

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom mit
autologen, Tumorlysat-beladenen dendritischen Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Samira Saraj
aus München
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Eigler

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Enrico De Toni
PD Dr. med. Sebastian Kobold

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christian Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	5
1.2. Optionen der onkologischen Pankreaskarzinomtherapie	6
1.3. Immuntherapie mit dendritischen Zellen	6
1.4. Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie	8
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	9
2.1. Präoperative Patientenrekrutierung.....	9
2.2. Studiendesign	11
2.3. Herstellung der Vakzine	12
2.4. Darreichung der Vakzine.....	13
2.5. Feststellung unerwünschter Wirkungen	14
2.6. Klinische Antwort und Toxizitätskriterien	15
2.7. Hypersensitivitätshauttest vom verzögerten Typ.....	16
2.8. Lymphozyten-Proliferations-Assay	16
2.9. ELISPOT-Assay	17
2.10. Statistiken.....	18
3. Ergebnisse.....	18
3.1. Patientencharakteristiken und Ergebnisse der DC-Generierung.....	18
3.2. Klinische Ergebnisse der DC Vakzinierungs-Therapie.....	21
3.3. Korrelation einer initial bestehenden Tumor-reaktiven T-Zell-Antwort mit der Überlebenszeit.....	22
3.4. Antitumor-Immunantwort trotz begleitender Chemotherapie.....	23

3.5. Korrelation von klinischer und immunologischer Antwort	31
4. Diskussion	33
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	33
4.2. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur.....	34
4.2.1. Bewertung der Überlebensdaten	34
4.2.2. Parameter DC-induzierter Tumor-Immunantworten.....	35
4.2.3. Einfluss begleitender Chemotherapie auf die Immunantwort.....	37
4.3. Klinische Relevanz der vorgelegten Arbeit.....	39
5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung.....	40
6. Literaturverzeichnis.....	42
7. Anlagen	46
8. Abkürzungsverzeichnis.....	48
9. Curriculum vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10. Danksagung	49
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	50

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist die fünfthäufigste Todesursache bei Krebspatienten in der westlichen Welt (Ozols et al., 2007). Über 95 Prozent der Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome und entstehen durch maligne Entartung des exokrinen Anteils des Pankreas. Nach derzeitigem Wissensstand entsteht das exokrine Pankreaskarzinom aus prämalignen Vorstufen des Epithels im Pankreasgangsystem (PanIN, *pancreatic intraepithelial neoplasia*). Seltener sind zystische Tumore, die ebenfalls aus den Gangzellen hervorgehen, oder azinäre Tumore, die von den Sekret-produzierenden Parenchymzellen des Pankreas ausgehen. Noch seltener sind endokrine Tumore, die sich von den endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln ableiten. In Deutschland erkranken jährlich etwa 12.800 Menschen am Pankreaskarzinom. Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen. Das Pankreaskarzinom nimmt bei Männern den neunten Platz und bei Frauen den siebten Platz in der Statistik der Krebsneuerkrankungen in Deutschland ein (Adler et al., 2007).

Die meisten Betroffenen erkranken im höheren Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 und für Frauen bei 75 Jahren. Als Todesursache rangiert das Pankreaskarzinom mit etwa 12.100 Verstorbenen im Jahr 2000 an fünfter Stelle und ist damit ursächlich für etwa sechs Prozent aller Krebstodesfälle. Damit liegt die Inzidenz des Pankreaskarzinoms sehr nahe bei der jährlichen Mortalitätsrate und ein Langzeitüberleben ist die Ausnahme. Entsprechend ist die 5-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom mit 4% die geringste aller Krebserkrankungen. Ursächlich dafür sind die späte Diagnosestellung, die daraus folgende geringe kurative Resektionsrate und die schnelle und aggressive Metastasierung (Banchereau et al., 2000).

1.2. Optionen der onkologischen Pankreaskarzinomtherapie

Seit 1997 gilt Gemcitabin als Standardchemotherapeutikum beim fortgeschrittenem Pankreaskarzinom (Burris et al., 1997; Rothenberg et al., 1996). Gemcitabin (2',2'-Difluorodesoxycytidin) ist ein Nukleosid aus Cytosin und einer difluorierten Desoxyribose. Die bisherigen Studien konnten bei der Kombination von Gemcitabin mit anderen Chemotherapeutika keinen eindeutigen Überlebensvorteil zeigen (Louvet et al., 2005). Kürzlich wurde berichtet, dass eine Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil und Leucovorin (FOLFIRINOX) der Gemcitabin-Therapie überlegen ist (Conroy et al., 2011). Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils ist FOLFORINOX jedoch wohl nur für einen Teil der Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom eine mögliche Therapieoption. Alternative Therapiemöglichkeiten werden dringend benötigt. Die Immuntherapie mit tumorbeladenen dendritischen Zellen (DC) scheint ein vielversprechender Ansatz in der Karzinomtherapie zu sein. Kürzlich zeigte Sipuleucel-T, eine autologe, zelluläre Immuntherapie einen Nutzen bei der Behandlung von metastasiertem Prostatakarzinom bei Männern (Kantoff et al., 2010).

1.3. Immuntherapie mit dendritischen Zellen

DC sind Antigen-präsentierende Zellen (APC), die darauf spezialisiert sind eine T-Zell-Antwort gegen antigene Strukturen, vor allem auch Tumorantigene, zu aktivieren (Steinman and Banchereau, 2007). DC zeichnen sich im Vergleich zu anderen Antigen-präsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen) durch ihre einzigartige Fähigkeit aus, naive T-Zellen zu primen und zu stimulieren. *In vitro* aus Monozyten generierte DC sind in der Lage Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen zu präsentieren. Nach mikrobieller Stimulation (z.B. durch Bestandteile der Bakterienzellwand wie Lipopolysaccharide) oder nach Inkubation mit körpereigenen entzündungsfördernden Mediatoren (z.B. TNF- α , IFN- γ) reifen DC aus, verlieren die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und exprimieren kostimulatorische Moleküle (Banchereau et al., 2000). Durch Präsentation antigener Peptide über MHC-I-Moleküle

können sie eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort und über MHCI-gebundene Peptide eine T-Helferzell-Antwort induzieren. Die Fähigkeit *in vitro* generierter DC, eine spezifische antitumorale Immunantwort zu induzieren, ist im Tiermodell und in klinischen Studien nachgewiesen worden. Über schwere Nebenwirkungen wurde in den bisher durchgeführten Studien nicht berichtet. Tumor-assoziierte Antigene können DC in verschiedener Form dargeboten werden: als Peptide bekannter Sequenz, als autologe und allogene Tumorzellpräparationen, als Fusionszellen aus allogenen DC und autologen Tumorzellen, sowie in Form von Tumorzell-RNA, also als für spezifische Antigene codierende RNA.

Nestle und Mitarbeiter berichteten 1998 über die erfolgreiche Tumortherapie von Patienten mit metastasiertem Melanom mit autologen DC, die mit Tumorzell-Lysat inkubiert worden waren (Nestle et al., 1998). Im Rahmen des vorliegenden Projektes sollte dieses Therapieprinzip auf Patienten mit primär inoperablem Pankreaskarzinom (intraoperativ als inoperabel erkannt, Gewinnung von Tumorgewebe möglich) oder sekundär metastasiertem Pankreaskarzinom übertragen werden. Im Gegensatz zum malignen Melanom stellt das Karzinom des exokrinen Pankreas keinen hoch immunogenen Tumor dar. Allerdings sind zahlreiche Tumor-assoziierte Antigene (CA19-9, Span-1, Dupan-2, CA 50), ein bekanntes Onkprotein (K-ras-Mutation) sowie onkofetale Antigene (CEA, pankreatisches onkofetales Antigen) beschrieben. Hypothetisch bilden alle diese Antigene Angriffspunkte für zytotoxische T-Lymphozyten. Jedoch können DC in der Umgebung des Tumors auch funktionell schädlich sein, da sie den Tumor zur Induktion immunsuppresiver Zytokine wie TGF- β und IL-10 anregen (Chaux et al., 1997; Troy et al., 1998). Diesen Prozess kann man umgehen, indem man DC aus peripherem Blut generiert und sie mit proinflammatorischen Mediatoren *in vitro* stimuliert. Zahlreiche Parameter bestimmen den klinischen Nutzen der DC-basierten Vakzinierung, einschließlich des DC-Subtyps und des Reifungsstatus. Aber auch die Herkunft des Tumorantigens ist wichtig (Dauer et al., 2008; Dauer et al., 2003).

Das Protein *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) wurde als stark immunogenes Adjuvans beschrieben. Bei gleichzeitiger Beladung der DC mit Tumorsatz und KLH entwickelte

sich eine stärkere T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen (Schnurr et al., 2001). Eine starke T-Zell-Antwort ist ein günstiger prognostischer Marker bei Patienten mit Pankreaskarzinom (Fukunaga et al., 2004). Tumor-reaktive T-Zellen konnten aus dem peripheren Blut von Patienten mit Pankreaskarzinom isoliert werden (Schmitz-Winnenthal et al., 2005).

1.4. Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie

Obgleich die Kombination einer immunstimulierenden Therapie wie der DC-Vakzinierung und einer immunsuppressiven Chemotherapie kontraintuitiv erscheint, zeigen neuere Daten, dass die Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie einen synergistischen Effekt besitzt (Zitvogel et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin die Effektivität anderer Therapiestrategien, so einer *in vivo* CD40-Aktivierung, steigert (Hou et al., 2005; Nowak et al., 2002; Plate et al., 2005). Nowak et al. zeigten, dass Gemcitabin die Antigenaufnahme von apoptotischen Tumorzellen durch DC steigert und somit die Antitumor-T-Zellantwort *in vivo* steigert (Nowak et al., 2003). In Mäusen reduziert Gemcitabin eine Population CD11b⁺Gr-1⁺ Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften, die als myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) bezeichnet werden (Sinha et al., 2007; Suzuki et al., 2005).

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen die Gemcitabin ausgesetzt sind durch T-Zellen vermehrt zytotoxisch lysiert werden (Dauer et al., 2005). In einem Mausmodell wurde Pankreastumor mit DC-basierter Vakzinierung in Kombination mit Gemcitabin behandelt. Die Kombination beider Strategien erhöhte das Überleben der Mäuse (Bauer et al., 2007). Ghansah et al. zeigten kürzlich, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Gemcitabin-vermittelten Suppression von MDSC und besserem Überleben in einem murinen Pankreaskarzinommodell (Ghansah et al., 2013). Auch in der Therapie von Patienten findet die bewusste Kombination von Chemotherapie und Immuntherapie zunehmend Anwendung. Vor kurzem berichtete eine japanische Gruppe von der Kombination von

Gemcitabin mit einer Immuntherapie aus DC-Vakzinierung und Infusion von Lymphokine-aktivierten Killerzellen bei fünf Patienten mit Pankreaskarzinom (Hirooka et al., 2009).

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In dieser Phase-II-Studie wurden Anwendbarkeit, Toxizität und klinische Wirkung von autologen Tumорlysat-beladenen DC bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom untersucht. Durch Etablierung T-Zell-basierter *ex vivo*-Assays wurden Instrumente zum Monitoring der DC-induzierten Tumor-spezifischen Immunantwort geschaffen. Besonderes Augenmerk wurde gerichtet auf die Möglichkeit der Induktion T-Zell-vermittelter Immunantworten im Verlauf der DC-Vakzinierung unter gleichzeitiger Chemotherapie mit Gemcitabin.

2. Material und Methoden

2.1. Präoperative Patientenrekrutierung

Diese Studie wurde an der Universität München zwischen Juli 2002 und Dezember 2009 durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission der Universität München genehmigt (Projektnummer 245/98). Patienten, bei denen bei hochgradigem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom eine chirurgische Sanierung per Whipple-Operation oder eine Explorativlaparotomie geplant waren, wurden über die Art, den möglichen Nutzen sowie mögliche Risiken und Nebenwirkungen einer DC-Vakzine-Therapie aufgeklärt. Die Patienten wurden auch über die Möglichkeit des freiwilligen Ausscheidens aus der Studie informiert. Die Aufklärung erfolgte durch den behandelnden Arzt in mündlicher und schriftlicher Form. Den Patienten wurde in ausreichendem Masse die Möglichkeit gegeben, sich über Detailfragen der geplanten

Untersuchung zu informieren. Im Anschluss erfolgte nach schriftlicher Einwilligung die Aufnahme in die Studie. Die schriftliche Einwilligung der Patienten wurde von der Studienleitung archiviert. Die Rekrutierung der letztlich in die Studie eingeschlossenen Patienten erfolgte von Juli 2005 bis September 2007. Eine Versicherung für die teilnehmenden Patienten wurde vor Beginn der Studie abgeschlossen.

Im Studienprotokoll wurden drei Stufen des Studieneinschlusses definiert: Stufe-I-Kriterien mussten bereits vor der Operation erfüllt sein und wurden bei Erstvorstellung überprüft. Einschlusskriterium für die DC-Vakzinierung war ein Alter von 18 Jahren oder älter, ein Karnofsky Index von 60% oder höher, eine geschätzte Lebenserwartung von mindestens drei Monaten sowie eine ausreichende Nierenfunktion (Kreatinin unter 1,5 mg/dl). Ausschlusskriterien beeinhalteten eine Schwangerschaft, schwere kardiale oder psychische Erkrankungen, HIV-Infektion, Hepatitisinfektion, Behandlung mit Kortikosteroiden oder anderen immunsuppressiven Medikamenten, schwere Infektion, Unmöglichkeit der regelmäßigen Nachuntersuchung und das Vorhandensein von sekundären Malignomen.

Stufe II setzte sich aus dem Einschluss in Stufe I und der Histologie „Karzinom des exokrinen Pankreas“ zusammen. Die Patienten wurden dann postoperativ durch den Hausarzt oder über die gastroenterologische Ambulanz der Medizinischen Klinik Innenstadt nachbeobachtet (**Abb. 1**). Alle zwei Monate erfolgten körperliche Untersuchung, Bestimmung der Tumormarker und eine Sonographie des Abdomens.

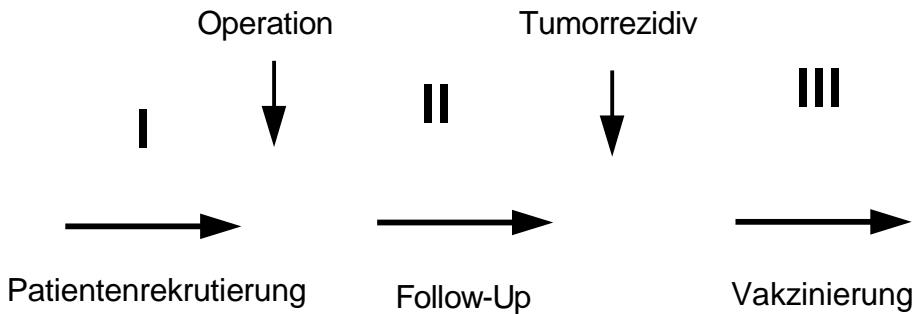


Abb. 1: Schema des Patienteneinschlusses. Patienten mit einem bestätigten Pankreas-Adenokarzinom wurden engmaschig postoperativ beobachtet und auf das Vorhandensein von Metastasen und Lokalrezidiven überwacht. Die Vakzinierung wurde nach Rekurrenz der Erkrankung begonnen.

2.2. Studiendesign

Die Untersuchung war initial als offene Phase-II-Studie mit nach Fallschätzung 14 Patienten pro Kohorte veranschlagt worden, wobei eine Patientengruppe DC-Therapie in Kombination mit Gemcitabin, die andere Kohorte ohne Gemcitabin erhalten sollte. Nachdem das initiale Studiendesign noch aus den Jahren direkt nach der wegweisenden Burris-Studie von 1997 (Burris et al., 1997) stammte, schien ein Verzicht auf Gemcitabin-Therapie in einem Studienarm ethisch vertretbar. Bis zum Einschluss der ersten Patienten im Jahr 2005 hatte sich die Evidenz für die Wirksamkeit der palliativen Chemotherapie mit Gemcitabin jedoch so weit gefestigt und sich Gemcitabin als relativ nebenwirkungsarme Standardtherapie etabliert, dass ein Verzicht auf Gemcitabin-Therapie in der palliativen Situation ethisch unvertretbar erschien. Es wurde daher entschieden alle eingeschlossenen Patienten mit der Kombination von DC-Therapie und Gemcitabin zu behandeln und den Aspekt der Studie auf das Immun-Monitoring vor und nach DC-Therapie zu verlagern.

Die Patienten wurden zunächst dreimal im Abstand von zwei Wochen und anschließend im monatlichen Abstand bis zur achten Impfung im sechsten Monat vakziniert. War vier oder sechs Monate nach Therapiebeginn eine komplette oder partielle Remission oder

ein geringes Ansprechen, beziehungsweise nach sechs Monaten eine stationäre Erkrankung nachweisbar, wurde die Gabe nach dem sechsten Monat in monatlichem Abstand bis zu einem Jahr im Rahmen dieser Studie durchgeführt. Danach konnte die Gabe bei Wunsch des Patienten und nach Maßgabe des behandelnden Arztes weiterhin in monatlichem Intervall außerhalb der Studie fortgeführt werden.

2.3. Herstellung der Vakzine

Jeweils eine Woche vor Gabe der DC wurde den Patienten 100 ml Venenblut entnommen. Zunächst wurden humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten über eine Gradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany) isoliert. Nach dreimaligem Waschen in isotoner steriler Kochsalzlösung wurden die Zellen in serumfreiem Medium aufgenommen, supplementiert mit 2% autologem Serum sowie 50 Units pro ml Penicillin (Sigma, Munich, Germany) und 2mM L-Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Anschließend wurden die mononukleären Zellen für eine Stunde bei 37°C in Kulturflaschen inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Adhäsion der Monozyten am Plastikboden der Kulturflaschen. Die nicht-adhärenen Zellen wurden geerntet und bei minus 80°C zur späteren Verwendung für *in vitro*-Untersuchungen an T-Zellen eingefroren. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die initial adhärenen Zellen gewaschen, in einer Konzentration von 10⁶/ml in komplettem Medium aufgenommen und für fünf Tage in 6-well-Kulturplatten mit GM-CSF (Cellgenix, Freiburg, Germany, 1000 U/ml) und IL-4 (Cellgenix, Freiburg, Germany, 500 U/ml) kultiviert.

Zur Herstellung der Vakzine wurde autologes Tumormaterial eingesetzt. Ein Teil des bei der Operation eines Patienten mit Verdacht auf Pankreaskarzinom entnommenen Gewebes wurde durch den zuständigen Pathologen makroskopisch beurteilt und als Tumorgewebe freigegeben. Das Tumorgewebe wurde ausgiebig in steriler, phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend unter Zugabe von serumfreiem Medium mechanisch zerkleinert. Die Lyse der Tumorzellen erfolgte durch

fünf aufeinander folgende Frier-/Tauzyklen bei minus 80°C bzw. Raumtemperatur. Das Tumorzell-Lysat wurde durch Zentrifugation von Zelldebris und größeren Gewebefragmenten getrennt und über einen Filter von 0,2 µm Porengröße steril filtriert. Photometrisch wurde die Proteinkonzentration des Tumorzell-Lysats bestimmt.

Die DC wurden am sechsten Tag für vier Stunden mit autologem Tumorzell-Lysat (50-150 µg/mL) bei 37°C inkubiert und anschließend für weitere 24 Stunden mit TNF- α (Cellgenix, Freiburg, Germany, 1000 U/mL) und PgE₂ (Pharmacia und Upjohn, London, UK, 1µM) stimuliert. Die Inkubation wurde in Anwesenheit von KLH (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA, 25 µg/mL) durchgeführt. KLH ist ein hoch immunogenes Neo-Antigen, das über starke T-Helfer-Zell-aktivierende Eigenschaften verfügt. Es diente außerdem als Tracer-Molekül, um mittels Hauttest (DTH) die Induktion einer spezifischen Immunantwort zu überprüfen.

2.4. Darreichung der Vakzine

Vor der Injektion wurden die DC in sterilem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und in 1 mL Ringer-Lactat-Lösung mit 1% autologem Serum aufgenommen. Zur Qualitätskontrolle wurde an einem Aliquot dieser Zellsuspension die Expression der Oberflächenmarker MHCII, CD80, CD83, CD86 und CD14 (alle BD Biosciences, Heidelberg, Germany) durchflusszytometrisch bestimmt und ein weiteres Aliquot auf mikrobielle Kontamination getestet. Die Gabe der DC erfolgte durch intrakutane Injektion der Zellsuspension in der Nähe eines Leistenlymphknotens. Die Patienten wurden für die ersten drei Vakzinierungen alle zwei Wochen therapiert. Danach wurde die DC-Vakzine alle vier Wochen verabreicht (**Abb. 2**). Die Vakzinierung erfolgte ambulant.

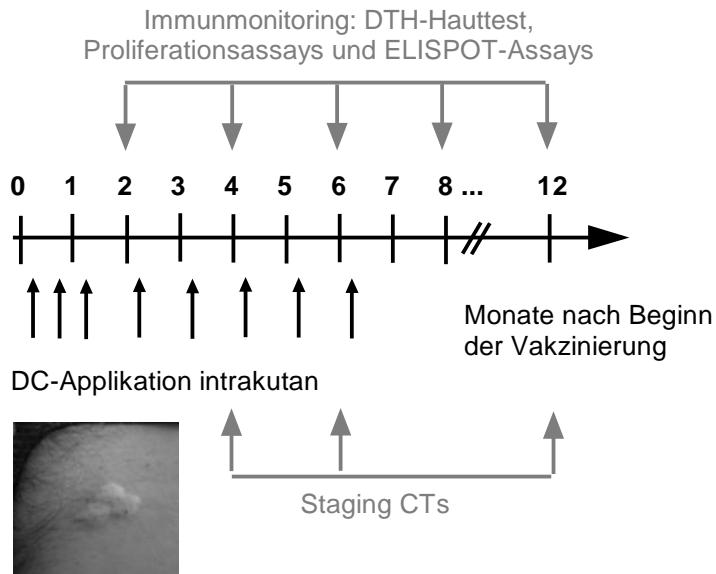


Abb. 2: Studienprotokoll. Patienten erhielten DC in zweiwöchigen Abständen für die ersten sechs Wochen, dann einmal alle vier Wochen. DC wurden intrakutan in der Nähe der Leistenlymphknoten injiziert. Es fanden regelmäßige Untersuchungen zum klinischen Verlauf und zum Immunmonitoring statt.

Das Studienprotokoll erlaubte eine gleichzeitige Gabe des Chemotherapeutikums Gemcitabin in einer Dosis von 1000 mg/m^2 Körperoberfläche wöchentlich. Gemcitabin und DC-Vakzinierung wurden aus logistischen Gründen am gleichen Tag verabreicht. Im Falle einer Tumorprogression während der DC-Vakzinierungstherapie wurde das Chemotherapieregime mit dem Einverständnis des Onkologen, des Hausarztes und des Patienten angepasst.

2.5. Feststellung unerwünschter Wirkungen

Das Auftreten unerwünschter Wirkungen wurde bei jeder Vorstellung des Patienten vom behandelnden Arzt erfragt und gegebenenfalls dokumentiert. Als weitere Maßnahmen zur Dokumentation unerwünschter Wirkungen dienten körperliche Untersuchung, Laborparameter und bildgebende Verfahren gemäß des Studienplans. Art, Schwere

und der Zeitpunkt des Auftretens unerwünschter Wirkungen wurden entsprechend den WHO-Toxizitätskriterien klassifiziert und dokumentiert.

2.6. Klinische Antwort und Toxizitätskriterien

Hauptendpunkt war die Zahl der partiellen oder kompletten Remissionen, des geringgradigen Ansprechens (*minor response*) sowie der progressionsfreien Krankheitsverläufe (*stable disease*). Die Standarddefinitionen für partielle und komplett Remission wurden angewendet: Eine komplett Remission wurde definiert als die vollständige Rückbildung aller Tumormanifestationen. Eine partielle Remission lag vor bei mindestens 50% Rückgang der Tumormasse, die länger als einen Monat anhielt. Ein geringes Ansprechen war definiert als 25 bis 50% Größenabnahme aller Herde für mindestens einen Monat oder mehr als 50% Größenabnahme für weniger als einen Monat. Stationäre Erkrankung wurde definiert als weniger als 25% Veränderung der Größe, ohne Auftreten neuer Herde im Verlauf von 6 Monaten. Die Ausdehnung des Tumors und/oder der Metastasen wurde 4, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn kontrolliert (Sonographie, CT-Abdomen und Thorax, Bestimmung der Tumormarker). Nebenendpunkte waren Immunmonitoring, unerwünschte Ergebnisse, Lebensqualität und Ein-Jahresüberlebenszeit. Die Ein-Jahresüberlebensrate wurde mit einem historischen Kontrollkollektiv verglichen.

Die Anzahl, der Schweregrad und der vermutete Kausalzusammenhang von unerwünschten Ereignissen und Therapie wurden gemäß der WHO-Empfehlungen dokumentiert. Über einen validierten Fragebogen wurde die Lebensqualität der Patienten erfasst. Hierzu wurde der EORTC QLQ-C-30 Fragebögen benutzt, der jeden zweiten Monat vom Patienten ausgefüllt werden sollte.

2.7. Hypersensivitätshauttest vom verzögerten Typ

Ein *delayed type hypersensitivity* (DTH) Hauttest wurde durchgeführt um die Induktion einer spezifischen Immunantwort *in vivo* zu überprüfen und den Erfolg der Vakzinierung im Verlauf zu beobachten. Durch intradermale Applikation von KLH und die hieraus resultierende Hautreaktion konnte eine grundlegende, Tumor-unabhängige Fehlfunktion des Immunsystems ausgeschlossen werden. KLH (20 µg) und Tumorlysat (10 – 50 µg) wurden in den Oberarm intradermal gespritzt. Isotone Kochsalzlösung wurde als negative Kontrolle verwendet. Die DTH-Antwort wurde 48 Stunden nach der Injektion evaluiert. Die DTH-Antwort galt als positiv, wenn eine Antigen-induzierte Induration und Rötung > 3mm Durchmesser beobachtet wurde. Ein DTH-Hauttest wurde vor der ersten Vakzinierung durchgeführt und in regelmäßigen Abständen während des Vakzinierungsschemas.

2.8. Lymphozyten-Proliferations-Assay

Lymphozyten wurden aus peripherem Blut gewonnen durch Ficoll-density-Gradientenzentrifugation der nicht-adhärenen Fraktion venösen Vollblutes nach einem Adhärenzschnitt. Aliquots nicht-adhärer Zellen, gewonnen zu verschiedenen Zeitpunkten des Vakzinierungsprotokolls, wurden für weitere Analysen eingefroren. Um die Proliferationskapazität des Zellpools vor, während und nach der Vakzinierungstherapie zu messen, wurden die nicht-adhärenen Zellen aufgetaut, gewaschen und als Triplikate in abgerundeten (U-bottom) 96-well Platten (2×10^5 Zellen pro Well) beimpft. Diese Zellen wurden mit Tumorlysat-gepulsten oder nichtgepulsten DC in abnehmenden Verhältnissen von 20/1, 40/1, 80/1, 160/1 und 320/1 (nicht adhärente Zellen/DC) für fünf Tage bei 37°C kultiviert. Dann wurden die Kulturen mit ^3H -Thymidin für 18 Stunden beladen. Die Zellen wurden in *glass microfiber*-Filter geerntet und die Proliferation wurde durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin unter Verwendung eines flüssigen Szintillationszählers bestimmt. Die absoluten CPM-Werte der Assays der einzelnen Patienten unterschieden sich zu den einzelnen

Untersuchungszeiten aufgrund unterschiedlicher Chargen an 3H-Thymidin. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse des Proliferations-Assays als Anstieg im Verhältnis zur 3H-Thymidin-Aufnahme in Zellen der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Nicht-adhärente Zellen, die nicht mit DC für fünf Tage kultiviert wurden, zeigten eine niedrige Proliferation mit CPM-Werten zwischen 100 und 400.

2.9. ELISPOT-Assay

Für die Messung von einzelnen Zellen, die IFN- γ -Protein nach dem Kontakt mit ihrem jeweiligen Epitop ausschütten, wurde ein *enzyme-linked immunospot (ELISPOT)* Assay System etabliert. Nicht-adhärente Zellen wurden durch MACS-Technologie (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) auf CD8 $^{+}$ T-Zellen angereichert. Diese CD8 $^{+}$ T-Zellen wurden mit Tumorlysat-beladenen DC für eine Woche in einem Verhältnis von 1/10 (DC/T-Zellen) kokultiviert. Die CD8 $^{+}$ T-Zellen wurden, bevor der IFN- γ -ELISPOT-Assay durchgeführt wurde, mit DC für 24 Stunden restimuliert. Als Positivkontrolle wurden CD8 $^{+}$ T-Zellen mit Phytohemagglutinin (PHA, 1 μ g/mL, Sigma, Munich, Germany) behandelt. Nichtstimulierte CD8 $^{+}$ T-Zellen dienten als negative Kontrolle. 10 5 CD8 $^{+}$ T-Zellen wurden auf eine 96-Well-ELISPOT-Platte mit flachem Boden (Millipore, Bedford, MA, USA) geladen nachdem diese mit *capture*-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) beschichtet worden war. Die Platte wurde für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschvorgang wurde der Nachweisantikörper zu jedem Well hinzugegeben und die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Avidin-*horseradish Peroxidase*-Konjugat wurde hinzugefügt und die Platte wurde mit 3-amino-9-ethyl-Carbazole-Substrat entwickelt. Die resultierenden Punkte wurden durch einen automatischen ELISPOT-Leser (Carl Zeiss, Berlin, Germany) ausgezählt.

2.10. Statistiken

Zur statistischen Überprüfung wurden Student'sche T-Tests durchgeführt, um signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion, T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Produktion im ELISPOT zu zeigen. Ein Wert von $p = 0,05$ wurde als Signifikanzniveau festgelegt. Die Korrelation zwischen Immunantwort und Überlebenszeit wurde durch die Verwendung eines *Spearman's rank correlation test* bestimmt. Verwendet wurde die Software Prism (Version 5.0f, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristiken und Ergebnisse der DC-Generierung

Zwölf Patienten wurden in die letzte Stufe des Versuchsprotokolls eingeschlossen und erhielten DC-Vakzinierung (**Tabelle 1 und 2**). Fünf Patienten waren weiblich, sieben männlich; das Durchschnittsalter lag bei 63 Jahren (42 bis 72 Jahre). Bei fünf Patienten (Patienten 40, 47, 51, 56 und 61) wurde eine Operation nach Whipple mit kurativem Ziel durchgeführt. Bei vier dieser fünf Patienten (Patienten 47, 51, 56 und 61) wurde in einem tumorfreien Intervall eine adjuvante Radiochemotherapie durchgeführt. Acht Patienten befanden sich schon initial in einer palliativen Situation nach der Operation, dies entweder weil keine operative Tumorfreiheit hergestellt werden konnte oder aufgrund der intraoperativen Feststellung einer Metastasierung. In Fällen in denen auf eine Whipple'sche Operation verzichtet werden musste, wurde ausreichend Tumormaterial für die histologische Analyse und für die zukünftige Vakzinierungstherapie gewonnen. Bei diesen Patienten wurde direkt eine DC-Vakzinierungstherapie in Kombination mit einer palliativen Chemotherapie begonnen. Patienten die mit kurativer Intention einer Whipple-Operation unterzogen worden waren, wurden nach Auftreten eines Rezidivs wieder in das Studienprotokoll aufgenommen und die Vakzinetherapie

gestartet. Histologiebilder der Tumore aller behandelten Patienten finden sich in **Anlage 1** des Anhangs.

Tabelle 1: Patienteneigenschaften und klinisches Ansprechen.

Pat.-Nr.	Alter	Geschlecht	Chemotherapie unter Vakzine	Anzahl der Vakzinierungen	Klinisches Ansprechen	Überleben seit Diagnose der fortgeschrittenen Erkrankung (Monate)	Überleben seit Erstdiagnose der Erkrankung (Monate)	Status
40	58	M	Gem	9	PD	11	85	DOD
42	62	F	Gem	6	PD	8	8	DOD
44	72	F	Gem	2	PD	2	2	DOD
45	67	M	Gem	2	PD	10	10	DOD
47	66	F	Gem	12	SD	38	39	DOD
51	58	F	Gem	8	PR	7	14	DOC
52	67	M	GemOx	11	SD	56	56	DOD
53	64	F	GemOx	8	PD	12	12	DOD
54	61	M	Gem	11	PD	51	51	DOD
56	61	M	Gem	4	PD	14	20	DOD
61	42	M	Gem	3	PD	8	16	DOD
62	64	M	Gem	6	PD	8	8	DOD

Tabelle 1 zeigt die Basisdaten der zwölf vakziinierten Patienten sowie die klinische Entwicklung der Studienteilnehmer. „Gem“ steht hierbei für Chemotherapie mit Gemcitabin-Monotherapie, „GemOx“ für eine kombinierte Therapie mit Gemcitabin und Oxaliplatin. Bezuglich des klinischen Ansprechens steht „PD“ für progressive disease, „SD“ für stable disease sowie „PR“ für partial remission. „DOD“ kürzt dead of disease ab, „DOC“ died of other causes. Patient 51 verstarb im Rahmen einer systemischen Verschlechterung ohne Nachweis einer Tumorprogression.

Tabelle 2: Ergebnisse des Immunmonitoring.

Pat.-Nr.	DTH-Test gegen KLH positiv nach Anzahl (n) an Vakzinierungen	DTH-Test gegen Tumorlysat positiv nach Anzahl (n) an Vakzinierungen	Prozentualer Anstieg über Basiswert im ELISPOT	Stimulations-index vor Vakzinierung	Stimulations-index nach Vakzinierung
40	3	6	n.d.	1,72	1,97
42	2	nie	n.d.	1,05	1,78
44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	2	3	241	1,70	3,30
51	6	6	n.d.	1,28	2,14
52	nie	nie	354	6,49	8,48
53	7	n.d.	n.d.	1,68	3,67
54	3	n.d.	153	1,86	n.d.
56	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
62	5	6	n.d.	1,43	1,91

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Immunmonitorings der zwölf vakzinierten Patienten. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Patienten mittels DTH-Hauttest sowie *ex vivo*-Tests der T-Zell-Aktivität auf das immunologische Ansprechen nach DC-Vakzinetherapie getestet. Per DTH-Hauttest gegen KLH wurde die Induzierbarkeit einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion bei den schwer kranken und immunsupprimierten Patienten getestet. Proliferations-Assays und ELISPOT-Assays quantifizierten das Ansprechen auf die Vakzinetherapie sowie das Vorhandensein Tumor-reaktiver T-Zellen vor, während und nach DC-Therapie.

Das Aufbereiten von Tumorlysat mit beladenen DC war bei allen Patienten erfolgreich. Lysat-beladene DC konnten mit hoher Reinheit (>95%) generiert werden. Die DC waren zu >90% Reifemarker-positiv (**Abb. 3**).

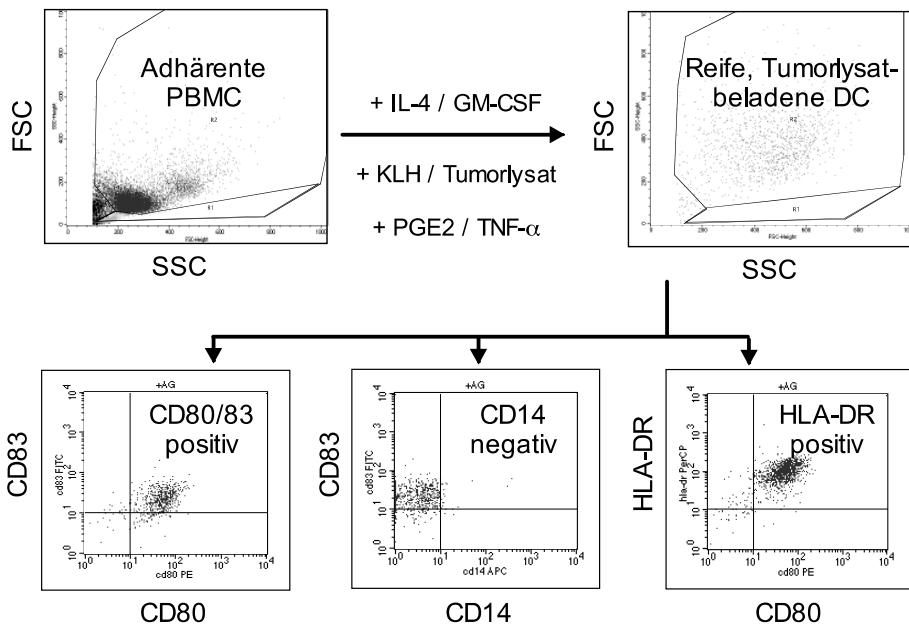


Abb. 3: Generierung von reifen, Tumorzellsat-beladenen DC. PBMC wurden in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF für sechs Tage kultiviert. Dann wurden sie mit KLH und Tumorzellsat beladen und mit TNF- α und PgE2 reifestimuliert.

Die Patienten bekamen zwischen zwei und zwölf Vakzinierungen, wobei Patienten 44, 45, 56 und 61 lediglich je zwei, zwei, vier und drei Vakzinierungen erhielten, bedingt durch Tumorprogression und Tod (Patient 45) oder aufgrund der persönlichen Entscheidung nicht mehr an der Studie teilnehmen zu können. Alle Patienten erhielten Gemcitabin nach Diagnosestellung der fortgeschrittenen Erkrankung. Zwei Patienten erhielten zusätzlich Oxaliplatin (Patient 52 und 53). Vier Patienten (52, 53, 56 und 62) wurden im Rahmen einer Second-line-Therapie mit dem Biological Erlotinib behandelt.

3.2. Klinische Ergebnisse der DC Vakzinierungs-Therapie

Die klinischen Ergebnisse finden sich in **Tabelle 1** zusammengefasst. Von den zwölf Patienten, die mit DC vakziniert wurden, zeigte ein Patient eine partielle Remission und zwei Patienten zeigten *stable disease*. Fünf Patienten überlebten ein oder mehr Jahre nach der Diagnose der fortgeschrittenen Erkrankung. Die Überlebenszeit der Patienten 47, 53, 54 und 56 lag bei jeweils 38, 12, 51 und 14 Monaten. Patient 52 verstarb nach

56 Monaten im Rahmen der Metastasierung seines Azinuszellkarzinoms. Das mediane Überleben von allen vakzinierter Patienten lag bei 10,5 Monaten (**Abb. 4**).

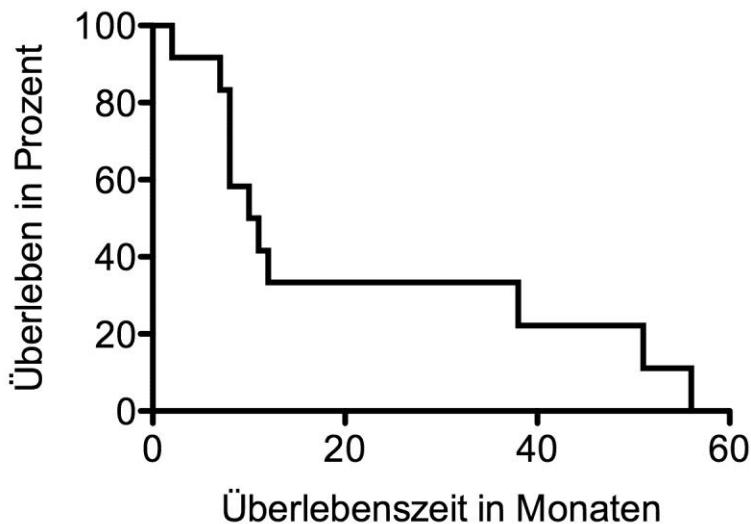


Abb. 4: Kaplan-Meier-Analyse bei Patienten, die mit DC und Gemcitabin behandelt wurden. Drei von zwölf Patienten waren Langzeitüberleber mit einer Überlebenszeit von mehr als zwei Jahren. Das mediane Überleben von allen vakzinierter Patienten lag bei 10,5 Monaten. Das Ein-Jahres-Überleben der zwölf Patienten, die eine DC-Vakzinierung erhielten lag bei 42%.

3.3. Korrelation einer initial bestehenden Tumor-reaktiven T-Zell-Antwort mit der Überlebenszeit

Vor dem Beginn der DC-Vakzinierung wurden Proliferations-Assays mit nicht adhärenten Zellen bei acht Patienten durchgeführt. Die Proliferation der Zellen, die mit Tumortumorsat-beladenen DC aktiviert wurden, im Vergleich zur Proliferation von Zellen, die mit unbeladenen DC kultiviert wurden, wurde als Marker für die endogene Antitumor- Immunantwort gewertet und als Stimulations-Index bezeichnet.

Interessanterweise hatten diejenigen Patienten, die schon vorher einen Pool von Tumor-reaktiven T-Zellen hatten, eine bessere Überlebensrate als Patienten mit einer niedrigen Proliferation von T-Zellen gegen Tumortumorsat-beladene DC. Beim Verwenden des *Spearman's Tests* zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen

dem Pool von Tumor-reaktiven T-Zellen, die vor Beginn der Vakzinierung nachweisbar waren und der Überlebenszeit ($r = 0,8862$, $P = 0,0036$). Fünf Patienten zeigten einen Stimulations-Index zwischen 1,68 und 6,49 und ein Überleben zwischen elf und 56 Monaten. Drei Patienten mit einem niedrigen Stimulations-Index zwischen 1,05 und 1,43 hatten deutlich kürzere Überlebenszeiten zwischen sieben und acht Monaten (**Abb. 5**).

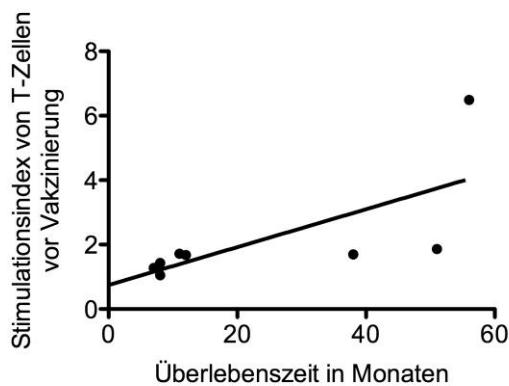


Abb. 5: Korrelation des Überlebens mit einer Immunantwort vor der Vakzinierung. Die Kapazität der Lysat-beladenen versus unbeladenen DC eine Proliferation der T-Zellen zu induzieren wurde als Marker für das Vorhandensein einer Antitumor-Immunantwort vor der Vakzinierung verwendet und als Stimulations-Index (SI) bezeichnet. Höhere SIs korrelierten signifikant mit einem längeren Überleben ($P = 0,0036$).

3.4. Antitumor-Immunantwort trotz begleitender Chemotherapie

Proliferations-Assays und ELISPOT-Assays wurden durchgeführt um die Anwesenheit von Tumor-reaktiven T-Zellen im peripheren Blut von Patienten vor, während und nach dem Ende des Vakzinierungsprotokolls zu zeigen. Die Anzahl der Tumor-reaktiven Zellen stieg während der DC-Vakzinierung an (**Tabelle 2, Abb. 6 und 7**), dies trotz begleitender Chemotherapie entweder mit Gemcitabin alleine oder Gemcitabin plus Oxaliplatin. Die drei Spalten „Anstieg im ELISPOT nach Vakzinierung“, „Stimulations-Index vor Vakzinierung“ und „Stimulations-Index nach Vakzinierung“ verdeutlichen die individuelle Immunantwort der Patienten auf die Vakzinierung.

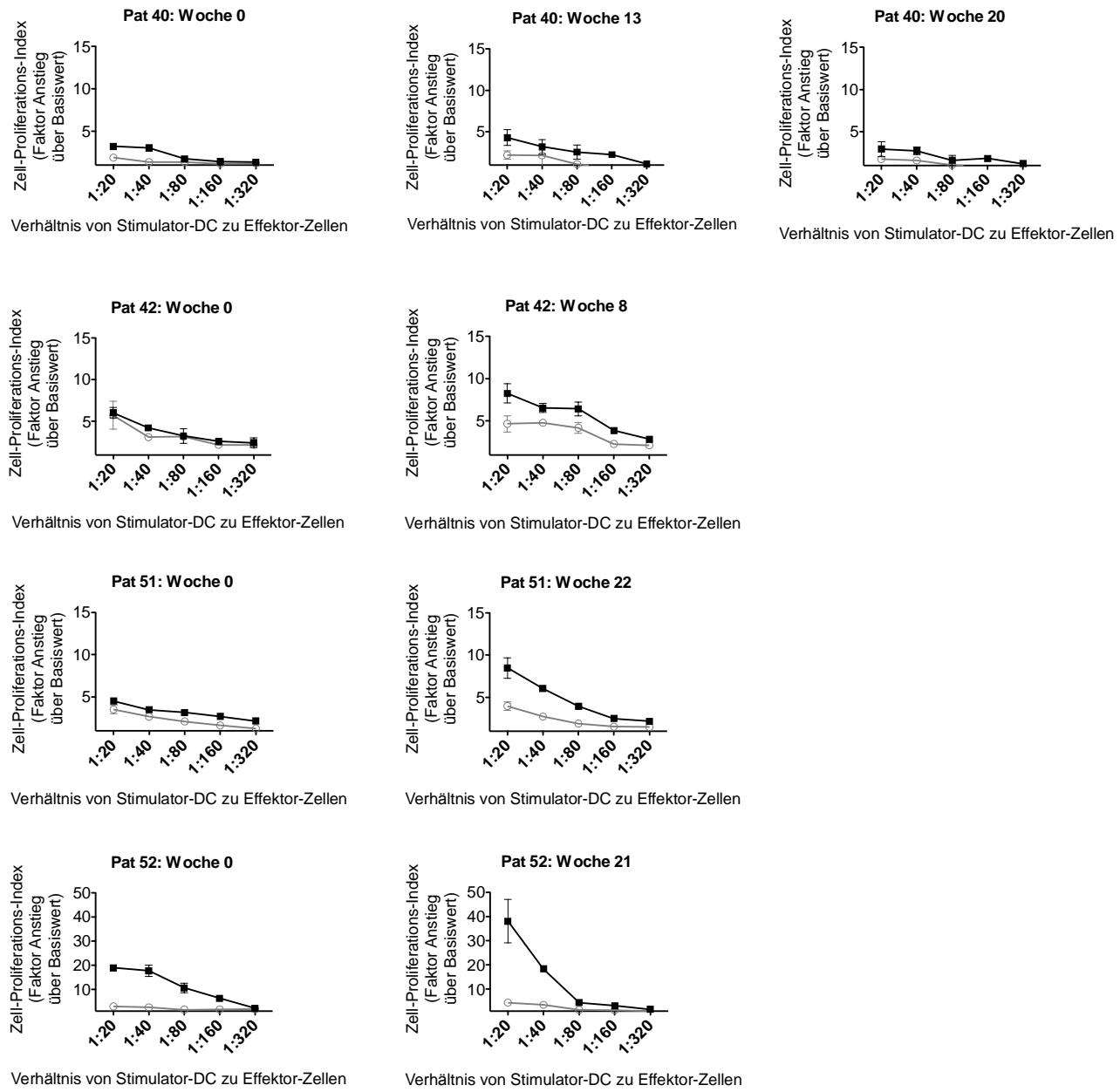


Abb. 6: Proliferation von Tumor-reaktiven T-Zellen nach Stimulierung mit Lysatbeladenen beziehungsweise unbeladenen DC (Patienten 40, 42, 51, 52). Der Graph zeigt die Proliferations-Assays von vier Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Y-Achse zeigt den Anstieg in der ^{3}H -Thymidin-Inkorporation bei den Effektor-Zellen. Der durch Lysatbeladene versus nicht mit Lysat beladene DC induzierte Proliferationsanstieg wurde als Index über der Grundlinie ausgedrückt. Patient 52 zeigt eine hohe Proliferation nach Stimulierung mit Lysat-beladenen DC. Demnach ergibt sich ein hoher Stimulations-Index (SI) von 6,49. Dieser Patient überlebte 56 Monate.

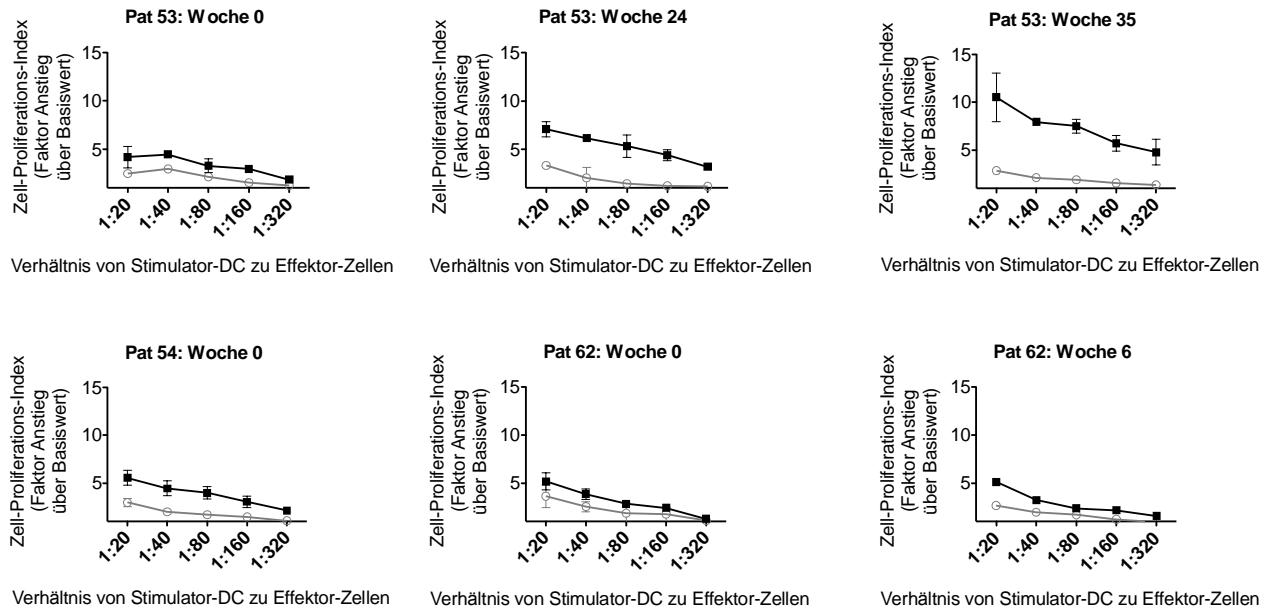


Abb. 7: Proliferation von Tumor-reaktiven T-Zellen nach Stimulierung mit Lysatbeladenen, beziehungsweise unbeladenen DC (Patienten 53, 54, 62). Die Proliferationskapazität der Proben, die während der Vakzinierungstherapie abgenommen worden waren, war größer als die initiale Proliferationsantwort auf Tumorantigen. Jedoch variierte die Vakzinierungszahl mit dem Anstieg der maximalen Antwort zwischen 14% und 118%, im Vergleich zur Situation vor der Vakzinierung.

An Hand des klinischen Verlauf ließ sich zeigen, dass der Anstieg Tumor-reaktiver T-Zellen nach DC-basierter Vakzinierung nicht nur ein Epiphänomen, hervorgerufen durch die Reduktion des Tumors durch die Chemotherapie oder gar durch das Fortschreiten der Tumorerkrankung, war. Als Beispiel dafür gilt Patient 47, deren Antitumor-Immunantwort im Verlauf des Vakzinierungsprotokolls im Vergleich zu den Ausgangswerten vor der Vakzinierung anstieg, und zwar sowohl in den Phasen von *stable disease* als auch bei Fortschreiten der Erkrankung (**Abb. 8, 9 und 10**).

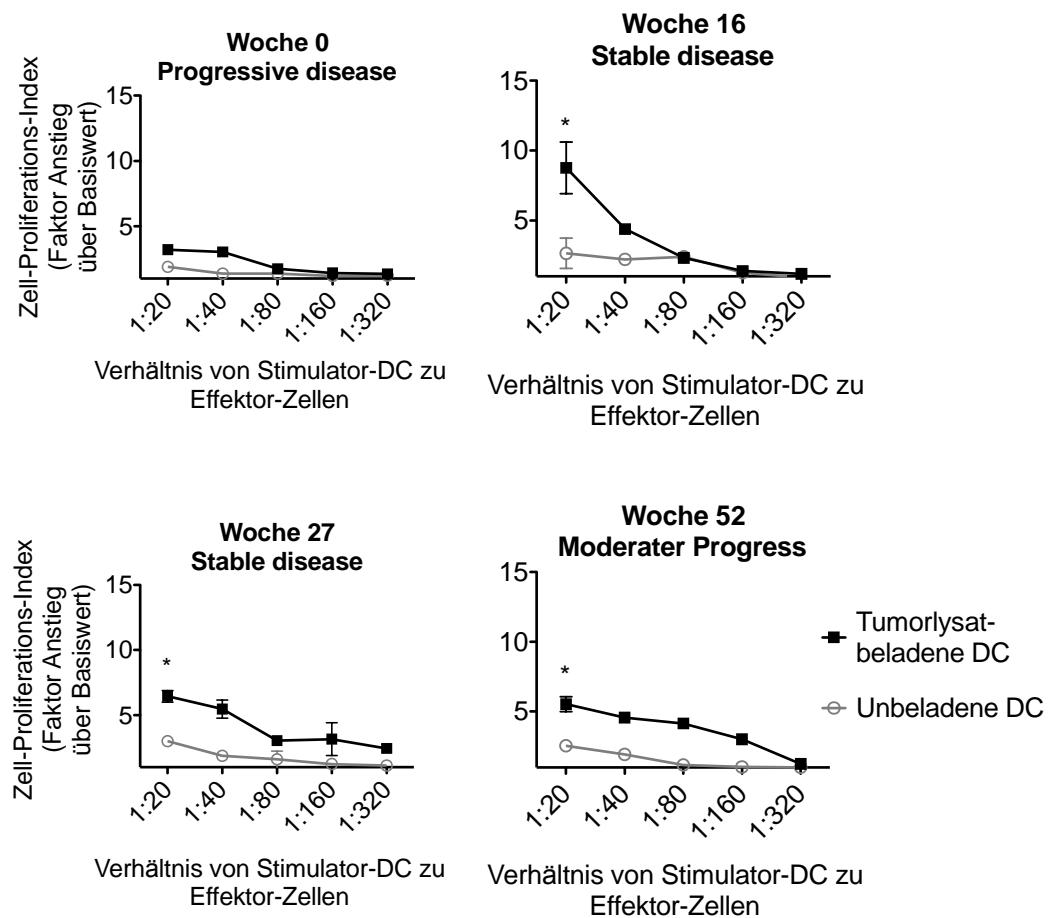


Abb. 8: DC-Vakzine-bedingte Induktion Tumor-reaktiver T-Zellen bei Patienten mit begleitender Gemcitabintherapie (Patientin 47). Es kam zu einem signifikanten Anstieg der Antitumor-Immunantwort im Verlauf des Vakzinierungsprotokolls im Vergleich zu den Ausgangswerten vor der Vakzinierung. Die Proliferationskapazität von Effektor-Zellen, die mit Tumorlysat-beladenen DC stimuliert wurden, wurde mit Effektor-Zellen verglichen, die mit unbeladenen DC stimuliert wurden. Die vier Graphen zeigen die Zellproliferation vor sowie 16, 27 und 52 Wochen nach Beginn der DC-Vakzinierung. Die Y-Achse zeigt den Proliferationsanstieg Tumor-reaktiver Zellen, der durch Lysat-beladene versus unbeladene DC induziert wurde, jeweils in Relation zur Proliferation unstimulierter Zellen. Es ergibt sich hierdurch ein Indexwert, der den Anstieg der Proliferation über den Basiswert repräsentiert, wodurch die Vergleichbarkeit der einzelnen Messzeitpunkte gewährleistet ist.

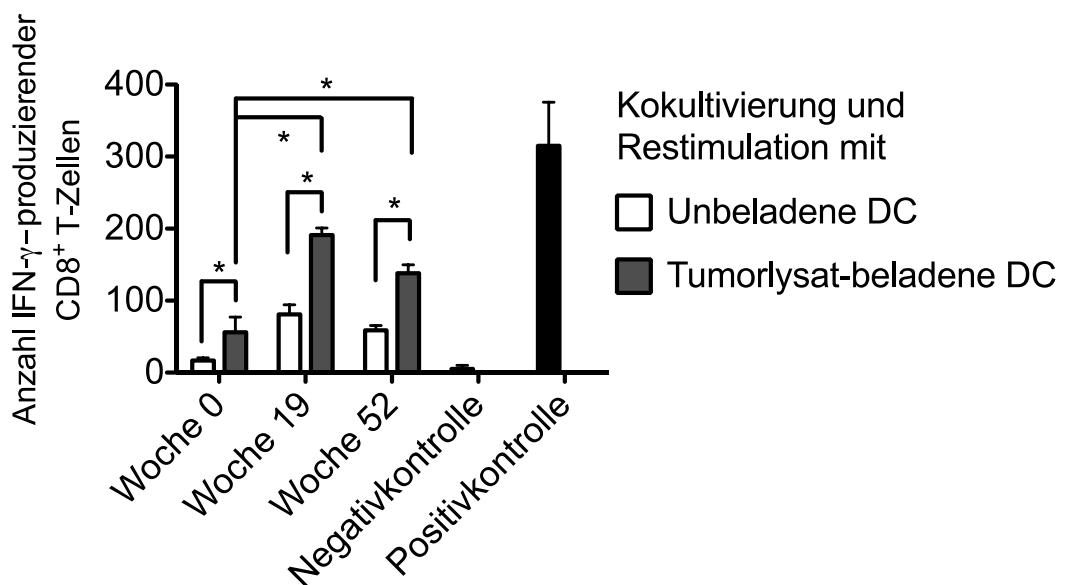
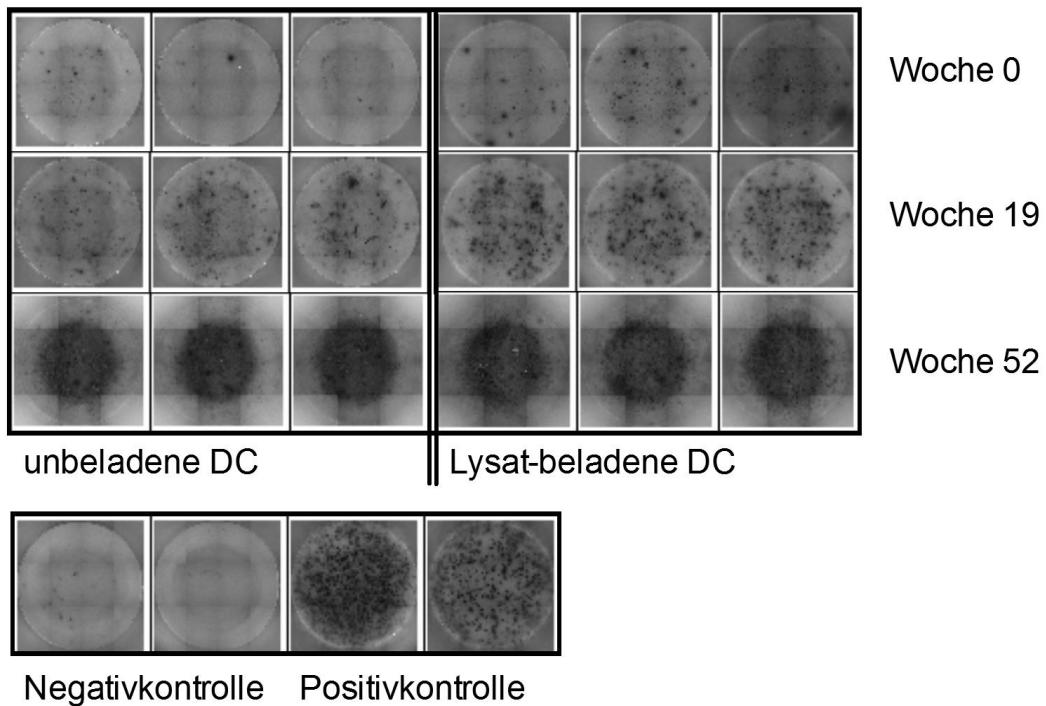


Abb. 9: ELISPOT-Assay von Patient 47. T-Zellen vor Therapiebeginn sowie aus Woche 19 und 52 nach Beginn der Therapie wurden mit unbeladenen versus Lysat-beladenen DC stimuliert. Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden T-Zellen wurde in einem ELISPOT-Assay bestimmt. Die Zahl IFN- γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit Lysat-beladenen DC stieg im Lauf der Vakzinierungsphase an.

Patient 47 erhielt Chemotherapie und DC-Vakzinierung nach Diagnose der metastasierten Tumorerkrankung. Proliferations- und ELISPOT-Assays zeigten, dass der Patient einen kleinen Pool von Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung hatte, der signifikant während der Vakzinierung anstieg. Das Ansprechen wurde auch durch den DTH-Hauttest bestätigt (**Abb. 10**). Jedoch zeigten CT-Untersuchungen nach der 16. und 24. Woche kein relevantes klinisches Ansprechen.

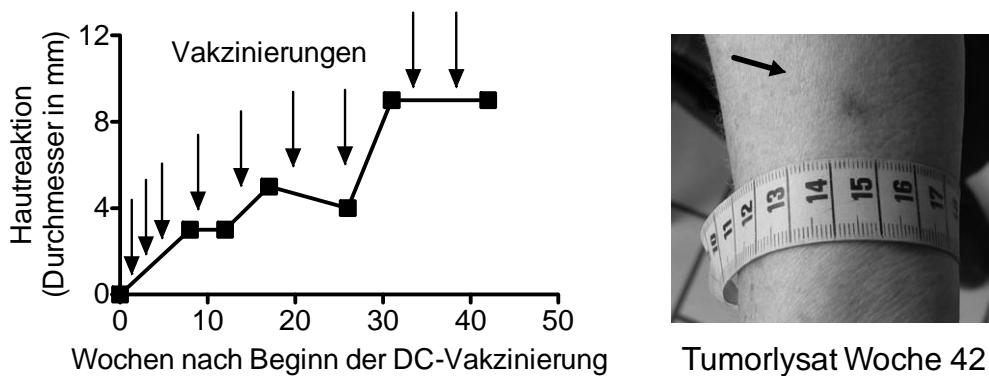


Abb. 10: DTH-Hauttest von Patient 47. Tumorlysat wurde subkutan in den Unterarm gespritzt. Die Patientin wurden 48 Stunden nach der Injektion auf eine Hautreaktion untersucht. Initial war keine Hautreaktion zu sehen. Nach den drei ersten Vakzinierungen entstand eine Rötung und Erhabenheit. Die Hautreaktion verstärkte sich mit der Zeit.

Die Spezifität der ELISPOT-Assays zur Charakterisierung der Tumorantigen-induzierten IFN- γ -Produktion von T-Zellen wurde aufgezeigt, indem Proben in Kombination mit unbeladenen und Lysat-beladenen DC zur Aktivierung und Restimulation stimuliert wurden (**Abb. 11**).

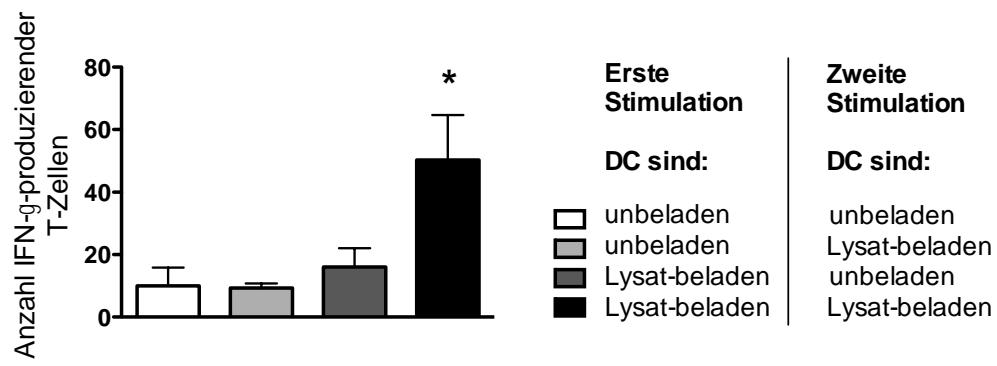


Abb.11: T-Zellen nach Stimulation mit nichtbeladenen versus Lysat-beladenen DC. Nur nach sieben Tagen Kultivierung und einer zusätzlichen 24-Stunden-Restimulation mit Lysat-beladenen DC konnten IFN- γ -spezifische T-Zellen gefunden werden.

ELISPOT-Assays von zwei weiteren Patienten bestätigten, dass die DC-Vakzinierung zu einem Anstieg von Antitumor-T-Zellen führte. Ähnlich wie bei Patient 47 zeigte der ELISPOT-Assay der Patienten 52 (**Abb. 12**) und Patient 54 (**Abb. 13**) einen Anstieg von Tumor-reaktiven T-Zellen im Lauf der Vakzinierung.

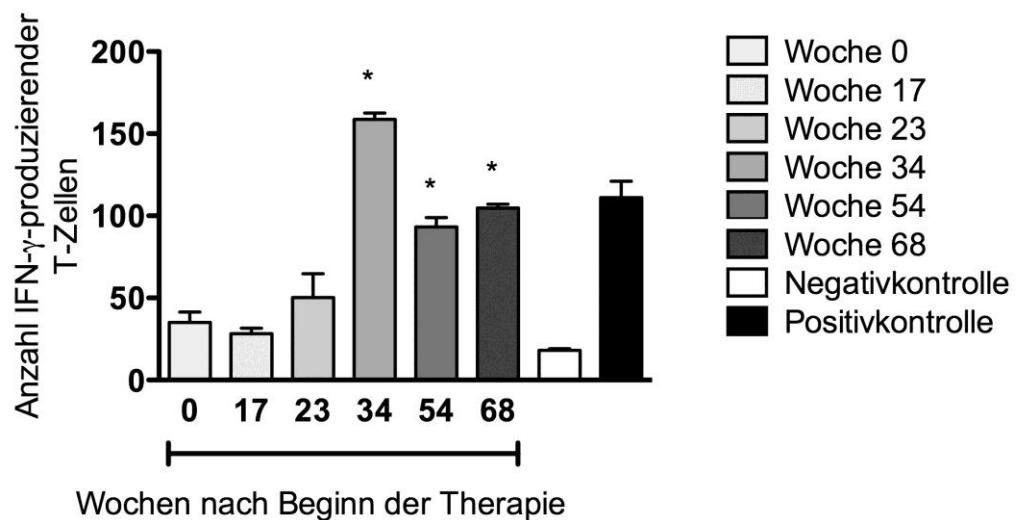


Abb. 12: ELISPOT-Assays des Patienten 52. Die Antitumor-Immunantwort von Patient 52, der mit Gemcitabin und Oxaliplatin behandelt wurde, wurde während der Vakzinierung untersucht, indem man die T-Zell-Antwort auf Tumortumorsatz in der 0., 17., 23., 34., 54. und 68. Woche nach Beginn der DC-Vakzinierung durch ELISPOT-Assays bestimmte. Die entsprechenden Originalbilder finden sich in Anlage 2.

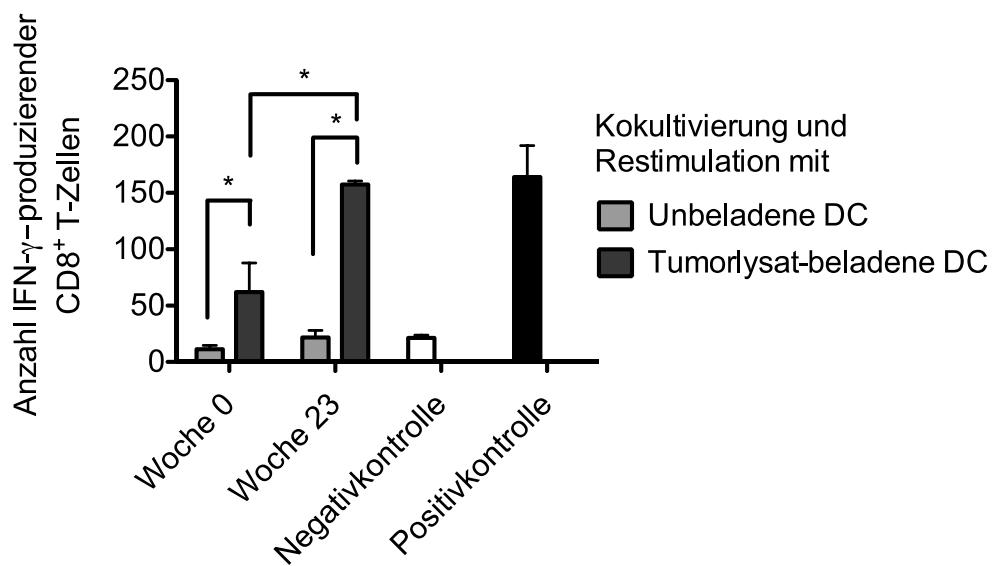
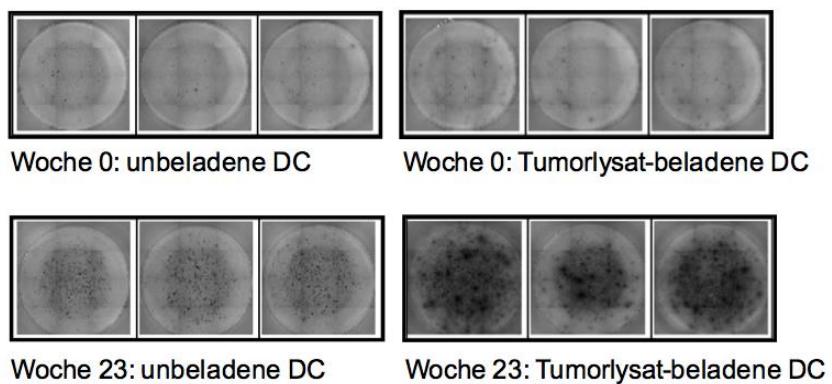


Abb. 13: ELISPOT-Assays des Patienten 54. Tumor-reaktive T-Zellen des Patienten 54, der begleitende Chemotherapie erhielt, wurden vor und nach der Vakzinierung durch einen ELISPOT-Assay quantifiziert.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die begleitende Chemotherapie weder die Expansion von schon vorher vorhandenen Tumor-reaktiven T-Zellen beeinträchtigte, noch die Induktion einer *de novo*-Immunantwort durch die DC-basierte Vakzinierung verhinderte.

3.5. Korrelation von klinischer und immunologischer Antwort

Um die individuelle Immunantwort vor und nach Vakzinierung mit dem klinischen Ergebnis zu vergleichen wurden die Patienten in vier Gruppen aufgeteilt (**Abb. 14**). Die Aufteilung basierte auf dem Vorhandensein Tumor-reaktiver T-Zellen vor und nach der Vakzinierung. Gruppe eins: Patienten mit Tumor-reaktiven T-Zellen und Immunantwort auf die Vakzinierung. Gruppe zwei: Patienten, mit Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung, jedoch ohne Immunantwort auf die Vakzinierung. Gruppe drei: Patienten ohne Tumor-reaktive T-Zellen vor der Vakzinierung aber mit einer Immunantwort auf die Vakzinierung. Gruppe vier: Patienten ohne irgendeine nachweisbare Immunantwort. Aufgrund der niedrigen Patientenzahl in dieser Studie ist es schwierig klare Kriterien für die Immunantwort nach der Vakzinierung zu definieren oder gar statistische Analysen aufzustellen. Vier Patienten (47, 52, 53 und 54) zeigten Tumor-reaktive T-Zellen vor der Vakzinierung, welche nach der DC-Vakzinierung anstiegen. Diese Patienten hatten Überlebenszeiten zwischen zwölf und 56 Monaten. Interessanterweise waren beide Patienten mit *stable disease* (47 und 52) in dieser Gruppe.

Der Patient mit der partiellen Antwort (Patient 51) hatte zwar keine relevanten Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung, entwickelte aber eine immunologische Antwort auf die Vakzinierung. Die CT-Untersuchung nach vier Monaten zeigte eine Regression der Lebermetastase von 2,3 cm Durchmesser auf 1,5 cm. Die Abnahme von CA19-9 bestätigte die Verkleinerung der Tumorzellmasse. Vor der Whipple-Operation hatte der Patient einen CA19-9-Wert von 1010 U/ml, nach der R0-Resektion war der Wert auf 30 U/ml (CA19-9 Norm: <37 U/ml) gesunken. Sieben Monate später zeigte der Patient eine Rekurrenz der Erkrankung durch Bildung von Lebermetastasen und einen Anstieg des CA19-9 von 747 U/ml. Nach Beginn einer kombinierten DC-Vakzinierung und Gemcitabintherapie war CA19-9 auf konstante Werte unter 200 U/ml gesunken. Diese erfreuliche Entwicklung war mit einem positiven DTH-Hauttest und einem Anstieg der T-Zellproliferation nach Stimulation mit DC, die mit autologem Tumorlysat beladen worden waren, verbunden. Der Stimulationsindex stieg von 1,28 auf 2,14 in Woche 22. Dies entsprach dem größten Anstieg aller Patienten. Jedoch betrug das Überleben nach der

Diagnose der fortgeschrittenen Erkrankung nur sieben Monate (14 Monate nach der Operation). Der Patient verstarb in einem auswärtigen Krankenhaus ohne Anhalt für Progression bei dem vorangegangenen letzten Besuch in unserer Klinik.

Zwei andere Patienten ohne Pool von Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung entwickelten eine niedrige bis mäßige Antitumorantwort während der Vakzinierung (42 und 62). Beide Patienten hatten eine fortgeschrittene Erkrankung und eine Überlebenszeit von acht Monaten.

Proliferations-Assays nach der DC-Vakzinierung wurden aus dem Material von sieben der zwölf Patienten und ELISPOT-Assays aus dem Material von drei Patienten durchgeführt. Das Ausmaß der DC-induzierten Immunantwort variierte. Der Stimulations-Index nach der Vakzinierung lag zwischen 1,78 und 8,48. Dies repräsentierte einen Anstieg zwischen 14% und 118% im Vergleich zur Situation vor der Vakzinierung. Es gab keine Korrelation zwischen einer hohen T-Zell-Proliferation und einem besseren Überleben. Jedoch zeigten ELISPOT-Assays eine signifikante Vakzinierungsantwort bei drei Patienten (47, 52 und 54) mit T-Zell- Proliferationsraten, die jeweils 241%, 354% und 153% höher als der Ausgangswert vor der Vakzinierung lagen. Alle diese drei Patienten zeigten eine Immunantwort vor der Vakzinierung und dementsprechend waren sie auch die Studienteilnehmer mit den längsten Überlebenszeiten von jeweils 38, 56 und 51 Monaten. Dies kann ein Hinweis sein, dass bei Patienten mit einer vor der Vakzinierung bestehenden Antitumor-Immunantwort eine DC-induzierte Vakzinierungsantwort mit dem Überleben korreliert.

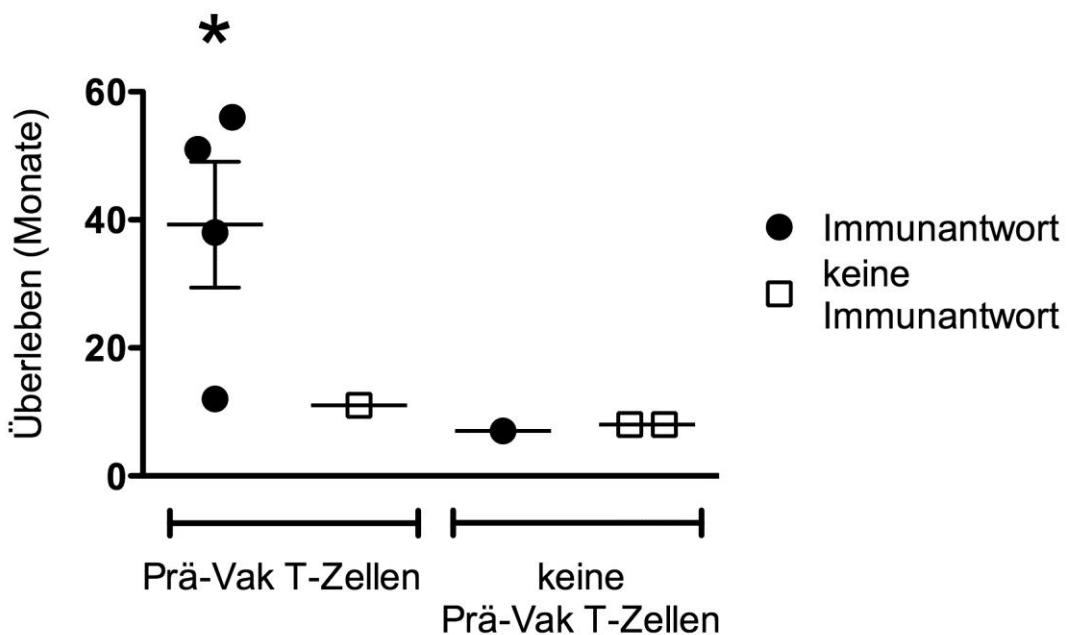


Abb. 14: Korrelation des klinischen Verlaufs mit dem Immunstatus vor Vakzinebeginn und dem immunologischem Ansprechen. Eine hohe Anzahl vor Vakzinebeginn vorhandener Tumor-reaktiver Zellen korrelierte signifikant mit einem verlängertem Überleben. Diejenigen Patienten, bei denen es zu einer Expansion dieses Pools im Lauf des Vakzinierungsprotokolls kam, zeigten besonders langes Überleben ($P = 0,0055$).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei dieser Pilotstudie zur Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms mit autologen Tumорlysat-beladenen DC wurden aus peripherem Blut von Patienten mit Pankreaskarzinom DC hoher Qualität hergestellt. Die Vakzinierung wurde von den Patienten gut vertragen und führte zu einer starken Immunantwort gegen das Neoantigen KLH, wie an Hand eines DTH-Hauttest demonstriert werden konnte. Es konnte so gezeigt werden, dass die Patienten in der Lage waren, trotz Tumorerkrankung und begleitender Chemotherapie eine DC-induzierte Immunantwort zu entwickeln. Das Immunmonitoring bezüglich einer Tumor-spezifischen Immunantwort

bestand aus DTH-Hauttests mit autologem Tumorlysat, Proliferations-Assays sowie ELISPOT-Analysen. Es zeigte sich, dass die DC-basierte Vakzinierung eine vorbestehende Antitumor-Immunantwort steigern, beziehungsweise eine solche Antwort *de novo* induzieren kann. Ein großer Pool von Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung war mit einem besseren Überleben verbunden. Die DC-induzierte Steigerung dieser vorbestehenden T-Zellantwort war mit einer hohen Überlebenszeit assoziiert. Bemerkenswert war, dass alle Patienten bei denen es zu einer relevanten Antitumor-T-Zellantwort nach der DC-Vakzinierung kam auch eine klinische Antwort zeigten und/oder zwölf oder mehr Monate lebten. Dies war unabhängig davon ob eine T-Zell-Antwort vor der Vakzinierung festgestellt wurde oder nicht. Das mediane Überleben lag in unserer Studie bei 10,5 Monaten, das Ein-Jahres-Überleben bei 42%.

4.2. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur

4.2.1. Bewertung der Überlebensdaten

Bei der Bewertung des Überlebens der hier untersuchten Patienten sind Daten historischer Vergleichskollektive heranzuziehen. Das Überleben in der Studie von Burris et al., die zur Zulassung von Gemcitabin geführt hatte, lag bei 5,6 Monate (Burris et al., 1997). Das Ein-Jahres-Überleben hatte hier bei 18% gelegen. Eine Metaanalyse zu kombinierten Therapieansätzen beim fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die sich auf Studien stützte die zwischen 2004 und 2007 veröffentlicht wurden, zeigte, dass auch in aktuellen Patientenkollektiven bei einer Gemcitabin-Monotherapie mit einem Überleben zwischen 5,0 und 7,1 Monaten zu rechnen ist (Heinemann et al., 2008).

Selection bias ist von großer Bedeutung bei der kritischen Diskussion von klinischen Studien. Die zwölf Patienten wurden direkt nach Diagnosestellung einer primär fortgeschrittenen oder rekurrenten Erkrankung in das Studienprotokoll aufgenommen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass der *selection bias* begrenzt ist, da nicht nur Langzeitüberleber eine Chance hatten in die Studie aufgenommen zu werden.

Jedoch können wir nicht ausschließen, dass es insofern einen *selection bias* gab, als vor allem Patienten eingeschlossen wurden, die sehr aktiv in ihren Behandlungsplan involviert waren und bereit waren sich einer maximalen Therapie zu unterziehen. Diese Patienten mussten nicht nur akzeptieren, dass sie sich häufiger für die Studie vorstellen sollten, sondern sie mussten auch die Nebenwirkungen der angebotenen, teils aggressiven Chemotherapie akzeptieren, die möglicherweise auch zu einem besseren Überleben führten.

Es wird verschiedentlich diskutiert ob diejenigen Patienten mit einem Pankreaskarzinom, die sehr lange überleben, auch wirklich unter einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt waren oder doch nicht etwa eine gutartigere Tumorentität und somit eine falsche Diagnose hatten (Carpelan-Holmstrom et al., 2005). In der vorliegenden Studie überlebte ein Patient nach der Erstdiagnose des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms mit Lungen- und Lebermetastasen insgesamt 56 Monate. Die Histologie zeigte bei diesem Patienten ein Azinuszellkarzinom. Die Prognose des Azinuszellkarzinoms ist zwar schlecht, aber immerhin besser als die des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas. Es sind auch wenige Fälle von Langzeitüberleben in der Literatur zu finden. Allgemein wird ein aggressives Vorgehen mit multimodaler Chemotherapie empfohlen (Butturini et al., 2011). Patient 52 erhielt nach Abschluss der Vakzinierungsstudie verschiedene Kombinationen von Gemcitabin, 5-FU, Capecitabin, Oxaliplatin und Irinotecan zusammen mit Bevacizumab, Erlotinib und SIRT-Therapie. Dadurch wurde es schwierig den Beitrag der DC-Vakzinierung für das klinische Ergebnis zu evaluieren. Jedoch könnte vor allem das lange Überleben dieses Patienten zusammen mit dem positiven Ergebnis der Immunmonitoring-Assays darauf hindeuten, dass das Azinuszellkarzinom gut auf die DC-Vakzinierung anspricht.

4.2.2. Parameter DC-induzierter Tumor-Immunantworten

Die Bedeutung immunologischer Vorgänge bei der Tumorabwehr ist unbestritten. Verschiedene Immunzellpopulationen wirken hierbei zusammen. Tumor-assoziierte

Makrophagen (TAM) sind eine heterogene Population von Immunzellen; eine dichte Infiltration von Tumoren mit Makrophagen ist in den meisten älteren Studien mit einer schlechten Prognose assoziiert (Pollard, 2004; Wynn et al., 2013). Analog zur Th1- und Th2-Klassifikation von T-Zellen wurden TAM in M1- und M2-Typen eingeteilt. M1-Makrophagen werden durch IFN- γ induziert, exprimieren viel MHC-II und haben zytotoxische Effekte (Grivennikov et al., 2010). M2-Makrophagen hingegen exprimieren das immunsuppressive Zytokin IL-10 und haben eine geringere Fähigkeit zur Antigenpräsentation als M1-Makrophagen. Es scheinen eher M2-Makrophagen zu sein, die sich im Randbereich von Tumoren nachweisen lassen und somit mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Biswas et al., 2013). MDSC wiederum stellen eine Population unreifer myeloider Zellen dar, die zwar auch in Knochenmark und Milz Tumor-freier Versuchstiere nachgewiesen werden können, sich jedoch vor allem im Rahmen der Tumorentstehung in der Milz ansammeln (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). MDSC sind in der Lage T-Zell-Effektorfunktionen zu unterbinden und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen zu induzieren. Darüber hinaus können MDSC auch direkt zu einer Tumorprogression führen, unter anderem durch Produktion bestimmter Matrix-Metalloproteasen, welche die Invasion von Tumorzellen begünstigen (Taketo, 2009). Neben diesen Zellen des angeborenen Immunsystems sind es vor allem bestimmte T-Zell-Populationen als Vertreter der erworbenen Immunität, die für die Tumorentstehung und Tumorprogression einerseits sowie die Tumorabstoßung andererseits verantwortlich sind.

Ältere Studien zeigten, dass eine Infiltration mit lymphoiden Zellen mit einer besseren Prognose assoziiert ist (Clemente et al., 1996; Galon et al., 2006; Pages et al., 2005). Es scheinen jedoch, wie auch bei den monozytären Zellen, die verschiedenen Subpopulationen unterschiedliche Effekte zu besitzen. Patienten deren Tumoren von vielen Th17-Zellen infiltriert sind haben demnach eine schlechtere Prognose (Maniati et al., 2010; Quante et al., 2013). Die Zytokine IL-6, IL-23 und TGF- β führen im Tumormilieu zur Transformation von nativen T-Zellen zu Th17-Zellen. Diese Zellen vermitteln eine entzündliche Reaktion im Tumorgewebe, die für Tumorwachstum und Neoangiogenese förderlich ist (Wu et al., 2009). Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

andererseits unterdrücken Mechanismen der erworbenen und auch der angeborenen Immunität. Es wird gemeinhin angenommen, dass auch eine erhöhte Frequenz an T_{reg} mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Curiel et al., 2004; Hiraoka et al., 2006). Im Gegensatz hierzu gilt eine Infiltration mit Th1-Zellen als ein günstiger prognostischer Marker (Fridman et al., 2012; Sharma et al., 2007). Die ELISPOT-Assays unserer Versuchsreihe legen nahe, dass durch DC-Vakzinierung eine Th1-Antwort induziert oder verstärkt werden konnte.

Wir benutzten Tumorzell-Lysat als Antigenquelle zum Beladen der DC. Verschiedene Tumor-assoziierte Antigene wurden für das Pankreaskarzinom beschrieben (Kubuschok et al., 2004). Jedoch ist die klinische Untersuchung und therapeutische Nutzbarmachung dieser Kandidatenantigene noch immer im experimentellen Stadium. In der vorliegenden Studie wurden Tumorzell-Lysat-beladene DC von Pankreaskarzinompatienten benutzt um die Effektorzellen *in vitro* vor und nach der Vakzinierung zu stimulieren. Bei der Mehrzahl der Patienten waren wir in Lage einen Anstieg der Tumorantigen-abhängigen Zell-Proliferation und der CD8⁺ T-Zell-vermittelten IFN- γ -Sekretion durch Aktivierung mit Lysat-gepulsten autologen DC im Verlauf der Immuntherapie nachzuweisen.

4.2.3. Einfluss begleitender Chemotherapie auf die Immunantwort

Wichtig war die Feststellung der hier vorgelegten Studie, dass die Generierung einer Tumor-Immunantwort trotz begleitender Chemotherapie gelang und diese Induktion unabhängig von der Tumorlast war. Zwar führt eine begleitende Gemcitabintherapie zu einer Chemotherapie-bedingten Immunsuppression und hat folglich einen negativen Einfluss auf die DC-induzierte T-Zell-Antwort. Jedoch gibt es gute Gründe, diese zwei Therapien miteinander zu kombinieren. Die Ausschüttung von Warnsignalen durch sterbende Tumorzellen nach der Chemotherapie kann zur Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen mit anschließender Steigerung der T-Zell abhängigen Antitumor-Immunantwort führen (Dauer et al., 2008; Gulley et al., 2007; Menard et al.,

2008). Das Zusammenwirken von Chemotherapie und Immuntherapie hat viel Aufmerksamkeit erhalten seitdem gezeigt werden konnte, dass bestimmte chemotherapeutisch wirksame Substanzen eine immunogene Form des Zelltodes bewirken (Martins et al., 2009; Zitvogel et al., 2010). Die Wirkung zytotoxischer Substanzen ist jedoch nicht auf die Krebszellen begrenzt, sondern betrifft auch Stromazellen und infiltrierende Immunzellen. Es wurde vorgeschlagen, dass Chemotherapeutika das Tumormilieu so verändern, dass DC-induzierte CD8⁺ T-Zell-Antworten besser wirken können (Kang et al., 2013). Für Gemcitabin wurde gezeigt, dass es die Anzahl an MDSC reduziert (Le et al., 2009; Mundy-Bosse et al., 2011; Sinha et al., 2007; Suzuki et al., 2005). Dies ist vor allem vor dem Hintergrund wichtig, dass gerade für das Pankreaskarzinom eine Expansion der MDSC sowie deren Akkumulation im Tumor beschrieben wurde (Bayne et al., 2012; Clark et al., 2007). Ebenso wichtig scheint die Wirkung von Gemcitabin auf T_{reg} zu sein (Shevchenko et al., 2012). Gerade T_{reg} scheinen besonders sensitiv auf Chemotherapeutika, darunter auch Gemcitabin, zu reagieren, unter anderem aufgrund ihres höheren Zellumsatzes im Vergleich zu anderen T-Zell-Populationen (Kan et al., 2012). Durch unsere Gruppe konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber CD8⁺ T-Zell-vermittelter Zytotoxizität erhöht (Dauer et al., 2005). Für das Phänomen der Chemosensibilisierung wurden verschiedene Mechanismen charakterisiert, hierunter die Hochregulation antigener Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen (Gameiro et al., 2011; Gelbard et al., 2006; Ishizaki et al., 2011). Kürzlich berichteten Takahara et al., dass Gemcitabin die WT1-Expression in Pankreaskarzinomzellen erhöht und die Tumorzellen so gegenüber WT1-spezifischen T-Zellen sensibilisiert (Takahara et al., 2011). Unsere und andere Gruppen konnten zeigen, dass die Chemotherapie und die DC-basierte Vakzinierung in einem murinen Pankreaskarzinommodell miteinander kombiniert werden können um einen synergistischen therapeutischen Effekt zu erreichen (Bauer et al., 2007). Im ursprünglichen Protokoll dieser Studie war vorgesehen, dass ein Arm mit alleiniger Vakzinierung mit einem Arm mit Gemcitabin und zusätzlich DC-Vakzinierung miteinander verglichen werden. Jedoch zeigten die Ergebnisse klinischer Studien der letzten zwei Jahrzehnte, dass Gemcitabin und keinesfalls *best supportive care* die Therapie der Wahl in der Behandlung der

überwiegenden Anzahl von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom ist. Unter ethischen Gesichtspunkten musste daher allen in das Studienprotokoll eingeschlossenen Patienten eine Chemotherapie mit Gemcitabin angeboten werden.

4.3. Klinische Relevanz der vorgelegten Arbeit

Ein Haupthindernis für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms ist die Tumorbedingte Immunsuppression. Insbesondere gilt dies bei Patienten mit einer großen Tumorlast (Hiraoka et al., 2006; Lin et al., 2006; von Bernstorff et al., 2001). Es ist daher anzunehmen, dass bei Pankreaskarzinompatienten gerade eben die Kombination mit Gemcitabin bei Vakzinierungsstrategien besonders effektiv wirken kann. Zudem kann das Analysieren einer Antitumor-T-Zell-Antwort vor der Vakzinierung eine vielversprechende Strategie sein um diejenigen Patienten zu selektieren, die eher von einer eventuellen DC-Therapie profitieren werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die DC-basierte Vakzinierung bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom durchführbar und sicher ist. Immunologische Antworten auf die DC-Vakzinierung wurden durch die begleitende Chemotherapie nicht beeinträchtigt. Das Vorhandensein von Tumor-reaktiven T-Zellen vor der Vakzinierung war mit einem erhöhten Überleben nach Chemo- bzw. Immuntherapie verbunden. Hieraus ergibt sich, dass DC-Vakzine-basierte Therapieansätze durchaus eine Chance haben in den Algorithmus der Therapie solider Tumore wie des Pankreaskarzinoms Eingang zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Tumoren in fortgeschrittenem Stadium untersucht, bei denen durch Induktion oder Steigerung einer Immunantwort nur bedingt Effekte auf Parameter wie Tumorgröße und Überleben zu erwarten sind. Diese Studie kann jedoch als Basis dienen, Protokolle zu generieren bei denen DC zur adjuvanten Therapie bei Patienten nach Operation eines Pankreaskarzinoms genutzt werden. In diesem Szenario ist – basierend auf den vielversprechenden Immunmonitoring-Daten der vorliegenden Arbeit – mit einer sehr guten Wirksamkeit zu rechnen.

5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung

Die Optionen bei der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms sind trotz kürzlich publizierter Erfolge bei der Intensivierung der Chemotherapie-Schemata weiterhin unbefriedigend. Die Immuntherapie nutzt die Fähigkeit des Immunsystems entartete Körperzellen zu erkennen und zu eliminieren. Eine Therapie mit DC, die außerhalb des Körpers mit Tumorantigen beladen und aktiviert wurden, umgeht dabei zumindest einige der immunsuppressiven Mechanismen, mit denen Tumorzellen sich vor diesen körpereigenen Abwehrmechanismen schützen. Eine offene Fragestellung ist hierbei, ob Immun-stimulierende Vakzinierungsverfahren mit Immun-suppressiven Chemotherapeutika sinnvoll kombiniert werden können. Diese Fragestellung ist von hoher Bedeutung für eine mögliche Integration immuntherapeutischer Verfahren in den klinisch-onkologischen Therapiealgorithmus. Ein Verzicht auf etablierte Chemotherapeutika in der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom erscheint derzeit ethisch nicht möglich. Bei der Planung klinischer Studien zur Immuntherapie ist daher die gleichzeitige Chemotherapie miteinzubeziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Praktikabilität, Nebenwirkungsprofil sowie klinisches und immunologisches Ansprechen einer autologen, DC-basierten Vakzinierungstherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom untersucht. Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, immunologische Parameter vor, während und nach der mit Gemcitabin kombinierten DC-Vakzinierungstherapie zu erheben und mit dem klinischen Ansprechen zu korrelieren.

Aus peripherem Blut der Patienten konnten zuverlässig DC hoher Qualität generiert und mit Tumorsatz beladen werden. Die Vakzinierungstherapie wurde durch die Patienten gut vertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die DC-Vakzinierungstherapie trotz begleitender Chemotherapie mit Gemcitabin zu einem immunologischen Ansprechen führte. Durch die Vakzinierungstherapie konnte die Frequenz reaktiver T-Zellen gesteigert werden. Das mediane Überleben lag bei 10,5 Monaten, die Einjahres-

Überlebensrate bei 42%. Das Vorhandensein Tumor-reaktiver T-Zellen bereits vor Beginn der Therapie war mit einem verlängerten Überleben assoziiert.

In dieser Studie wurden Patienten mit weit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und sehr schlechter Prognose untersucht. Bei diesen Patienten ist von starken immunsuppressiven Effekten durch die hohe Tumorlast auszugehen. Trotz dieser schwierigen Voraussetzungen konnte belegt werden, dass durch eine DC-basierte Vakzinierungstherapie – auch unter begleitender Chemotherapie mit Gemcitabin – eine Tumor-spezifische T-Zell-Antwort induziert, beziehungsweise verstärkt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Adler, G. et al., 2007. [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]. *Z Gastroenterol*, 45(6): 487-523.

Banchereau, J. et al., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18: 767-811.

Bauer, C. et al., 2007. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut*, 56(9): 1275-82.

Bayne, L. J. et al., 2012. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell*, 21(6): 822-35.

Biswas, S. K., P. Allavena und A. Mantovani, 2013. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*, 35(5): 585-600.

Burris, H. A., 3rd et al., 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, 15(6): 2403-13.

Butturini, G. et al., 2011. Aggressive approach to acinar cell carcinoma of the pancreas: a single-institution experience and a literature review. *Langenbecks Arch Surg*, 396(3): 363-9.

Carpelan-Holmstrom, M. et al., 2005. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut*, 54(3): 385-7.

Chaux, P., N. Favre, M. Martin und F. Martin, 1997. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer*, 72(4): 619-24.

Clark, C. E. et al., 2007. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*, 67(19): 9518-27.

Clemente, C. G. et al., 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 77(7): 1303-10.

Conroy, T. et al., 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 364(19): 1817-25.

Curiel, T. J. et al., 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9): 942-9.

Dauer, M. et al., 2005. Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells. *J Immunother*, 28(4): 332-42.

Dauer, M. et al., 2008. Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E(2) in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production. *J Immunol Methods*, 337(2): 97-105.

Dauer, M. et al., 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*, 170(8): 4069-76.

Dauer, M., M. Schnurr und A. Eigler, 2008. Dendritic cell-based cancer vaccination: quo vadis? *Expert Rev Vaccines*, 7(7): 1041-53.

Fridman, W. H., F. Pages, C. Sautes-Fridman und J. Galon, 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12(4): 298-306.

Fukunaga, A. et al., 2004. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 28(1): e26-31.

Gabrilovich, D. I. und S. Nagaraj, 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3): 162-74.

Galon, J. et al., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795): 1960-4.

Gameiro, S. R., J. A. Caballero, J. P. Higgins, D. Apelian und J. W. Hodge, 2011. Exploitation of differential homeostatic proliferation of T-cell subsets following chemotherapy to enhance the efficacy of vaccine-mediated antitumor responses. *Cancer Immunol Immunother*, 60(9): 1227-42.

Gelbard, A. et al., 2006. Combination chemotherapy and radiation of human squamous cell carcinoma of the head and neck augments CTL-mediated lysis. *Clin Cancer Res*, 12(6): 1897-905.

Ghansah, T. et al., 2013. Dendritic cell immunotherapy combined with gemcitabine chemotherapy enhances survival in a murine model of pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 62(6): 1083-91.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten und M. Karin, 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-99.

Gulley, J. L., R. A. Madan und P. M. Arlen, 2007. Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. *Vaccine*, 25 Suppl 2: B89-96.

Heinemann, V., S. Boeck, A. Hinke, R. Labianca und C. Louvet, 2008. Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 8(1): 82.

Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge und S. Hirohashi, 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, 12(18): 5423-34.

Hirooka, Y. et al., 2009. A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas*, 38(3): e69-74.

Hou, J. M. et al., 2005. Combination of low-dose gemcitabine and recombinant quail vascular endothelial growth factor receptor-2 as a vaccine induces synergistic antitumor activities. *Oncology*, 69(1): 81-7.

Ishizaki, H. et al., 2011. Modified vaccinia Ankara expressing survivin combined with gemcitabine generates specific antitumor effects in a murine pancreatic carcinoma model. *Cancer Immunol Immunother*, 60(1): 99-109.

Kan, S. et al., 2012. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. *Anticancer Res*, 32(12): 5363-9.

Kang, T. H. et al., 2013. Chemotherapy acts as an adjuvant to convert the tumor microenvironment into a highly permissive state for vaccination-induced antitumor immunity. *Cancer Res*.

Kantoff, Philip W. et al., 2010. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363: 411-422.

Kubuschok, B. et al., 2004. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer*, 109(4): 568-75.

Le, H. K. et al., 2009. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*, 9(7-8): 900-9.

Lin, Y. et al., 2006. Serum transforming growth factor-beta1 levels and pancreatic cancer risk: a nested case-control study (Japan). *Cancer Causes Control*, 17(8): 1077-82.

Louvet, C. et al., 2005. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol*, 23(15): 3509-16.

Maniati, E., R. Soper und T. Hagemann, 2010. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene*, 29(42): 5653-62.

Martins, I. et al., 2009. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle*, 8(22): 3723-8.

Menard, C., F. Martin, L. Apetoh, F. Bouyer und F. Ghiringhelli, 2008. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, 57(11): 1579-87.

Mundy-Bosse, B. L. et al., 2011. Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. *Cancer Res*, 71(15): 5101-10.

Nestle, F. O. et al., 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4(3): 328-32.

Nowak, A. K. et al., 2003. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol*, 170(10): 4905-13.

Nowak, A. K., B. W. Robinson und R. A. Lake, 2002. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemoimmunotherapy. *Cancer Res*, 62(8): 2353-8.

Ozols, R. F. et al., 2007. Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*, 25(1): 146-62.

Pages, F. et al., 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, 353(25): 2654-66.

Plate, J. M., A. E. Plate, S. Shott, S. Bograd und J. E. Harris, 2005. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother*, 54(9): 915-25.

Pollard, J. W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4(1): 71-8.

Quante, M., J. Varga, T. C. Wang und F. R. Greten, 2013. The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology*, 145(1): 63-78.

Rothenberg, M. L. et al., 1996. A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol*, 7(4): 347-53.

Schmitz-Winnenthal, F. H. et al., 2005. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res*, 65(21): 10079-87.

Schnurr, M. et al., 2001. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res*, 61(17): 6445-50.

Sharma, P. et al., 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10): 3967-72.

Shevchenko, I. et al., 2012. Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *Int J Cancer*.

Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda und S. Ostrand-Rosenberg, 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, 179(2): 977-83.

Steinman, R. M. und J. Banchereau, 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161): 419-26.

Suzuki, E., V. Kapoor, A. S. Jassar, L. R. Kaiser und S. M. Albelda, 2005. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, 11(18): 6713-21.

Takahara, A. et al., 2011. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother*, 60(9): 1289-97.

Taketo, M. M., 2009. Role of bone marrow-derived cells in colon cancer: lessons from mouse model studies. *J Gastroenterol*, 44(2): 93-102.

Troy, A. J., K. L. Summers, P. J. Davidson, C. H. Atkinson und D. N. Hart, 1998. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 4(3): 585-93.

von Bernstorff, W. et al., 2001. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7(3 Suppl): 925s-932s.

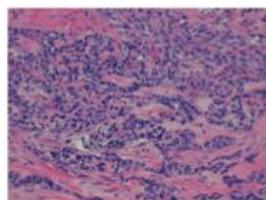
Wu, S. et al., 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, 15(9): 1016-22.

Wynn, T. A., A. Chawla und J. W. Pollard, 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446): 445-55.

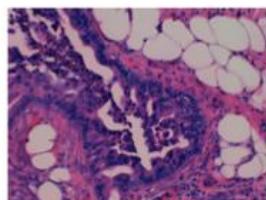
Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli und G. Kroemer, 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 8(1): 59-73.

Zitvogel, L. et al., 2010. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res*, 16(12): 3100-4.

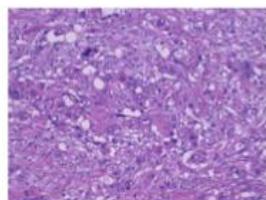
7. Anlagen



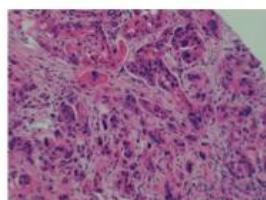
Pat. 40



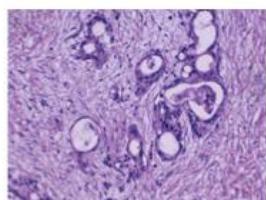
Pat. 42



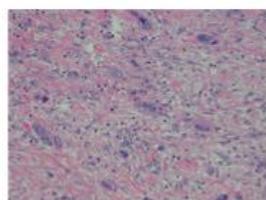
Pat. 44



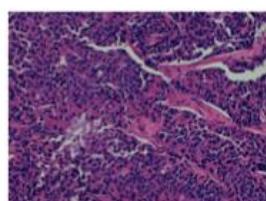
Pat. 45



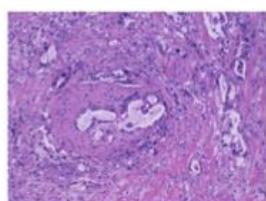
Pat. 47



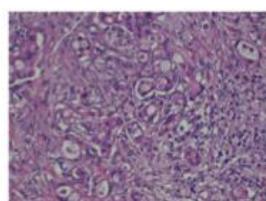
Pat. 51



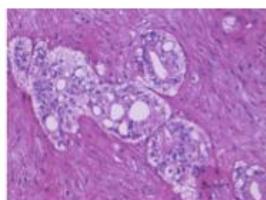
Pat. 52



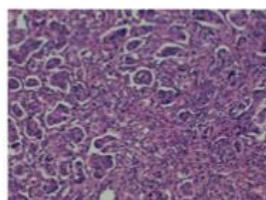
Pat. 53



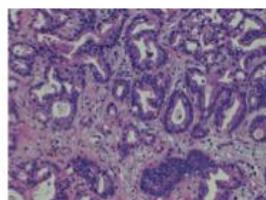
Pat. 54



Pat. 56

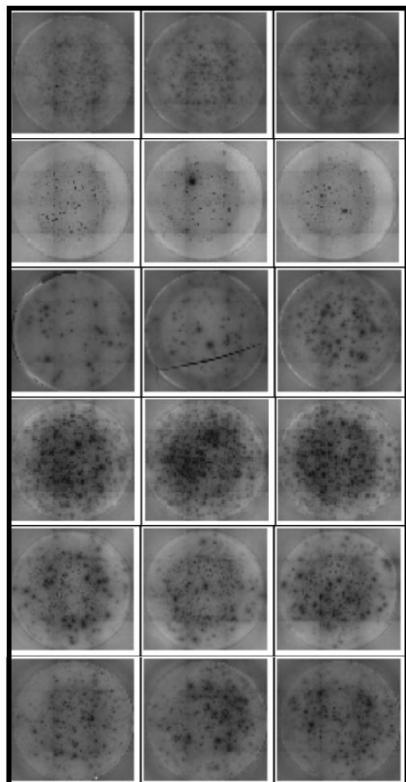


Pat. 61



Pat. 62

Anlage 1: Tumорhistologie der Tumore der vakzinierten Patienten. Histologische Schnitte der Pankreastumoren aller vakzinierten Patienten sind in 20facher Vergrößerung dargestellt. Der Tumor des Patienten 52 zeigte eine positive Immunreaktion auf α 1-AT und CK19 und wurde als Azinuszellkarzinom klassifiziert. Die übrigen Tumore wurden als duktale Pankreaskarzinome eingeordnet.



Woche 0

Woche 17

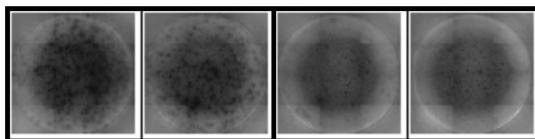
Woche 23

Woche 34

Woche 54

Woche 68

Woche 68, unbeladene DC



Positiv-
kontrolle

Negativ-
kontrolle

Anlage 2: ELISPOT-Assay Patient 52. Unter DC-Vakzinierung kam es zu einem anhaltenden Anstieg der Frequenz IFN- γ -produzierender CD8 $^{+}$ T-Zellen nach Stimulation mit Tumorantigen.

8. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cpm	<i>Counts per minute</i>
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	delayed type hypersensitivitäts Hauttest
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
5-FU	5-Fluoruracil
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PgE2	Prostaglandin E 2
PHA	Phytohämagglutinin
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
Th	T-Helfer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

9. Danksagung

Ich danke herzlich allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Andreas Eigler für die Bereitstellung und Entwicklung des interessanten Themas sowie seine Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Christian Bauer für seine stets kompetente Betreuung. Ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

Frau Rosemarie Kiefl für die Einarbeitung in die Labormethoden und ihre unermüdliche Hilfe bei den Versuchsdurchführungen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie sowie des Gastroenterologischen Labors gebührt besonderer Dank für die freundliche Aufnahme und die tägliche bereitwillige Unterstützung bei der Umsetzung dieser Forschungsarbeit.

Und nicht zuletzt gilt mein kaum in Worte zu fassender Dank meinen Eltern und meinem lieben Ehemann Herrn Said Yama Sadat für seine unerschöpfliche Geduld mit mir.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 22.12.2014

Saraj

.....
(Samira Saraj)

Dissertation eingereicht am: 20.04.2014