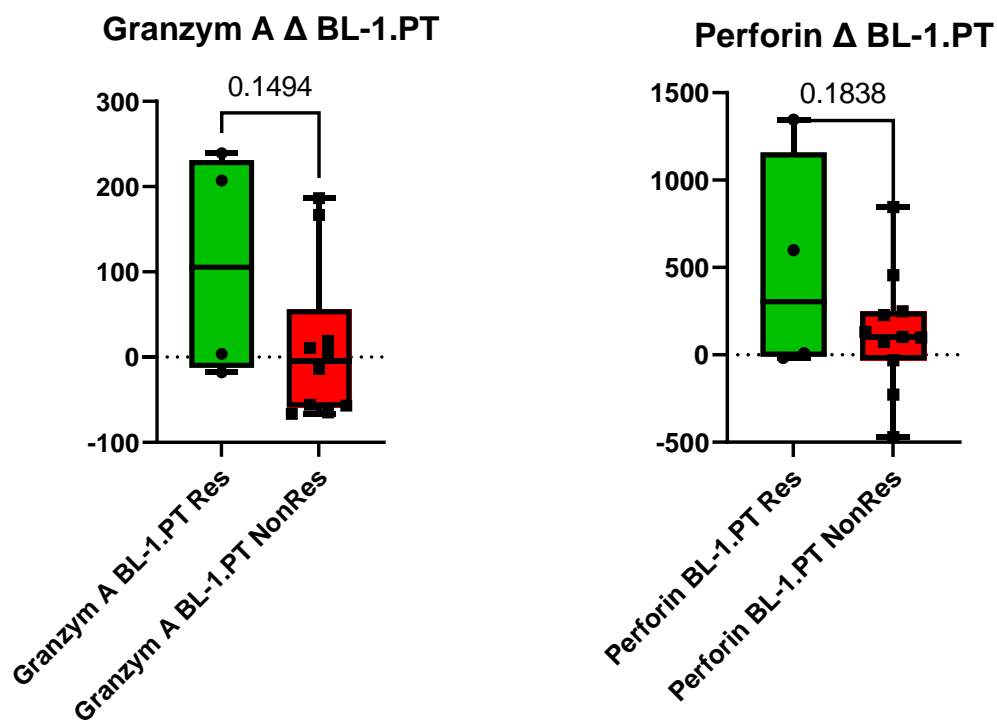


Abb. 6: Δ des Messwertverlaufs zwischen Respondern und Non-Respondern von Baseline-Messung auf 1.PT. Grün= Responder; rot= Non-Responder

Im direkten Vergleich der Messwertverläufe zwischen Messung 1.PT und 2.PT zeigt sich der Trend zu höheren Werten in der Gruppe Non-Responder. Dieser setzt sich fort in der Betrachtung BL-2.PT. Auch im Vergleich der Baseline-Messung mit Messung 2.PT ist der Messwertanstieg der Gruppe Non-Responder höher im Vergleich zur Gruppe Responder (p-Werte siehe Anhang).

3.3 Korrelation von Baseline-Werten mit dem Überleben

In einem weiteren Schritt erfolgte die Unterteilung des Patientenkollektivs in zwei Gruppen nicht wie bei den vorherigen Messungen anhand der Gruppe Responder und Non-Responder. Zur Erstellung der Kaplan Meier Kurven wurde die Gruppe anhand des Medians der Baselinewerte der jeweiligen Messparameter in „low“ und „high“ eingeteilt. Dasselbe Vorgehen im Hinblick auf die Einteilung wurde bereits in anderen Studien genutzt (42). Da nicht bei allen Patienten genaue Daten zum Exitus letalis bzw. zum Eintritt dessen vorliegen, konnte die Zeit in Wochen bis hin zum Tod nicht als Messpunkt dienen. Stattdessen erfolgte die objektivierbare Messung der Wochen bis hin zur radiologisch dokumentierter PD. Bei Patient Nr. 26 liegt bis zur Gewinnung der Daten keine PD vor, daher wurde in diesem einen Fall das zuletzt dokumentierte Datum als Ende der Zeitspanne genutzt (siehe Tab. 4). Die Zeit in Wochen des therapiefreien Überlebens (Definition: Beginn der Immuntherapie bis zur Aufnahme einer Folgetherapie bzw. Exitus letalis) wurde nicht verwendet, da diese Zeitspanne nicht gleichbedeutend messbar wie der Eintritt einer PD ist. In einigen Fällen wurde aufgrund einer palliativen Situation keine Folgetherapie bis hin zum Tod aufgenommen.

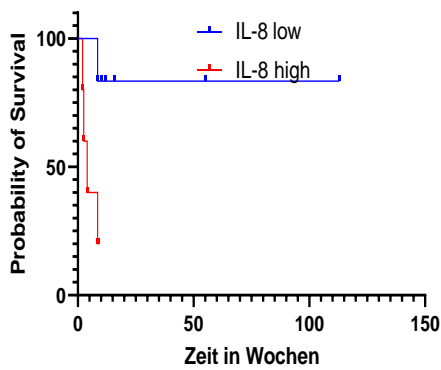
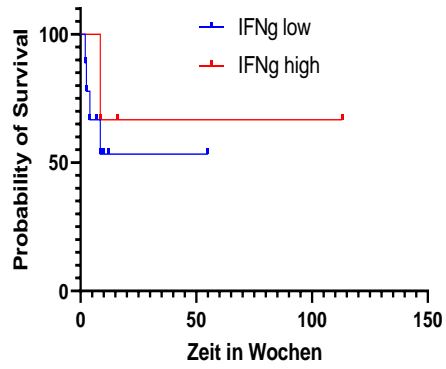
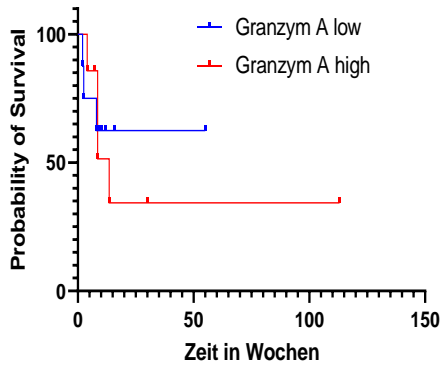
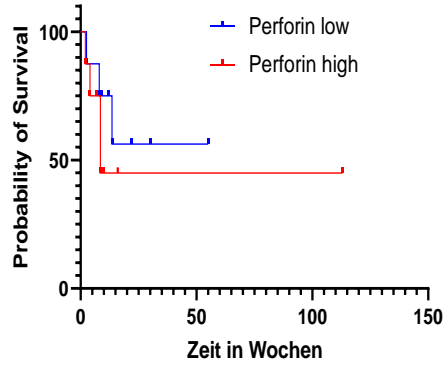
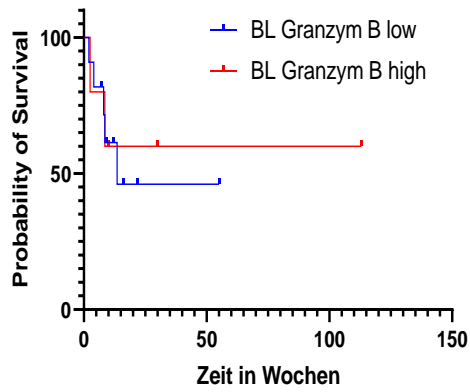


Abb. 7: Vergleich zwischen low (blau) und high (rot) Baseline Werten hinsichtlich PFS..

Die Unterteilung in low und high Baseline erfolgte anhand des Median der Baselinewerte. Median Granzym B: 0 pg/ml; Median Perforin: 841,3 pg/ml; Median Granzym A: 192,3 pg/ml; Median IFN γ : 0 pg/ml; Median IL-8: 6,9 pg/ml.

Es ergibt sich ein signifikantes Ergebnis beim Vergleich von IL-8 low mit IL-8 high (Log-rank test; $p=0,022$).

Hohe Serumwerte von Granzym B und IFN γ zeigen im Studienkollektiv eine Verlängerung des PFS-Intervalls, allerdings ohne statistische Signifikanz (Log-rank test, Granzym B: $p=0,79$; IFN γ : $p=0,56$). Bei Perforin und Granzym A scheinen niedrige Ausgangsserumwerte im vorliegenden Patientenkollektiv einen Überlebensvorteil zu bringen (Perforin: $p=0,49$; Granzym A: $p=0,73$).

3.4 Nebenwirkungen unter Immuntherapie

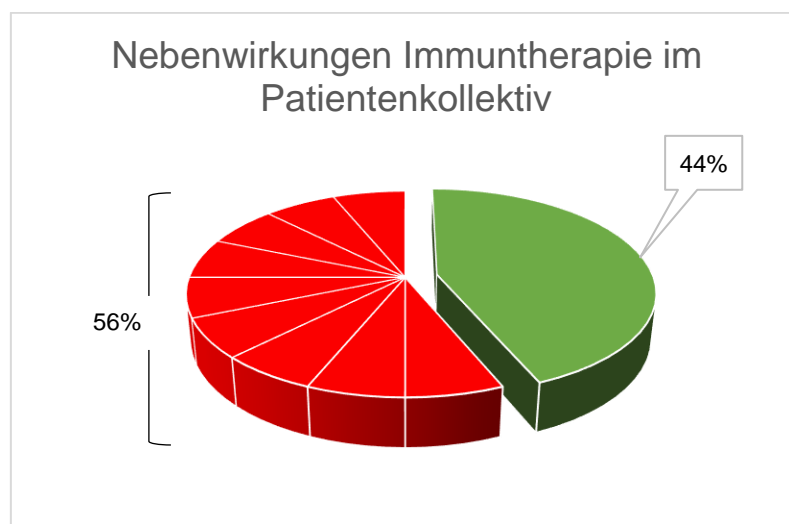


Abb. 8: Nebenwirkungen (NW) Immuntherapie im Patientenkollektiv: grün= keine NW; rot= NW

In Abb. 7 ist die Nebenwirkungshäufigkeit in Prozent unter Immuntherapie dargestellt. 44% des Patientenkollektivs litten während Immuntherapie nicht an

immunvermittelten Nebenwirkungen. Die Mehrheit hingegen (56%) klagte über Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Therapie.

| Nebenwirkung | Häufigkeit |
|-----------------------------|------------|
| AZ-Minderung | 1 |
| Immunhepatitis | 1 |
| progredientes Leberversagen | 1 |
| Immunpneumonitis | 1 |
| immunvermittelte Akne | 1 |
| Unterarmerytheme | 1 |
| Immunvermittelte Nephritis | 1 |
| Hypothyreose | 1 |
| Andere | 1 |
| Keine | 7 |

Abb. 9: Aufführung von Nebenwirkungen unter ICB im Patientenkollektiv mit Angabe der Häufigkeit

Unter „Andere“ ist eine im SAP-System nicht näher bezeichnete immunvermittelte Nebenwirkung angeführt. Aus den zu Verfügung stehenden Unterlagen ist ein Fall von Therapieabbruch als direkte Folge einer immunvermittelten Nebenwirkung dokumentiert. Im Fall des betroffenen Patienten kam es nach der zweiten Gabe Nivolumab zu progredientem Leberversagen, woraufhin die Immuntherapie abgebrochen wurde. In allen anderen Fällen (n=15) sind durch die Immuntherapie vermittelte Nebenwirkungen nicht für einen Therapieabbruch verantwortlich.

4 Diskussion

Ansatz der vorliegenden Studie ist die Idee, verschiedene immunologische Serumbiomarker bei Patienten mit fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen zu analysieren. Gibt es Anhaltspunkte, dass einzelne Parameter als prognostisches Werkzeug im Hinblick auf Therapieansprechen oder -versagen mit Immuncheckpointinhibitoren gewertet werden können?

Es erfolgt die Gegenüberstellung der Messwerte von Patienten der Gruppe Responder und Non-Responder in Bezug auf die drei Messzeitpunkte:

- Baseline (vor Therapiebeginn)

- 1.PT (erste Messung 2-4 Wochen nach Therapiebeginn)

- 2.PT (Follow-up Messung ca. 12 Wochen nach Therapiebeginn)

In einem weiteren Schritt wurde das Patientenkollektiv anhand der Baseline-Messwerte in zwei Gruppen (low und high) geteilt und gruppenabhängig PFS beurteilt.

4.1 Messwerte Gruppe Responder / Non-Responder

In den Gruppen Responder / Non-Responder gibt es Tendenzen, die bei allen Messparametern zu beobachten sind. Zu Beginn erfolgt eine Betrachtung der Messunterschiede der einzelnen potentiellen Serumbiomarker, die entweder statistisch signifikant sind, oder als statistische Trends aufgefasst werden können. Tabellen mit p-Werten/Signifikanzen sind im Anhang aufgelistet.

4.1.1 Granzym A und Perforin

Im Fall von Granzym A zeigt sich im direkten Vergleich der Messwertverläufe bzw. -Unterschiede (Δ) zwischen Gruppe Responder und Non-Responder im Messwertverlauf von BL-1.PT ein höherer Zytokinanstieg der Gruppe Responder ($p=0,1494$). Derselbe statistische Trend zeigt sich bei Perforin ($p=0,1838$). Das erscheint auch physiologisch sinnvoll, da in der Theorie bei Ansprechen auf eine Immuntherapie proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, um Tumorzellen zu eliminieren.

Die im Patientenkollektiv signifikanten Messwertanstiege von Messung 1.PT auf 2.PT innerhalb der Gruppe Non-Responder (Granzym A: $p=0,039$; Granzym B: $p=0,049$) sind physiologisch schwer erklärbar und gegebenenfalls auf die geringe Fallzahl und die hohe Streubreite der Einzelwerte zurück zu führen.

4.1.2 Granzym B

Der Baselinewert von Granzym B der Responder-Gruppe ist im Sinn eines statistischen Trends erhöht zur Non-Responder-Gruppe ($p=0,1518$). In Messung 1.PT setzt sich dieser Trend fort ($p=0,092$). Der Messwertverlauf zwischen BL-1.PT ist gegenüber den unter 4.1.1 erwähnten Trends bei Granzym A und Perforin jedoch nicht statistisch relevant ($p=0,4113$).

4.1.3 IL-8

IL-8 nimmt eine Sonderposition ein. Die Expression von IL-8 konnte in diversen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden, sowohl in soliden, als auch in nicht soliden (43). In diesem Fall kann die Expression von IL-8 das tumor microenvironment (TME) zugunsten des Tumors beeinflussen (37). Schalper et. al. zeigen einen Zusammenhang zwischen hohen Baseline-Leveln von IL-8 und schlechtem Outcome bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren, die sich einer

Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren unterzogen. IL-8 könnte Potential als negativ prognostischer Serummarker haben (20). IL-8 und IL-8 Rezeptor (IL-8R) können als Zytokin-Rezeptor-Paar eine Art Zelldifferenzierungsprogramm in den Tumorzellen bedingen. Die sogenannte epithelial mesenchymal transition (EMT) beschreibt den Prozess der Umwandlung der Tumorzellen in mesenchymale Stammzellen. In der Folge ermöglicht diese Umwandlung den malignen Zellen eine Loslösung aus dem Zellverband und unterstützt somit die Metastasierung (37, 44). Die absoluten Serumkonzentrationen von IL-8 in der Gruppe Non-Responder sind im vorliegenden Patientenkollektiv zu allen Messzeitpunkten höher als in Gruppe Responder. Insbesondere die Baselinewerte sind höher, was sich mit der aktuellen Studienlage deckt (Messwerte siehe Tab. 7 und 8). Eine höhere Messdifferenz fällt über alle drei Messungen hinweg ebenfalls zugunsten der Gruppe Non-Responder aus (wenn auch nicht signifikant).

Die Ergebnisse im hiesigen Patientenkollektiv sind passend zur aktuellen Studienlage als Trend zu werten, dass hohe Messwerte über alle 3 Messungen und eine höhere Differenz der Messwertanstiege einen Hinweis auf insuffizientes Therapieansprechen geben könnten. In Bezug auf die vorliegenden Ergebnisse wären hohe Werte ein negativ prognostischer Marker.

Ein mögliches Vorgehen könnte die Implementierung eines „Cut-off“-Wertes für die absolute Serumkonzentration von IL-8 sein.

4.1.4 Allgemeine Trends

Besonders hervorzuheben ist der Überlebensvorteil der Gruppe Responder im Vergleich zur Gruppe Non-Responder. Der Median der Responder-Gruppe in Bezug auf PFS in Wochen liegt bei 42,5; der Mittelwert bei 52,875. Der Median der Non-Responder-Gruppe in Bezug auf PFS liegt bei nur 8,5 Wochen, der Mittelwert beträgt 8,96 Wochen (siehe 3.1.2).

Trotz der kleinen Stichprobe profitieren Patientinnen und Patienten prognostisch deutlich, wenn sie der Responder-Gruppe zugeordnet werden können. Diese Differenz belegt die bessere Prognose im Hinblick auf Überleben von Patienten unter

Immuncheckpoint-Inhibitoren, die auf die Therapie ansprechen. Es zeigt umso mehr, wie wichtig die Etablierung von Markern hinsichtlich Therapieansprechen ist.

In der Gruppe Responder steigen Median und Mittelwert von BL zu 1. PT. In der Gruppe Non-Responder gibt es diesen durchgängigen Trend nicht.

Zusätzlich zeigt sich (wie unter 4.1.1 bereits erwähnt) ein statistischer Trend im Hinblick auf einen höheren Messwertunterschied von BL zu 1.PT in der Gruppe Responder im Fall von Granzym A und Perforin.

Im vorliegenden Patientenkollektiv sprechen eine Erhöhung von Median und Mittelwert der Messparameter im zeitlichen Rahmen zwischen BL und Messung 1.PT für ein besseres Outcome, allerdings ohne Signifikanz.

Im direkten Vergleich der Boxplots Responder und Non-Responder zu den Messzeitpunkten 1-3 fällt zusätzlich auf, dass die Serummesswerte in pg/ml in der Responder Gruppe zum Zeitpunkt der 2. Messung (1.PT) überwiegend höher sind, als in der Non-Responder Gruppe (siehe Tab. 7-8). Ausnahmen bilden in den vorliegenden Messergebnissen die Parameter IFN γ und IL-8 (in Non-Responder Gruppe höher). Die Messergebnisse sind nicht signifikant. Die Ergebnisse könnten in Zusammenschau ein Anhaltspunkt dafür sein, dass bereits nach einmaliger Gabe der Immuntherapie Rückschlüsse auf individuelles Ansprechen gezogen werden können.

Hohe Serumlevel sprechen auch in anderen Studien für ein besseres Outcome. Allerdings in Bezug auf Baseline-Messwerte. Hurkmans et. al. zeigen 2020 einen Zusammenhang zwischen niedrigen Serumleveln von Granzym B unter Nivolumabtherapie und schlechterem Outcome im Vergleich zu Patienten mit hohen Baseline Serumleveln (42). Die Baseline-Mittelwerte der hier vorliegenden Daten übertreffen in der Gruppe Responder nur bei Granzym B und IFN γ die Baseline-Mittelwerte der Gruppe Non-Responder.

Gibney et al. stellen ein besseres Outcome bei Patienten fest, insofern eine erhöhte Genexpression der auch in dieser Studie untersuchten Marker im prätherapeutischen Tumorgewebe gemessen wurde (IL-8 wurde nicht bestimmt) (18). Allerdings ist ein Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich, da in der genannten Studie keine Serumbiomarker bestimmt wurden.

In Zusammenschau der Ergebnisse könnte ein „niedriger“ IL-8 Wert (sowohl in Bezug auf Baseline, als auch in den Folgemessungen) in Kombination mit einem positiven Messwertverlauf (Δ) von Granzym A und Perforin von BL zu 1.PT ein prognostisch günstiger Therapieansprechen anzeigen. Im Idealfall könnte man so bereits nach einer ersten Gabe der Immuntherapie auf ein positives Ansprechen schließen.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob bei größerem Patientenkollektiv zusätzlich zu Granzym A und Perforin von BL zu 1. PT auch bei den anderen hier untersuchten potentiellen Serumbiomarkern ein statistischer Trend hin zu einem positiven Delta in der Gruppe Responder zu sehen ist. Entsprechend der aktuellen Studienlage und physiologisch wäre dies zu erwarten.

Eine bereits angesprochene Implementierung eines möglichen Cut-off-Wertes für IL-8 müsste ebenso durch ein größeres Patientenkollektiv überprüft werden. Anhand der Werte des vorliegenden Studienkollektivs kann kein statistisch solider Vorschlag für eine nähere Definition eines „hohen“ oder „niedrigen“ IL-8 Wertes getroffen werden.

Die beobachteten statistischen Trends sollten an größeren Fallkollektiven überprüft werden. Das Therapieansprechen frühzeitig valide bewerten zu können, sollte in naher Zukunft Ziel der Immuntherapie sein.

4.2 Diskussion Korrelation von Baseline-Werten mit dem Überleben

4.2.1 Überblick Ergebnisse und Einordnung im Kontext der aktuellen Studienlage

Für die Erstellung der Kaplan-Meier Kurven zur Korrelation der Baseline-Werte mit dem Überleben erfolgte keine Einteilung in Responder und Non-Responder, sondern gruppenunabhängig eine Einteilung anhand des Medians der Baseline-Werte der

einzelnen Messparameter. Hohe Serumwerte von Granzym B und IFN γ zeigen im Studienkollektiv eine Verlängerung des PFS-Intervalls (siehe Abb. 6), allerdings ohne statistische Signifikanz (Log-rank test, Granzym B: $p=0,79$; IFN γ : $p=0,56$). Bei Perforin und Granzym A scheinen niedrige Ausgangsserumwerte einen Überlebensvorteil zu bringen (Perforin: $p=0,49$; Granzym A: $p=0,73$). Ein signifikantes Ergebnis liefert der Vergleich zwischen hohen und niedrigen Baseline-Werten von IL-8 (Log-rank test: $p=0,02$).

4.2.2 Granzym B

Im Fall von Granzym B existieren bereits Daten, dass niedrige Serumlevel für ein schlechtes Therapieansprechen auf PD-1 Blockade schließen lassen (im Kontext von fortgeschrittenem non-small-cell lung cancer (NSCLC)) (42). Als Erklärungsmöglichkeit dient in diesem Fall die Beobachtung, dass ein Zusammenhang zwischen niedrigen Granzym B Serumleveln und niedrigen Immunzell-Leveln besteht, was wiederum ein Vorteil für das Tumorstadium sein könnte. Hervorzuheben ist insbesondere, dass in der genannten Studie ebenso auf Serumlevel im peripheren Blut zurückgegriffen wurde. Somit ist ein direkter Vergleich möglich.

4.2.3 Interferon γ

Das bessere Outcome von Tumorpatienten bei höherem IFN γ beobachtet bereits Higgs et al (36) (im Fall von höherer IFN γ Genexpression). Das Ergebnis des vorliegenden Patientenkollektivs spricht ebenso für einen positiv prognostischen Marker bei hohen IFN γ Werten. Allerdings ist das Ergebnis nicht signifikant und die Rolle von IFN γ bezüglich Tumorstadium bzw. -Förderung aktuell noch nicht vollends entschlüsselt. Es kann über diverse Signalwege sowohl zur Tumorstadiumsregression, als auch zum Progress führen (45). Da im vorliegenden Fall kein signifikanter Unterschied der PFS zwischen high und low IFN γ -Werten besteht, lässt sich keine allgemeingültige Aussage ableiten.

4.2.4 Granzym A und Perforin

Im Patientenkollektiv scheinen niedrige Serumausgangswerte von Granzym A und Perforin einen Überlebensvorteil zu bringen. Im Vergleich mit anderen Studien zeigen sich multiple Tendenzen. So zeigen hohe Perforin- und Granzym A-Werte im Fall eines Urothelkarzinoms der Blase und bei nicht-metastasiertem kutanen Melanom ein verlängertes overall survival (OS) (46). In derselben Studie zeigen hohe Werte der Messparameter Perforin und Granzym A bei diversen anderen Tumorentitäten wiederum ein schlechteres Outcome. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2016 im Rahmen einer Nivolumabtherapie bei metastasiertem Melanom (47) sprachen Patienten mit höheren Ausgangsleveln und im Verlauf steigenden Granzym A-Werten besser auf die Nivolumab-Therapie an und überlebten signifikant länger. Auch für Perforin existiert eine solche Studie. In einem Studienkollektiv von Patienten mit NSCLC zeigten diejenigen Patienten mit höherer Baseline-Konzentration im Rahmen einer Nivolumabtherapie vermehrt PR und SD (48).

Da die Ergebnisse im Fall von Granzym A und Perforin nicht signifikant sind, lassen sie sich maximal als Trend beobachten. Berücksichtigt man die Tatsache, dass in oben genannten Studien je nach Tumorentität hohe und niedrige Messwerte mit dem Outcome korrelieren, überrascht das nicht-signifikante Ergebnis nicht. Im vorliegenden Patientenkollektiv kommen diverse Tumorentitäten vor.

4.2.5 IL-8

Im Fall von IL-8 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen hohen und niedrigen Baseline-Werten ($p=0,022$). Hohe Baseline-Werte verkürzen im vorliegenden Patientenkollektiv das PFS. Dass Interleukin 8 in Zukunft als negativ prognostischer Marker dienen könnte, um das Therapieansprechen zu messen, wurde von Schalper et. al bereits proklamiert (20). Sollte sich herausstellen, dass die IL-8 Expression in Tumorzellen wie aktuell vermutet negative Auswirkungen auf das Therapieansprechen hat, könnten IL-8 Antikörper diesen Effekt blockieren. Der humane monoklonale Antikörper HuMax IL-8 (auch BMS-986253) wurde bereits bei

Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet und zeigt während der Therapie mehrheitlich signifikante Abfälle der Serumlevel von IL-8 (49). Frühe Änderungen der Serum IL-8 Level im Sinne von Reduktion sind im genannten Studienkollektiv stark assoziiert mit positivem Therapieansprechen und dem OS.

Eine Phase II Studie zur kombinierten Gabe von Nivolumab mit HuMax IL-8 bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung ist aktuell (Stand 05/2022) bereits gestartet, Studienergebnisse werden 06/2024 erwartet (50). Die Verlängerung des PFS bei Patienten mit niedrigen IL-8 Werten in dieser Studie ist signifikant. Es bleibt mit Spannung abzuwarten, welchen Effekt in Zukunft IL-8 Antikörper wie HuMax IL-8 erzielen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung der Serumspiegel von Granzym A/B, Perforin, IFN γ und IL-8 vor und während Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren zu evaluieren und damit ihre Rolle als eventuelle zukünftige Serumbiomarker im Hinblick auf Therapieansprechen zu untersuchen.

Es zeigt sich, dass Patientinnen und Patienten, die der Gruppe Responder zugeteilt werden konnten, einen deutlichen Überlebensvorteil hinsichtlich PFS hatten. Dies erscheint umso aussagekräftiger, da es trotz des kleinen Patientenkollektivs auffällig wird. Diese prognostische Bedeutung unterstreicht die Notwendigkeit, eine valide Etablierung von Markern hinsichtlich Therapieansprechen unter Immuncheckpointblockade zu erreichen. Die Etablierung von Serumbiomarkern als aussagekräftige Größe für individuelles Patientenansprechen wird in der modernen Tumorthherapie von essenzieller Bedeutung sein. Besonders IL-8 scheint Potential als negativ prognostischer Marker zu haben. Höhere Messwerte zeigen im Patientenkollektiv einen Überlebensnachteil, was sich mit der aktuellen Literatur deckt.

Im Fall von Granzym A und Perforin zeigt sich im direkten Vergleich der Messwertverläufe zwischen Gruppe Responder und Non-Responder im Verlauf von

BL-1.PT ein höherer Zytokinanstieg der Gruppe Responder als statistischer Trend. Ein höherer Anstieg im Vergleich zur Gruppe Non-Responder erscheint physiologisch sinnvoll im Zuge einer adäquaten Tumorbekämpfung. Die Frage, ob bei größerer Kohorte auch für die anderen potentiellen Serumbiomarker in der Responder-Gruppe ein solcher Anstieg zu beobachten wäre, bleibt in dieser Studie offen.

Die Größe der Patientenkohorte mit $n=16$ und teilweise fehlenden Verlaufsmessungen ist zu klein, um allgemeine Schlüsse zu ziehen. Die Ergebnisse können als Tendenz aufgefasst werden, die es gilt, mit größeren Kohorten zu überprüfen. Schwachpunkte der Studie sind neben der kleinen Kohorte diverse Vortherapien und unterschiedliche Tumorentitäten. Ein großer Vorteil der Studie ist die Nichtinvasivität.

Trotz der Heterogenität des Patientenkollektivs lassen sich Trends ableiten, die in Folgestudien mit größerem Patientenkollektiv wiederholt werden müssen. Besonders der deutliche Überlebensvorteil der Gruppe Responder hinsichtlich PFS unterstreicht die prognostische Bedeutung einer Etablierung von verlässlichen Serumbiomarkern unter Immuntherapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger, 2. Auflage: Springer Spektrum; 2015.
2. Li X, Shao C, Shi Y, Han W. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):31.
3. Wolchok J. Putting the Immunologic Brakes on Cancer. *Cell.* 2018;175(6):1452-4.
4. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.
5. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3(5):541-7.
6. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027-34.
7. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology.* 2001;2(3):261-8.
8. Lode HN. Tumorimmuntherapie in der pädiatrischen Onkologie. *Der Onkologe.* 2021.
9. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl:S185-S98.
10. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1865-74.
11. Gaiser MR, Bongiorno M, Brownell I. PD-L1 inhibition with avelumab for metastatic Merkel cell carcinoma. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018;11(4):345-59.
12. Markham A, Duggan S. Cemiplimab: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(17):1841-6.
13. <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-phase-iii-study-evaluating-investigational-spartalizumab-pdr001-combination-tafinlar-mekinist-advanced-melanoma> Aug 22, 2020 [
14. Altmann DM. A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumour neoantigens. *Immunology.* 2018;155(3):283-4.
15. Diesendruck Y, Benhar I. Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy-Opportunities and challenges. *Drug Resist Updat.* 2017;30:39-47.
16. Kuo CS, Wang CC, Huang YC, Pavlidis S, Liu CY, Ko HW, et al. Comparison of a combination of chemotherapy and immune checkpoint inhibitors and immune checkpoint inhibitors alone for the treatment of advanced and metastatic non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer.* 2019;10(5):1158-66.
17. Gao G, Jia K, Zhao S, Li X, Zhao C, Jiang T, et al. Analysis of the association between prior chemotherapy regimens and outcomes of subsequent anti-PD-(L)1 monotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8(6):920-8.

18. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):e542-e51.
19. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med.* 2011;9:204.
20. Schalper KA, Carleton M, Zhou M, Chen T, Feng Y, Huang S-P, et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nature Medicine.* 2020;26(5):688-92.
21. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173(5):1099-109.
22. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-65.
23. Brennan AJ, Chia J, Trapani JA, Voskoboinik I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):607-15.
24. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):388-400.
25. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8426-34.
26. Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, Lukoyanova N, Sutton VR, Law RH, et al. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood.* 2013;121(14):2659-68.
27. Larimer BM, Wehrenberg-Klee E, Dubois F, Mehta A, Kalomeris T, Flaherty K, et al. Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response. *Cancer Res.* 2017;77(9):2318-27.
28. Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 2018;9:847.
29. Nakajima C, Uekusa Y, Iwasaki M, Yamaguchi N, Mukai T, Gao P, et al. A role of interferon-gamma (IFN-gamma) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN-gamma-deficient mice. *Cancer Res.* 2001;61(8):3399-405.
30. Lee SJ, Jang BC, Lee SW, Yang YI, Suh SI, Park YM, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* 2006;580(3):755-62.
31. Curtsinger JM, Agarwal P, Lins DC, Mescher MF. Autocrine IFN-gamma promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J Immunol.* 2012;189(2):659-68.
32. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):651-8.
33. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 2006;203(4):883-95.
34. Gao Y, Yang J, Cai Y, Fu S, Zhang N, Fu X, et al. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling. *Int J Cancer.* 2018;143(4):931-43.

35. Tremblay-LeMay R, Rastgoo N, Chang H. Modulating PD-L1 expression in multiple myeloma: an alternative strategy to target the PD-1/PD-L1 pathway. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):46.
36. Higgs BW, Morehouse C, Streicher K, Rebelatto MC, Steele K, Jin X, et al. Relationship of baseline tumoral IFN γ mRNA and PD-L1 protein expression to overall survival in durvalumab-treated NSCLC patients. *Journal of Clinical Oncology.* 2016;34(15_suppl):3036-.
37. David JM, Dominguez C, Hamilton DH, Palena C. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines (Basel).* 2016;4(3).
38. Luciani MG, Stoppacciaro A, Peri G, Mantovani A, Rucio LP. The monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and interleukin 8 (IL-8) in Hodgkin's disease and in solid tumours. *Mol Pathol.* 1998;51(5):273-6.
39. Infante JR, Dees EC, Olszanski AJ, Dhuria SV, Sen S, Cameron S, et al. Phase I dose-escalation study of LCL161, an oral inhibitor of apoptosis proteins inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2014;32(28):3103-10.
40. <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Leuprorelin> 2020 [
41. Duell J, Lammers PE, Djuretic I, Chunyk AG, Alekar S, Jacobs I, et al. Bispecific Antibodies in the Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;106(4):781-91.
42. Hurkmans DP, Basak EA, Schepers N, Oomen-De Hoop E, Van der Leest CH, El Bouazzaoui S, et al. Granzyme B is correlated with clinical outcome after PD-1 blockade in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1).
43. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(4):375-91.
44. Gründker C, Läsche M, Hellinger JW, Emons G. Mechanisms of Metastasis and Cell Mobility - The Role of Metabolism. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2019;79(2):184-8.
45. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med.* 2018;7(9):4509-16.
46. Roufas C, Chasiotis D, Makris A, Efstathiades C, Dimopoulos C, Zaravinos A. The Expression and Prognostic Impact of Immune Cytolytic Activity-Related Markers in Human Malignancies: A Comprehensive Meta-analysis. *Front Oncol.* 2018;8:27.
47. Inoue H, Park JH, Kiyotani K, Zewde M, Miyashita A, Jinnin M, et al. Intratumoral expression levels of PD-L1, GZMA, and HLA-A along with oligoclonal T cell expansion associate with response to nivolumab in metastatic melanoma. *Oncoimmunology.* 2016;5(9):e1204507.
48. Ota T, Fukui T, Nakahara Y, Takeda T, Uchino J, Mouri T, et al. Serum immune modulators during the first cycle of anti-PD-1 antibody therapy in non-small cell lung cancer: Perforin as a biomarker. *Thorac Cancer.* 2020;11(11):3223-33.
49. Bilusic M, Heery CR, Collins JM, Donahue RN, Palena C, Madan RA, et al. Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):240.
50. A Study of BMS-986253 in Combination With Nivolumab or Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Cancers 2021 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03400332>.

7 Appendix

7.1 Signifikanzen

Tab. 9: Signifikanzen (p-Werte) der Gruppe Responder (Res) und Non-Responder (Non-Res) entsprechend der 3 Messzeitpunkte BL; 1.PT und 2.PT

| | GZM B | | GZM A | | IFNy | | IL-8 | | Perforin | |
|------------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|---------|--------|---------|----------|---------|
| | Res | Non-Res | Res | Non-Res | Res | Non-Res | Res | Non-Res | Res | Non-Res |
| BL-1.PT | 0,9096 | 0,4796 | 0,2528 | 0,7883 | 0,5692 | 0,334 | 0,5082 | 0,3233 | 0,3821 | 0,7346 |
| 1.PT-2.PT | 0,8606 | *0,0391 | 0,2432 | *0,0496 | 0,4079 | 0,5488 | 0,4603 | 0,5214 | 0,9725 | 0,9332 |
| BL-2.PT | 0,7791 | 0,4796 | 0,1749 | 0,067 | 0,5918 | 0,334 | 0,333 | 0,8064 | 0,4148 | 0,7177 |

In Tabelle A1 ist der jeweils gruppeninterne Messwertverlauf (innerhalb der Gruppe Responder und Non-Responder) anhand der p-Werte zwischen zwei Messungen dargestellt. Die mit Stern markierten p-Werte sind signifikant, dies ist auf die folgenden Tabellen übertragbar.

Tab. 10: Signifikanzen (p-Werte) zwischen Gruppe Responder und Non-Responder zu allen drei Messzeitpunkten

| | BL | 1.PT | 2.PT |
|------------------|--------|--------|--------|
| Granzym B | 0,1518 | 0,092 | 0,4182 |
| Granzym A | 0,8881 | 0,18 | 0,315 |
| IFNy | 0,3086 | 0,4592 | 0,4575 |
| IL-8 | 0,3462 | 0,2834 | 0,4969 |
| Perforin | 0,3726 | 0,7417 | 0,8153 |

Tabelle A2 zeigt die p-Werte von Gruppe Responder und Non-Responder im direkten Vergleich zum gleichen Messzeitpunkt (jeweils für BL, 1.PT und 2.PT) für jeden untersuchten potentiellen Serumbiomarker.

Tab. 11: Signifikanzen (p-Werte) Kaplan-Meier Kurven. Einteilung in Responder und Non-Responder anhand des Medians der Baseline-Werte der einzelnen Parameter

| | |
|------------------|----------------|
| Granzym B | 0,7906 |
| Granzym A | 0,7341 |
| IFNy | 0,5644 |
| IL-8 | *0,0228 |
| Perforin | 0,4975 |

Tabelle A3 zeigt die p-Werte der Kaplan-Meier Kurven. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass die Einteilung in diesem Fall nicht wie in den vorangegangenen Analysen auf der Gruppeneinteilung Responder und Non-Responder beruht, sondern die Unterteilung des Kollektivs anhand des Medians der Baseline-Werte erfolgte.

Tab. 12: Differenz der Messwertverläufe zwischen den Gruppen Responder und Non-Responder aufgeteilt nach Messzeitpunkten

| Delta Messwertverlauf Gruppe Responder/Non-Responder | | | |
|---|------------------|--------------------|------------------|
| | Δ BL-1.PT | Δ 1.PT-2.PT | Δ BL-2.PT |
| Granzym B | p=0,4113 | p=0,13373 | p=0,5636 |
| Granzym A | p=0,1494 | p=0,2026 | p=0,3236 |
| IFNy | p=0,6435 | p=0,2076 | p=0,1978 |
| IL-8 | p=0,4022 | p=0,4528 | p=0,5729 |
| Perforin | p=0,1838 | p=*0,0246 | p=0,5678 |

Tabelle A4 zeigt p-Werte des direkten Vergleichs der Messwertverläufe im Sinne einer Messwertdifferenz (Δ) zwischen Gruppe Responder und Non-Responder im Intervall zwischen den einzelnen Messungen.

7.2 Dokumente zum Studienablauf

Flyer für die Ambulanzen

Einrichtungen: Experimentelle Tumorummunologie der Frauenklinik, Early Clinical Trial Unit (ECTU) des CCC Mainfranken, Medizinische Klinik II Medical Oncology (ZIM) 9.11.2017

Biomarker bei Immuntherapie (BioImmun-Studie)

Beobachtungsstudie zur Analyse von Botenstoffen des Immunsystems im Blut von Patienten mit soliden Tumoren

Bitte kontaktieren Sie uns VOR dem Therapiestart mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Vielen Dank!

Im Zuge dieser Beobachtungsstudie sollen die Serumspiegel von bestimmten Botenstoffen des Immunsystems (MIC-1/GDF-15, Interferon- γ , Perforin, Granzym A/B) vor und während der immunologisch-vermittelten Therapie untersucht werden. Insgesamt handelt es sich um **drei Blutentnahmen (vor Therapie, 2-4 Wochen und ca. 12 Wochen nach Therapiestart)**. Die Serumspiegel sollen in 2 Patientenkollektiven untersucht werden:

- 1) Patientinnen, die für eine anti-HER2-neu Therapie in Frage kommen.
- 2) Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die für eine Immuncheckpoint-Inhibition qualifizieren.

Hierbei sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen:

Bitte kontaktieren Sie uns VOR dem Therapiestart mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, damit wir bei Einwilligung der Patienten die erste Blutentnahme vornehmen können.

Kontaktdaten der Doktorandinnen:

Anne Brückner: [REDACTED], anne_brueckner1@gmx.de

Dorothea Dombrowski: [REDACTED], bioimmun@dorotheadombrowski.de

Tanja Leyh: [REDACTED], Tanjaleyh@gmx.de

Studienleiter (für eventuelle Rückfragen)

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen [REDACTED]

Prof. Dr. med. V. Kunzmann [REDACTED]



Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme

1 / 2

**Biomarker bei Immuntherapie (Bioimmun-Studie):
Beobachtungsstudie zur Analyse von Botenstoffen des Immunsystems im Blut
von Patienten mit soliden Tumoren**

Version 1.2 vom 01.08.2017

Studienleiter:

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

Prof. Dr. med. V. Kunzmann

Prüfärzte: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen, Dr. M.E. Goebeler, Prof. Dr. V. Kunzmann

Kontakt:

(Original für den/die Studienteilnehmer/in, Kopie für die Krankenakte)

Patient/in: _____
(Name, Vorname)

Geb.-Datum: _____

Adresse: _____

Prüfarzt/Prüfärztin: _____

Ich bin durch den behandelnden Arzt / behandelnde Ärztin über Ziel, Wesen, Bedeutung und Tragweite dieser nicht-interventionellen Studie aufgeklärt worden und hatte Gelegenheit, solange Fragen zu stellen, bis ich alle Punkte verstanden habe. Die von mir gestellten Fragen wurden beantwortet. Außerdem habe ich die vorangehende schriftliche Patienteninformation erhalten und gelesen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser Studie frei zu treffen.

Ich bin einverstanden, an dieser Studie teilzunehmen.

Ich weiß, dass meine Teilnahme an der Studie vollkommen freiwillig ist und ich diese Einverständniserklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen. Sollte ich die Studie abbrechen, werde ich dies dem behandelnden Arzt mitteilen.

- Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten im Zusammenhang mit dieser Untersuchung gespeichert, verarbeitet und in pseudonymisierter Form an die an der Durchführung und Auswertung dieser Studie beteiligten Personen weitergegeben werden darf. Dabei werden die Bestimmungen des

Version 1.2 vom 01.08.17

geltenden Datenschutzes und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Ich bin über die Möglichkeit, dass autorisierte Personen von Seiten zuständiger Behörden unter Wahrung der Vertraulichkeit falls erforderlich in Originalbefunde Einsicht nehmen können, informiert worden und erkläre mich damit einverstanden. Entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen kann eine Weitergabe der im Rahmen der Studie erfolgenden Aufzeichnung von Krankheitsdaten zur Überprüfung an die zuständigen Behörden erfolgen. Das zugehörige Kapitel "Datenverarbeitung und Datenschutz" der Patienteninformation zu dieser Studie habe ich gelesen und stimme dem beschriebenen Vorgehen zu.

Eine Kopie dieser Einverständniserklärung habe ich erhalten.

Datum - vom Studienteilnehmer einzutragen

Unterschrift des/der Studienteilnehmer/in

Der Patient/die Patientin wurde von mir über Ziel, Wesen, Bedeutung, Tragweite sowie etwaige Risiken der Studie aufgeklärt.

Datum

Unterschrift des Prüfarztes / der Prüfarztin

7.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| 1.PT | <i>1. Post-Treatment</i> |
| 2.PT | <i>2. Post-Treatment</i> |
| Abb. | <i>Abbildung</i> |
| AK | <i>Antikörper</i> |
| APC | <i>antigenpräsentierende Zelle</i> |
| BiTE-Antikörper | <i>bispecific T-cell engager</i> |
| BL | <i>Baseline</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen</i> |
| ECTU | <i>Early Clinical Trial Unit</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| EMT | <i>epithelial mesenchymal transition</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGFRI | <i>Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor</i> |
| ICB | <i>Immunecheckpoint Blockade</i> |
| IFN γ | <i>Interferon γ</i> |
| IL-8 | <i>Interleukin 8</i> |
| IL-8R | <i>Interleukin 8 Rezeptor</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| NKT-Zellen | <i>Natürliche Killer-T-Zellen</i> |
| NK-Zellen | <i>Natürliche Killerzellen</i> |
| NSCLC | <i>non-small-cell lung cancer</i> |
| NW | <i>Nebenwirkungen</i> |
| OS | <i>overall survival</i> |
| PD-1 | <i>programmed death protein 1</i> |
| PD-L1 | <i>programmed cell death 1 ligand</i> |
| PD-L2 | <i>programmed cell death 2 ligand</i> |
| PFS | <i>progression free survival</i> |
| PR | <i>partial response</i> |
| SD | <i>stable disease</i> |
| Tab. | <i>Tabelle</i> |
| TCR | <i>T-Zell-Rezeptor</i> |
| TILs | <i>tumorinfiltrierende Lymphozyten</i> |
| TME | <i>tumor microenvironment</i> |
| TNM | <i>Tumor, Nodus, Metastasen</i> |
| UICC | <i>Union internationale contre le cancer</i> |

7.4 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Darstellung Immuncheckpoint CTLA-4 und PD-1 mit Beispielen von Inhibitoren, aus „Tumorimmuntherapie in der pädiatrischen Onkologie“ (Der Onkologe, 05.01.2021) | 3 |
| Abb. 2: Verteilung Tumorentitäten im Patientenkollektiv. CUP: cancer of unknown primary..... | 18 |
| Abb. 3: Anzahl und Art Vortherapien vor Einschluss in Studie, Definition AK und Andere siehe Tab. 2 | 19 |
| Abb. 4: Messung BL, 1.PT und 2.PT der Gruppe Res (Responder) und nonRes (nonResponder)..... | 26 |
| Abb. 5: direkte Gegenüberstellung der Messergebnisse Gruppe Non-Responder (nonRes) und Gruppe Responder (Res) zu allen 3 Messzeitpunkten..... | 29 |
| Abb. 6: Δ des Messwertverlaufs zwischen Respondern und Non-Respondern von Baseline-Messung auf 1.PT. Grün= Responder; rot= Non-Responder..... | 31 |
| Abb. 7: Vergleich zwischen low (blau) und high (rot) Baseline Werten hinsichtlich PFS..... | 33 |
| Abb. 8: Nebenwirkungen (NW) Immuntherapie im Patientenkollektiv: grün= keine NW; rot= NW | 34 |
| Abb. 9: Aufführung von Nebenwirkungen unter ICB im Patientenkollektiv mit Angabe der Häufigkeit | 35 |

7.5 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: durch die FDA zugelassene Immuncheckpointinhibitoren nach Zulassungsjahr | 4 |
| Tab. 2: Aufführung der verwendeten ELISA-KITs inklusive enthaltener Komponenten | 11 |
| Tab. 3: Studienkollektiv mit Tumordiagnose, Tumorstadium/Therapie vor Einschluss, ICB und Therapieansprechen..... | 17 |
| Tab. 4: Darstellung progressionsfreies Überleben der Gruppe Responder | 20 |
| Tab. 5: Darstellung progressionsfreies Überleben der Gruppe Non-Responder | 20 |
| Tab. 6: Messwerte ELISA gesamtes Patientenkollektiv, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern), PT= Post Treatment..... | 22 |
| Tab. 7: Messwerte ELISA Gruppe Responder, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern) | 23 |
| Tab. 8: Messwerte ELISA Gruppe non-Responder, x= keine Messung vorhanden. SD= Standardabweichung (in Klammern), IQR= Interquartilsabstand (in Klammern) | 24 |
| Tab. 9: Signifikanzen (p-Werte) der Gruppe Responder (Res) und Non-Responder (Non-Res) entsprechend der 3 Messzeitpunkte BL; 1.PT und 2.PT | 48 |
| Tab. 10: Signifikanzen (p-Werte) zwischen Gruppe Responder und Non-Responder zu allen drei Messzeitpunkten | 48 |
| Tab. 11: Signifikanzen (p-Werte) Kaplan-Meier Kurven. Einteilung in Responder und Non-Responder anhand des Medians der Baseline-Werte der einzelnen Parameter | 49 |
| Tab. 12: Differenz der Messwertverläufe zwischen den Gruppen Responder und Non-Responder aufgeteilt nach Messzeitpunkten | 49 |

IV Danksagung

Ich danke von Herzen Hr. Prof. Kunzmann und Fr. Dr. Göbeler, die bei all meinen Anliegen und vielen organisatorischen Fragen im Rahmen der Dissertation stets hilfsbereit und zeitnah geantwortet haben und ein offenes Ohr hatten. Zusätzlich danke ich dem gesamten Team der ECTU der Uniklinik Würzburg für die große Hilfsbereitschaft und spontane Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zu jeder Tageszeit. Auch dem Team der Chemoambulanz der Frauenklinik gilt mein Dank für Freundlichkeit und Eigeninitiative. Auch meinen beiden Mitstreiterinnen T. Leyh und D. Dombrowski bin ich zu großem Dank verpflichtet. Tanja für die gesamte Vorarbeit inklusive Ethikvotum und Dorothea für die partnerschaftliche Rekrutierung von Patienten. Ich danke meiner Familie und meinen engen Freunden, die schon zum Zeitpunkt der Bewerbung für ein Medizinstudium an mich geglaubt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt Marc und meiner liebsten Masha. Marc danke ich für viel Geduld und die Überlassung des innig geliebten PC. Masha danke ich für die Wärme auf meinem Schoß während dem Arbeiten an der Dissertation und all die Liebe, die sie während ihres Lebens gespendet hat.

Ohne die genannten Personen und Masha wäre es für mich niemals möglich gewesen, die Dissertation neben dem Arbeitsalltag zu beenden.