

Aus der  
Universitätshautklinik Tübingen

**Analyse klinischer Einflussfaktoren zur  
Vorhersage des Therapieansprechens auf eine  
zielgerichtete Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren  
und Immuncheckpoint- Blockade beim metastasierten  
Melanom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Lenders, Max Matthias**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Eigentler

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 25.02.2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Malignes Melanom .....	1
1.1.1 Inzidenz.....	1
1.1.2 Pathogenese .....	1
1.1.3 Neue Therapieformen .....	4
1.2 Fragestellung .....	5
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Datenerfassung.....	9
2.2 Klinische Merkmale .....	10
2.3 Metastasenkinetik.....	11
2.4 Statistik.....	14
2.4.1 Bestimmung von Grenzwerten für metrische Variablen .....	14
2.4.2 Univariate Analyse .....	15
2.4.3 Multivariate Analyse .....	15
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>17</b>
3.1 Ergebnisse BRAFi- Mono- und BRAFi- und MEKi- Kombinationstherapie.....	17
3.1.1 Stichprobenbeschreibung.....	17
3.1.1.1 Geschlechterverteilung.....	17
3.1.1.2 Altersverteilung.....	17
3.1.2 Überlebenszeitanalyse .....	19
3.1.3 Analyse des Einflusses klinischer Merkmale auf das Gesamtüberleben und das Progressionsfreie Überleben bei Patienten mit BRAFi- Mono- und BRAFi und MEKi- Kombinationstherapie.....	21
3.1.4 Multivariate Analyse .....	29
3.1.4.1 Multivariate Analyse Gesamtüberleben .....	29
3.1.4.2 Multivariate Analyse Progressionsfreies Überleben .....	31
3.1.5 Analyse Bestes Objektives Ansprechen.....	33

---

3.2	Ergebnisse Nivolumab und Pembrolizumab.....	34
3.2.1	Stichprobenbeschreibung.....	34
3.2.1.1	Geschlechterverteilung.....	34
3.2.1.2	Altersverteilung.....	34
3.2.1.3	Hirn- und Lebermetastasen .....	34
3.2.2	Multivariate Analyse Gesamtüberleben.....	35
3.2.3	Analyse Bestes Objektives Ansprechen.....	36
3.3	Vergleich: Ergebnisse Zielgerichtete Therapie und Immuncheckpoint Blockade .....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>53</b>
	Anhangsverzeichnis .....	53
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>71</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>72</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>73</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Ausmessung schnell und langsam wachsender Metastasen (CT-Bilder) .....	13
Abbildung 2: Bestimmung der Metastasenwachstumsrate .....	14
Abbildung 3: Altersverteilung Zielgerichtete Therapie - gesamte Stichprobe ...	18
Abbildung 4: Altersverteilung Zielgerichtete Therapie - Aufteilung der Kohorte.....	18
Abbildung 5: Gesamte Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben .....	20
Abbildung 6: BRAFi Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben .....	20
Abbildung 7: BRAFi und MEKi Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben .....	21
Abbildung 8: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben beider Kohorten in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	27

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Merkmale - Grenzwerte .....	22
Tabelle 2: Univariate Analyse der Auswirkung metrischer klinischer Merkmale auf OS und PFS.....	22
Tabelle 3: Univariate Analyse der Auswirkung nicht metrischer klinischer Merkmale auf OS und PFS.....	28
Tabelle 4: Multivariate Cox-Regression: Gesamtüberleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	30
Tabelle 5: Multivariate Cox-Regression: Gesamtüberleben der BRAFi u. MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	31
Tabelle 6: Multivariate Cox-Regression: Progressionsfreies Überleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale.....	32
Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression: Progressionsfreies Überleben der BRAFi u. MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	33
Tabelle 8: Stichprobenübersicht – Immuncheckpoint Blockade .....	35
Tabelle 9: Multivariate Analyse: Einfluss klinischer Merkmale auf das Gesamtüberleben in den Immuntherapie Kohorten .....	36
Tabelle 10: Bestes Objektives Ansprechen in Abhängigkeit von der Wachstumsrate.....	37

## Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BRAF <sub>i</sub>	BRAF Inhibitoren
BZW	Beziehungsweise
CR	Complete Response
CT	Computertomographie
FDA	Food and Drug Administration
HR	Hazard Ratio
LDH	Laktatdehydrogenase
MEK <sub>i</sub>	MEK Inhibitoren
MRT	Magnetresonanztomographie
NLR	Neutrophil-to-Lymphocyte ratio
OR	ODDS Ratio
OS	Overall Survival
PD	Programmed Death
PD	Progressive Disease
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	Progressionfree Survival
PR	Partial Response
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
SD	Stable Disease
SD	Standardabweichung
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TUK	Tumorkonferenz
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom, das in der Bevölkerung als schwarzer Hautkrebs bezeichnet wird, nimmt nicht nur in medizinischen Tumorzentren, sondern auch in dem Bewusstsein der Allgemeinbevölkerung eine zunehmend größere Rolle ein (Watson et al., 2016). Größere Umweltbelastungen, wachsende Ozonlöcher, geändertes Freizeitverhalten (Gallagher et al., 2010) und vermehrtes Reisen sorgen dafür, dass die ultraviolette Strahlenbelastung für den Einzelnen zunimmt (Narayanan et al., 2010). Der Einfluss der UV-Strahlung auf die Melanomentstehung wird im Kapitel Pathogenese erläutert.

### 1.1.1 Inzidenz

Das maligne Melanom erfuhr in den letzten Jahren einen weltweiten Anstieg der Inzidenz (Ali et al., 2013). Konnten 2012 noch 232.000 Neuerkrankungen weltweit registriert werden (Ferlay et al., 2015), waren es im Jahr 2015 bereits 351.880 Neuerkrankungen (Karimkhani et al., 2017). Die Inzidenz variiert je nach Kontinent, zwischen einzelnen Ländern und zwischen ethnischen Populationen innerhalb dieser Länder. So wurde in epidemiologischen Studien die höchste Inzidenzrate in Australien und Neuseeland, gefolgt von Nordamerika nachgewiesen. Innerhalb von Europa wird sowohl ein abnehmendes Nord-Süd als auch ein Ost-West Gefälle beschrieben (Ali et al., 2013). Daraus folgt eine unterschiedliche Bedeutung der Erkrankung in verschiedenen Regionen.

In Deutschland stieg die Inzidenz im Laufe der letzten Dekaden ebenfalls deutlich an. In Süddeutschland konnte zum Beispiel von 1976-2003 bei Frauen eine Verdreifachung der Inzidenz auf 10.3 und bei Männern auf 13.3 pro 100.000 Einwohner festgestellt werden (Lasithiotakis et al., 2006).

### 1.1.2 Pathogenese

Melanome sind maligne, sich aus Melanozyten entwickelnde Tumoren. Melanozyten kommen unter anderem in der Basalzellschicht der Epidermis, in der Mukosa und in der Aderhaut des Auges vor (Leonardi et al., 2018). Bei der Pa-

thogenese wird von einem Zusammenspiel aus chronischer und intermittierender UV-Belastung ausgegangen, sowie von einer genetischen Prädisposition (Rastrelli et al., 2014). Als wichtiger Risikofaktor für die Melanomentstehung scheint vor allem die akut-intermittierende UV-Exposition eine Rolle zu spielen (ARMSTRONG, 1988). In Studien konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Sonnenbränden und dem Melanomrisiko aufgezeigt werden (Dennis et al., 2008). Einige Studien postulieren, dass vor allem Sonnenbrände in der Kindheit das Melanomrisiko erhöhen (Williams and Pennella, 1994), wobei hierzu jedoch kontroverse Daten existieren (Dennis et al., 2008).

Als intrinsische Risikofaktoren gelten ein konstitutionell heller Hauttyp, kongenitale melanozytäre Naevi, positive Familienanamnese und Mutationen in ausgewiesenen Genen (Liu and Sheikh, 2014).

In der Pathogenese des malignen Melanoms sind molekulare Veränderungen, sogenannte Treibermutationen (engl. driver mutations) von zentraler Bedeutung, hier sind unter anderem veränderte Gene wie z.B. BRAF, NRAS, C-KIT, PI3K-AKT/PTEN, p53 und CDK4/CDKN2A zu nennen (Liu and Sheikh, 2014).

Eine Mutation des BRAF Gens, ein Protoonkogen, führt zur Aktivierung des mitogen-activated Protein-Kinase-Signalwegs (MAP-Kinase-Signalweg) (Chan et al., 2017). Dieser Signalweg hat wiederum Proliferation und Zellwachstum zur Folge. In Melanomen ist die Mutation der BRAF Kinase die häufigste (40-60 %), dicht gefolgt von Mutationen im NRAS Protoonkogen (15-20 %) (Cheng et al., 2018, Curtin et al., 2005). Die Mehrheit der Mutationen im BRAF Gen, das für eine Serin/Threonin Kinase kodiert, befindet sich im Kodon 600. Die häufigste Form der Mutation, eine Transversion von Thymin zu Adenin, führt zu einem Austausch von Valin durch Glutaminsäure an Position 600, resultierend in einer BRAF V600E Mutation (Cheng et al., 2018). Im Vergleich zu BRAF Wildtyp Patienten weisen Patienten mit einer BRAF V600E Mutation häufig eine aggressivere Verlaufsform auf (Hugdahl et al., 2016). So sind Patienten mit BRAF Mutation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose jünger, es kommt häufiger zur Metastasierung ins Gehirn und das Gesamtüberleben im Stadium IV ist deutlich reduziert (Cheng et al., 2018).

In den letzten Jahren ist das Immunsystem zunehmend in den Fokus bei der Entstehung und Bekämpfung von Tumoren und Metastasen, die die Hauptursache bei Tumoren darstellen, geraten (Jemal et al., 2009). Melanomen stehen unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung, um das Immunsystem zu umgehen. Unter anderem exprimieren sie Liganden wie PD-L1/2 (Programmed Death Ligand 1/2), die die T-Zellen über deren PD-1-Rezeptoren binden und dadurch entscheidend in der Funktion hemmen und damit durch die Immuncheckpointaktivierung inhibieren. Hierdurch kann das Malignom ungehindert proliferieren (Passarelli et al., 2017).

### 1.1.3 Neue Therapieformen

#### ***Zielgerichtete Therapie***

Die oben beschriebenen Genmutationen in den BRAF und NRAS Onkogenen führen mittels MAP-Kinase Signalweg zur Aktivierung des Zellwachstums und zur Proliferation. Die zielgerichteten Therapien greifen genau hier an (Flaherty, 2012).

Der 2011 von der Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von fortgeschrittenen malignen Melanomen zugelassene, selektive BRAF-Inhibitor Vemurafenib, inhibiert die mutierte Serin-Threonin Kinase (Livingstone et al., 2014). Dabrafenib, ein 2013 von der FDA zugelassener BRAF-Inhibitor, hat den gleichen Ansatz wie Vemurafenib und wird ebenfalls einzeln oder in Kombination mit MEK- Inhibitoren (Cobimetinib, Trametinib) eingesetzt (Livingstone et al., 2014). Die Wirksamkeit von Vemurafenib ist bei BRAF mutierten Melanomen im Vergleich zu herkömmlichen Therapien wie Chemotherapie signifikant besser (Mackiewicz and Mackiewicz, 2018, Chapman et al., 2011). Es können sowohl bessere Gesamtüberlebenszeiten als auch verbesserte Progressionsfreie Überlebenszeiten erreicht werden (Chapman et al., 2011).

Der MAP-Kinase-Weg wird neben den BRAF Kinasen von den MAP Kinasen bestimmt, diese folgen in der Signalkaskade den BRAF Kinasen (Domingues et al., 2018). Da das Therapieansprechen auf BRAF-Inhibitoren oftmals nur von kurzer Dauer ist und es zu Resistenzen kommt, werden diese bereits seit mehreren Jahren mit MEK-Inhibitoren (Cobimetinib, Trametinib und Binimetinib) kombiniert (Flaherty et al., 2012, Eroglu and Ribas, 2016). Durch die Kombination von BRAF- und MEK-Inhibitoren werden Resistenzmechanismen durchbrochen und ein längeres Therapieansprechen erzielt (Livingstone et al., 2014).

#### ***Immuntherapie***

Gegen die oben beschriebenen, vom Melanom zu Nutze gemachten Immuncheckpoints wird eine Immuncheckpoint-Blockade, mit im Labor synthetisierten Antikörpern, angewendet. Die Interaktion zwischen Melanomzellen und T-Zellen kann durch monoklonale Antikörper gegen den PD-1 Rezeptor oder gegen den

PD-L1 Liganden blockiert werden. Hierdurch wird der Mechanismus zur Ver-nichtung der Tumorzelle T-Zell vermittelt aktiviert (Hargadon et al., 2018).

Nivolumab ist ein monoklonaler Antikörper mit einer hohen Affinität zum PD-1-Rezeptor und wurde 2014 von der FDA zugelassen (Raedler, 2015). Der Anti-körper bindet den Rezeptor und verhindert dadurch die Bindung des PD-1 Re-zeptors mit den entsprechenden Liganden PD-L1/2. Durch diese Immuncheck-point- Inhibition wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die das Immunsystem akti-viert und die Tumorprogression verhindert (Specenier, 2016).

Pembrolizumab ist seit 2015 von der FDA zugelassen und wie Nivolumab für die Behandlung von fortgeschrittenen Melanom-Erkrankungen in Anwendung. Die Wirkweise ist mit der von Nivolumab vergleichbar (Domingues et al., 2018).

Neben dem anti-PD-1 Rezeptor Antikörper Nivolumab als Monotherapie, kommt heute der anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab in Kombination mit Nivolumab zum Einsatz (Larkin et al., 2019).

## **1.2 Fragestellung**

Steigende Inzidenzen des Melanoms, verbunden mit erhöhter Mortalität (Giblin and Thomas, 2007), haben die Erforschung neuartiger Therapien vorangetrie-ben, die mit hohen Therapiekosten verbunden sind (Curl et al., 2014). Neue Therapiemöglichkeiten spenden den betroffenen Patienten Hoffnung, stellen jedoch den Kliniker vor neue Herausforderungen hinsichtlich der optimalen The-rapieauswahl. Ziel dieser Arbeit ist es, klinische Parameter zu finden, die es ermöglichen, das Therapieansprechen vorherzusagen. Damit wäre es vorstell-bar, das bestmögliche Therapieregime für Patienten mit ähnlichen Merkmalen einzugrenzen, die Therapieentscheidung zu unterstützen und dadurch die Prognose zu verbessern.

Es wurde nach Parametern gesucht, die einfach, schnell und günstig zu be-stimmen sind, um anhand derer prognostisch relevante Aussagen treffen zu können.

Die klinischen Merkmale wurden für Patienten untersucht, die eine zielgerichte-te Therapie mit BRAFi und MEKi oder eine Immuncheckpoint-Blockade mit

PD-1 Antikörpern erhielten. Der prognostische Einfluss der klinischen Parameter wurde in den Kohorten sowohl anhand des Progressionsfreien Überlebens (engl. „progression-free survival“, PFS) als auch anhand des Gesamtüberlebens (engl. „overall survival“, OS), gemessen. Außerdem wurde die Auswirkung der Parameter auf das Therapieansprechen in den unterschiedlichen Kohorten miteinander verglichen, mit dem Ziel Unterschiede zwischen den Therapieformen herauszuarbeiten, die die Therapieentscheidung hinsichtlich Immuntherapie oder zielgerichtete Therapie unterstützen könnten.

Es wurde untersucht, ob in der klinischen Routine etablierte Laborparameter wie LDH (Finck et al., 1983), (Mårtenson et al., 2001), (Mocellin et al., 2008), (Weide et al., 2013), S100B (Wagner et al., 2018), oder die unterschiedlichen Zellzahlen der Zellreihen des Differentialblutbildes (Martens et al., 2016) eine ausreichende Aussagekraft besitzen oder durch andere ergänzt bzw. ersetzt werden sollten.

Ein möglicher neuer, prognostisch relevanter Parameter könnte die Metastasenkinetik sein (Gaudy-Marqueste et al., 2014), (Hartung et al., 2017). Unter Metastasenkinetik versteht man die Parameter, die eine Veränderung der Tumormasse pro Zeit darstellen und die somit ein Maß für die Aggressivität des Tumors sind, zum Beispiel die Wachstumsrate (Collins et al., 1956). Es ergab sich unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage die Frage, ob durch Bestimmung der Wachstumsrate oder der Tumor-Verdoppelungszeit vor Therapiebeginn ein prädiktives Werkzeug vorhanden ist, um die zu erwartende Wirksamkeit, gemessen am Gesamtüberleben, am Progressionsfreien Überleben oder am besten objektiven Ansprechen nach RECIST, vorausszusagen. Die Arbeit von Gaudy-Marqueste und Kollegen stellt den Zusammenhang zwischen unterschiedlich schnell wachsenden Metastasen und dem davon beeinflussten Therapieansprechen, unter Monochemotherapie, dar. Dieser Zusammenhang unterstreicht die Bedeutung einer schnellen Kinetik beim Melanom, als wichtigen Einflussfaktor (Gaudy-Marqueste et al., 2014). Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob dieser Zusammenhang auch unter BRAFi- und MEKi-Therapie sowie unter Immuncheckpoint- Inhibitor Therapie eine wichtige Rolle spielt und ob hierbei Unterschiede feststellbar sind. Bei der Entschei-

dung für das geeignete Therapieregime bei BRAF V600- mutierten Patienten könnte möglicherweise die Unterscheidung zwischen Patienten mit langsamen und Patienten mit schnellem Progress eine Rolle spielen. Dieses Vorgehen wurde bereits von Jang und Atkins postuliert (Jang and Atkins, 2013). Neben der Metastasenkinetik spielt in Bezug auf die Therapieentscheidung hinsichtlich möglicher Resistenzbildung, welche immer wieder zu Therapieversagen führt, die Liquid Biopsy eine wichtige Rolle in der aktuellen Forschung (Leonardi et al., 2018). Hierbei kann zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) im Blut erfasst werden, die mit dem Voranschreiten der Erkrankung und Resistenzbildung korreliert (Gray et al., 2015). Allerdings ist diese Art der Diagnostik im Rahmen des Melanoms gegenwärtig noch nicht im klinischen Alltag vertreten und daher ebenfalls Gegenstand der Forschung.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten zur Metastasenkinetik wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die die Bestimmung der Metastasenkinetik vereinfacht, sodass diese im klinischen Alltag praktikabler zum Einsatz kommen kann. So wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu Arbeiten einer französischen Arbeitsgruppe um Jean-Jacques Grob und Kollegen (Gaudy-Marqueste et al., 2014, Hartung et al., 2017) bei der alle Metastasen mit einem Durchmesser von mindestens einem Zentimeter in drei Dimensionen ausgemessen wurden (Hartung et al., 2017), eine Zielläsion (in aller Regel die größte Metastase) in einer Dimension hinsichtlich des größten Durchmessers ausgemessen. In dieser Arbeit wird daher ein erheblich effizienteres und somit in den Alltag einfacher zu implementierendes Verfahren untersucht. Auf diese Weise könnte bereits während der Tumorkonferenzen die Kinetik berechnet und Einfluss auf die Therapieentscheidung genommen werden.

Zusammengefasst war das Ziel dieser Arbeit, die Korrelation zwischen den unterschiedlichen Parametern der Tumorkinetik und dem prognostischen Wert, gemessen am Ansprechen der unterschiedlichen Therapieregime, zu erarbeiten. Hierbei sollte außerdem geprüft werden, ob die genannten Parameter im Vergleich zu herkömmlichen klinischen Einflussfaktoren wie S100B, LDH oder dem Differentialblutbild bedeutsamer sind oder diese sogar ersetzen könnten. Vergleichend wurde die zielgerichtete Therapie (BRAFi und MEKi Therapie)

und die Immuncheckpoint-Blockade (Nivolumab/ Pembrolizumab) eingehend untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Datenerfassung

Diese retrospektive Auswertung schloss Patienten ein, die an einem fortgeschrittenen Melanom erkrankt waren und daraufhin mit BRAF- und MEK- Inhibitoren oder PD-1 Immuncheckpoint-Blockade therapiert wurden. Eingeschlossene Patienten wurden in jeweils zwei Kohorten aufgeteilt. Im Rahmen der BRAF- und MEK- Inhibitoren erfolgte die Aufteilung in eine Kohorte mit BRAF Monotherapie (Vemurafenib oder Dabrafenib) und eine Kohorte mit Kombinationstherapie aus BRAF- und MEK- Inhibitor (Dabrafenib+Trametinib oder Vemurafenib+Cobimetinib). Die mit Immuncheckpoint-Blockade behandelte Patientengruppe wurde in eine Nivolumab und eine Pembrolizumab Kohorte unterteilt, sodass sich insgesamt vier Kohorten ergaben. Die Daten wurden pseudonymisiert erfasst und die Datenerhebung von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt (Projektnummer: 436/2017BO2- Kohorte der Immuncheckpoint-Blockade und 257/2018BO2-Kohorte der BRAF- und MEK-Inhibitoren)

Mit Hilfe des Programms Excel 2016, Version 16.0 wurden die Daten dieser Studie systematisch aus dem SAP-System der Universitätshautklinik Tübingen erfasst. Die Tabellen beinhalteten Daten von Patienten vor und nach Therapiebeginn mit BRAF- und MEK-Inhibitoren und Immuncheckpoint-Blockade. In Frage kommende Patienten wurden aus den Tumorkonferenzprotokollen der Jahre 2010 bis 2016 ermittelt. Eingeschlossene Patienten begannen die Therapie zwischen August 2010 und Dezember 2016. Das längste Follow-Up ging bis Mai 2018, wobei das mediane Follow-Up bei sechs Monaten lag.

Im weiteren Verlauf wurden die Daten jedes eingeschlossenen Patienten hinsichtlich vorher festgelegter klinischer Merkmale untersucht. Erhobene Merkmale stammten aus Arztbriefen der Hautklinik und der Radiologie. Weitere Quellen stellten Tumorkonferenz-Protokolle, Laborbefunde und Bildmaterialien aus unterschiedlichen bildgebenden Verfahren dar. Schließlich wurden Patienten eingeschlossen, die eine radiologische Bildgebung an mindestens zwei unterschiedlichen Zeitpunkten erhalten hatten. Hierbei handelte es sich in überwiegender Mehrheit um computertomographische Bilder (CT Bilder). Neben den

CT Bildern wurden aber auch magnetresonanztomographische Bilder (MRT Bilder) und positronen-emissions-tomographische Bilder (PET-CT) verwendet. Die Staginguntersuchungen wurden eingeteilt in Pre-Baseline Staging und Baseline Staging. Dabei wurde als Pre-Baseline Staging jene Untersuchung definiert, die im zeitlichen Verlauf mindestens zwei Wochen vor der Baseline-Untersuchung stattfand. Die Baseline Untersuchung fand in der Regel unmittelbar vor Therapiestart statt. Nach Therapiebeginn erfolgten im Rahmen von Nachkontrollen weitere Staging Untersuchungen.

## **2.2 Klinische Merkmale**

Zunächst wurden verschiedene Basisinformationen wie Alter bei Therapiebeginn, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, Todesdatum, Datum der Progression nach Therapiebeginn und das Therapieschema aus den elektronischen Patientenakten erfasst. Weiterhin wurden im Labor messbare Biomarker, wie beispielsweise LDH, S100B und das Differentialblutbild vor Therapiebeginn ermittelt. Außerdem wurde das TNM Stadium und das klinische Stadium nach der AJCC Klassifikation von 2009 (Balch et al., 2009) bei Therapiebeginn zur Einschätzung der Erkrankung und des Verlaufs erfasst. Aus den histologischen Befunden oder den Tumorkonferenz-Protokollen konnte die Tumordicke nach Breslow, die Lokalisation des Primärtumors, der Subtyp und der Ursprung des Melanoms herausgearbeitet werden. Der Ursprung des Primärtumors wurde unterschieden in kutan, mukös, occult und uveal. Als Subtypen sind Superfiziell Spreitende Melanome (SSM), Noduläre Melanome (NM), Lentigo Maligna Melanome (LMM) und Akrolentiginöse Melanome (ALM) zu nennen (Scolyer et al., 2011).

Außerdem wurden die Metastasen hinsichtlich ihres prognostischen Einflusses untersucht. Hierbei wurde die Gesamttumormasse der Metastasen bestimmt. Die Lokalisation der Metastasen in den unterschiedlichen Körperregionen wurde ebenso bestimmt wie die Anzahl der befallenen Körperregionen. Basierend auf den Informationen der radiologischen Berichte wurden die radiologischen Original-Bilder systematisch ausgewertet.

Als klinische Endpunkte wurden das Gesamtüberleben (OS), das beste objektive Ansprechen (Best Objective Response) und das Progressionsfreie Überleben (PFS) festgelegt. Das Gesamtüberleben wurde als die Zeitspanne zwischen Therapiestart und Todeszeitpunkt oder dem letzten Nachsorgetermin (zensiertes Ereignis) definiert (Cheema and Burkes, 2013). Als Progressionsfreies Überleben wurde die Zeitspanne zwischen dem Start der Therapie und dem ersten Progress unter der Therapie definiert (Cheema and Burkes, 2013).

### **2.3 Metastasenkinetik**

Für die Beschreibung und Analyse der Metastasenkinetik wurde die Wachstumsrate, die Tumor-Verdoppelungszeit, der größte Durchmesser der größten Metastase und die Gesamtsumme der Zielläsionen nach RECIST 1.1 unter Therapie nach den Response Evaluation Criteria In Solid Tumors 1.1 (RECIST) bestimmt (Eisenhauer et al., 2009).

Für die Bestimmung der Tumormasse vor und während der Therapie (nach RECIST 1.1. Kriterien) wurden die maximal fünf größten Metastasen (Zielläsionen) im radiologischen Bildmaterial gemessen. Die Metastasen wurden dabei unidimensional zumeist in der axialen Schnittebene, im größten Durchmesser gemessen. Gemäß den RECIST-Kriterien wurde für die Messung der Lymphknotenmetastasen der senkrecht zum größten Durchmesser stehende kurze Achsendurchmesser verwendet. Dieses Verfahren findet üblicherweise Anwendung, da der Lymphknoten auch physiologisch in einer Größe von einigen Millimetern vorhanden wäre (Eisenhauer et al., 2009).

Zur Bestimmung der Tumormasse wurden aus dem Bildmaterial des Baseline Stagings die größten Durchmesser der fünf größten Metastasen gemessen und die Durchmesser anschließend addiert. Dabei durften, entsprechend der RECIST Kriterien, maximal zwei Metastasen aus einem Organ stammen (Eisenhauer et al., 2009). Dies wurde wiederholt im ersten und zweiten Staging nach Therapiestart durchgeführt. Die Veränderung der Tumormasse im Verlauf der unterschiedlichen Stagings wurde im nächsten Schritt prozentual berechnet und im weiteren Verlauf als bestes objektives Ansprechen dargestellt.

Die RECIST-Kriterien definieren eine Reduktion der Tumormasse um 100 Prozent als Komplettremission (engl. Complete Response, CR). Die Teilremission (engl. Partial Response, PR) wird als eine Reduktion der Tumormasse von mindestens 30 Prozent definiert. Weiterhin wird ein unveränderter Zustand (engl. Stable Disease, SD) als eine Reduktion von weniger als 30 Prozent und ein Zuwachs weniger als 20 Prozent festgelegt. Weiterhin definieren die RECIST-Kriterien eine Progression (engl. Progressive Disease, PD) bei einem Zuwachs der Tumormasse von mindestens 20 Prozent oder bei neu aufgetretenen Metastasen, die zum Zeitpunkt des Therapiestarts noch nicht abgrenzbar waren (Eisenhauer et al., 2009). Anhand der Stagings nach Therapiebeginn konnte so die Best Objective Response der unterschiedlichen Therapien erfasst werden.

Ausgehend von der Annahme, dass die Metastase mit dem größten Durchmesser die wachstumsstärkste und dadurch repräsentativ für das Wachstumsverhalten des metastasierten Tumors ist, wurde diese als Zielläsion und somit als Maß für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit der Erkrankung ausgewählt.

Die Zielläsion als Maß für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde somit als die größte Metastase, gemessen im größten Durchmesser, definiert. Um diese zu ermitteln, wurde das radiologische Bildmaterial systematisch ausgewertet. Dabei wurden die Metastasen, wie Abbildung 1 exemplarisch zeigt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgemessen. Im Folgenden wurde die Wachstumsrate berechnet. Wie in Abbildung 2 ersichtlich, wurde die Wachstumsrate aus dem Quotienten des absoluten Zuwachses und der Zeitdifferenz zwischen den prätherapeutischen Stagings in Tagen errechnet. Anschließend wurde das Ergebnis mit 30,4375 (durchschnittliche Dauer eines Monats in Tagen, basierend auf einem 365 Tage dauernden Kalenderjahr) multipliziert, um die Wachstumsrate in Millimeter pro Monat angeben zu können.

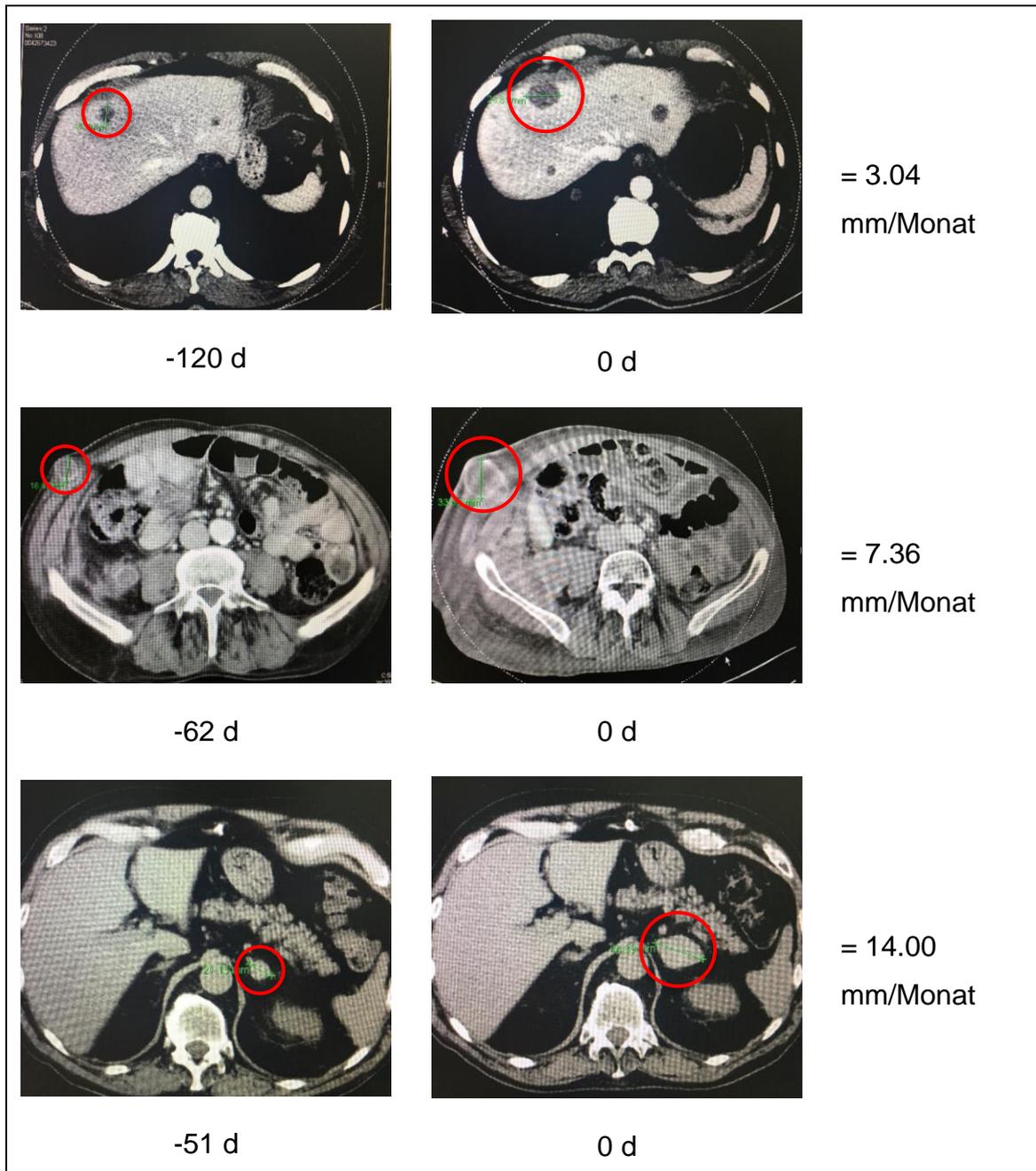


Abbildung 1: Exemplarische Ausmessung schnell und langsam wachsender Metastasen (CT-Bilder)

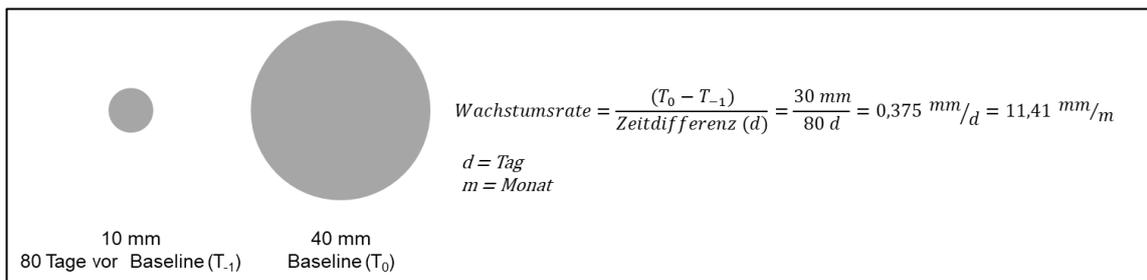


Abbildung 2: Bestimmung der Metastasenwachstumsrate

Die Tumorverdoppelungszeit wurde als weiterer klinischer Parameter aus der Zeitdifferenz zwischen Pre-Baseline- und Baseline Staging und der Veränderung der Durchmesser der Zielläsion ermittelt. Die Berechnung erfolgte anhand der nachstehenden Formel.

$$\text{Tumorverdoppelungszeit (Tage)} = \frac{(\text{Datum PreBaseline Staging} - \text{Datum Baseline Staging})}{\frac{(\text{Durchmesser Baseline} - \text{Durchmesser PreBaseline})}{\text{Durchmesser PreBaseline}}}$$

Bestes objektives Ansprechen, Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben wurden neben den oben genannten klinischen Parametern auch mit der Wachstumsrate und der Tumor-Verdoppelungszeit korreliert.

## 2.4 Statistik

Gemessen am Gesamtüberleben, Progressionsfreien Überleben und dem besten objektiven Ansprechen nach RECIST Kriterien 1.1, wurde die Therapieauswirkung unter dem Einfluss der unterschiedlichen Parameter für die unterschiedlichen Therapieregime ermittelt.

### 2.4.1 Bestimmung von Grenzwerten für metrische Variablen

Für die metrischen Variablen Alter, Anzahl betroffener Regionen, LDH, S100B, Wachstumsrate, Verdoppelungszeit, Tumorgesamtmasse, Durchmesser der größten Läsion, Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Granulozyten sowie Basophile Granulozyten wurde nach Ermittlung eines Trennwertes eine Einteilung in je zwei Gruppen vorgenommen. Die Grenzwerte wurden mit der maxstat Bibliothek für R berechnet. Für LDH und S100B wurden hierzu klinisch etablierte Werte verwendet (250U/L für LDH und 0,1ug/l für S100B).

### 2.4.2 Univariate Analyse

Für jedes der relevanten klinischen Merkmale wurde zunächst univariat analysiert, ob der Parameter einen Effekt auf das Überleben aufwies. Hierzu wurde für jede Ausprägung des jeweiligen Merkmals das mediane Gesamt- sowie das progressionsfreie Überleben berechnet. Zur Signifikanztestung wurde sodann für jedes Merkmal der Log-Rank-Test angewandt. Mit diesem Test wird untersucht, ob die Überlebenszeiten zwischen den Gruppen der Merkmale einen signifikanten Unterschied zeigen. Im Falle eines signifikanten Tests wurde der Einfluss des Merkmals mittels eines nach Gruppen getrennten Kaplan-Meier-Kurvendiagrammes visualisiert. Dies wurde für alle klinischen Merkmale bei BRAFi- Mono- und BRAFi- und MEKi- Kombinationstherapie sowie für einige ausgewählte Merkmale bei Immuncheckpoint-Blockade durchgeführt. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens wurde bei Patienten, die mit Immuncheckpoint-Blockade behandelt wurden, mit Hilfe der univariaten Cox Regression die Hazard Ratio (HR) berechnet. Bei den durchgeführten Berechnungen wurden p-Werte  $<0,05$  als signifikant betrachtet.

### 2.4.3 Multivariate Analyse

Weiterhin wurde für beide Arten von Überleben, OS und PFS und jeweils getrennt nach Gruppe eine multivariate Cox-Regression berechnet. Hierbei wurden alle Merkmale, die in obiger univariater Analyse signifikant waren als unabhängige Variablen ausgewählt.

Des Weiteren wurde für jedes der oben beschriebenen Merkmale sowie getrennt für die zwei Kohorten BRAFi- Monotherapie und BRAFi- und MEKi- Kombinationstherapie der Fisher-Test angewandt, um zu prüfen, ob die Merkmale eine signifikante Assoziation mit dem besten objektiven Ansprechen aufwiesen. Neben den Signifikanzen, angegeben durch die p-Werte, wurden die Odds Ratios ausgewiesen.

Der Fisher-Test kam neben dem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ebenfalls bei der Untersuchung des besten objektiven Ansprechens bei den Immuncheckpoint Inhibitoren zum Einsatz.

Alle Analysen wurden mit R Version 3.5.1. (R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse BRAFi- Mono- und BRAFi- und MEKi-Kombinationstherapie**

##### **3.1.1 Stichprobenbeschreibung**

###### **3.1.1.1 Geschlechterverteilung**

Die Analyse wurde anhand eines Datensatzes von N=193 Patienten vorgenommen. Hiervon waren 87 Patienten (45.1%) weiblich und 106 (54.92%) männlich. Von diesem Kollektiv erhielten 86 (44.6%) Patienten eine Monotherapie mit einem BRAF-Inhibitor sowie 105 (54.4%) Patienten eine Kombinationstherapie mit BRAF- und MEK- Inhibitor. Die BRAF-Inhibitor Kohorte bestand aus 49 (46.7%) Frauen und 56 (53.3%) Männern, die Kohorte BRAF- und MEK-Inhibitor aus 37 (43.0%) Frauen und 49 (57.0%) Männern. Die Geschlechterverteilung kommt in Anhang 1 zur Darstellung.

###### **3.1.1.2 Altersverteilung**

Die Altersverteilung lag zwischen 20 und 83 Jahren. Das arithmetische Mittel betrug, bei einer Standardabweichung von  $SD=12.3$  Jahren, 57 Jahre. Die nachfolgende Abbildung 3 veranschaulicht die Altersverteilung der Stichprobe mittels eines Histogramms, sie ist zweigipflig. Ein Großteil der Probanden war zwischen 30 und 65 Jahre alt, wobei das Histogramm eine Spitze bei ungefähr 51 Jahren zeigte. Der zweite Gipfel befand sich zwischen 70 und 80 Jahren mit einem Gipfel bei 75 Jahren.

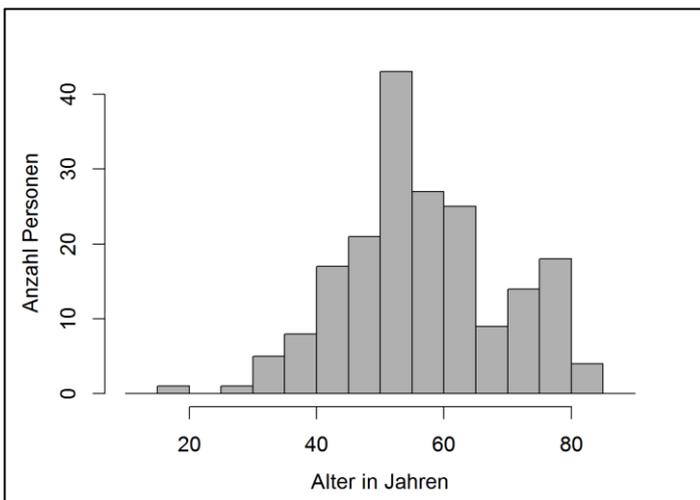


Abbildung 3: Altersverteilung Zielgerichtete Therapie - gesamte Stichprobe

Die Untersuchung der Altersverteilung separat für BRAFi- Mono- und BRAFi- und MEKi- Kombinationstherapie ergab, in Abbildung 4 dargestellt, folgende Verteilung. In der BRAF-Inhibitor Kohorte betrug das arithmetische Mittel des Alters 56 Jahre (SD=11.6 Jahre) bei einer Spannweite von 29 bis 81 Jahren. In der Kohorte der BRAFi und MEKi lag das Alter im arithmetischen Mittel bei 57.8 Jahren (SD=13.2 Jahre), die Spannweite betrug 19 bis 83 Jahren.

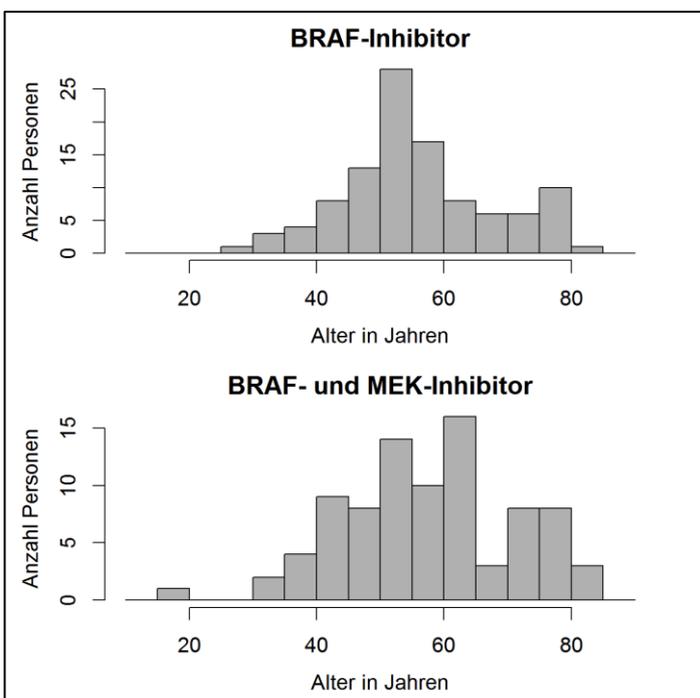


Abbildung 4: Altersverteilung Zielgerichtete Therapie - Aufteilung der Kohorte

Es wurde deutlich, dass die Altersverteilung der zwei Kohorten vergleichbar war. Die Gruppe der BRAF-Inhibitoren zeigte jedoch einen deutlichen Gipfel bei den 50-55-jährigen. Im Gegensatz dazu, zeigte die Verteilung der Kohorte BRAFi und MEKi eine geringfügig breitere Verteilung mit einem weniger deutlich ausgeprägten Maximum bei 60 bis 65 Jahren.

### **3.1.2 Überlebenszeitanalyse**

Das mediane Gesamtüberleben für die gesamte Stichprobe betrug 27.0 Monate. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit betrug 6.1 Monate. Vergleichend lag das OS der BRAFi Kohorte mit 23.5 Monaten unterhalb des Gesamtüberlebens der BRAFi und MEKi Kohorte mit 34.6 Monaten. Ebenso wurde dieses für das Progressionsfreie Überleben gezeigt. Das mediane PFS lag für die BRAFi Kohorte bei 5.3 Monaten gegenüber 8.5 Monaten in der BRAFi und MEKi Kohorte.

Im Folgenden sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abbildung 5-7 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Kurve Progressionsfreien Überlebens innerhalb der ersten 10 Monate besonders steil abfällt, was bedeutet, dass es in diesem Zeitraum am häufigsten zu einem Krankheitsprogress kam. Zudem war auffällig, dass das Gesamtüberleben in den ersten 20 Monaten am stärksten zurückging.

Die Kurven der BRAFi Kohorte verlaufen zu Beginn etwas steiler als die der BRAFi und MEKi Kohorte. Dies korreliert mit den kürzeren Überlebenszeiten (OS, PFS) der BRAFi Kohorte.

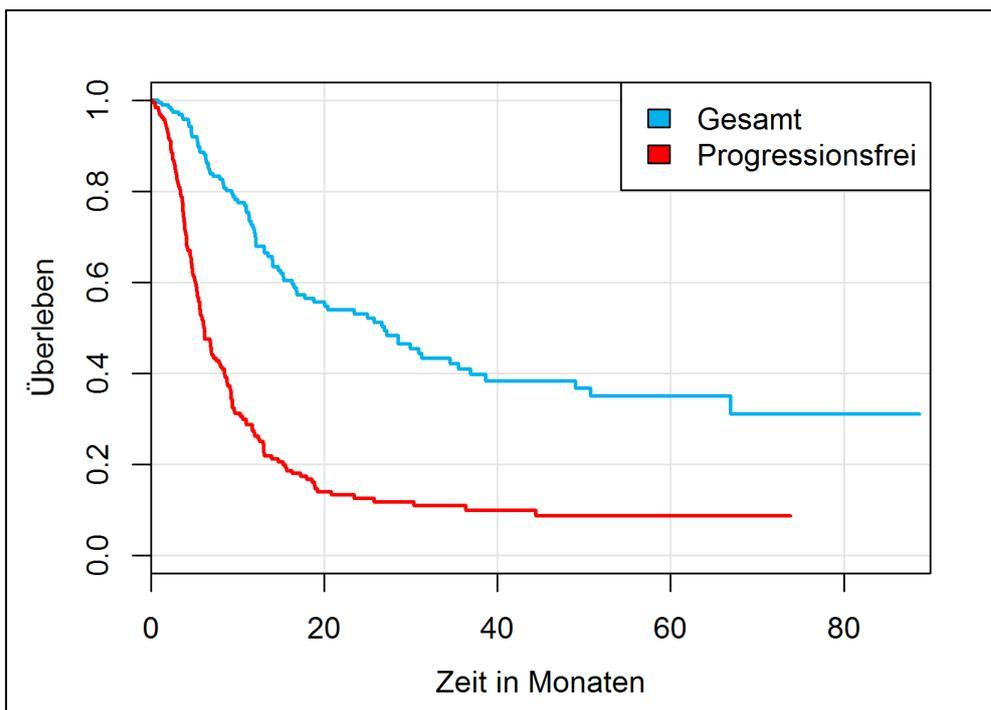


Abbildung 5: Gesamte Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben

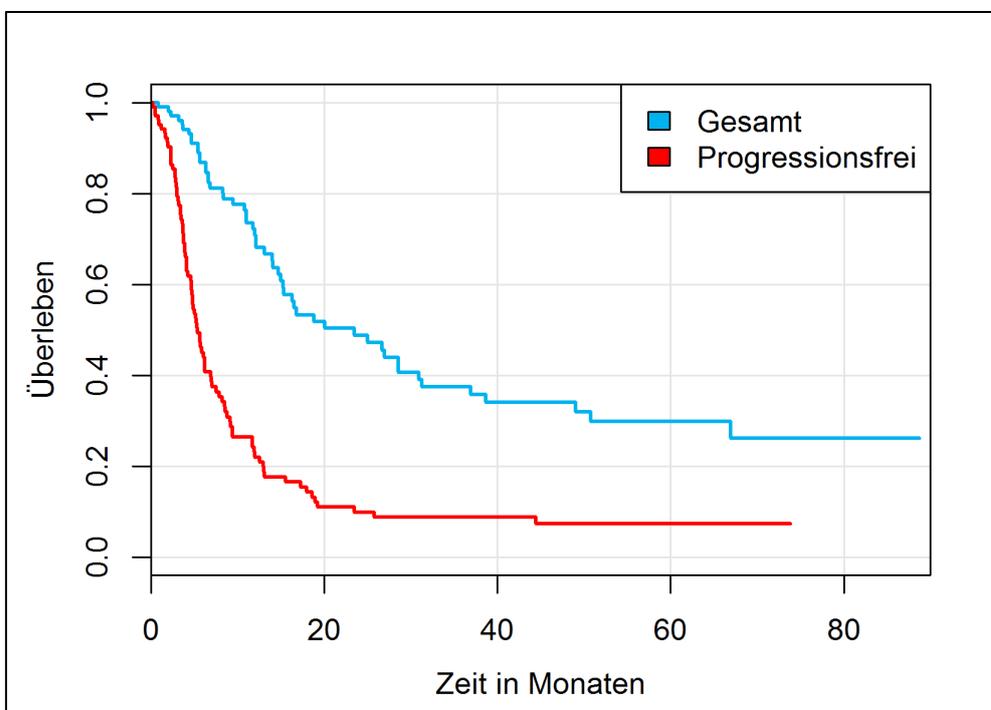


Abbildung 6: BRAFi Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben

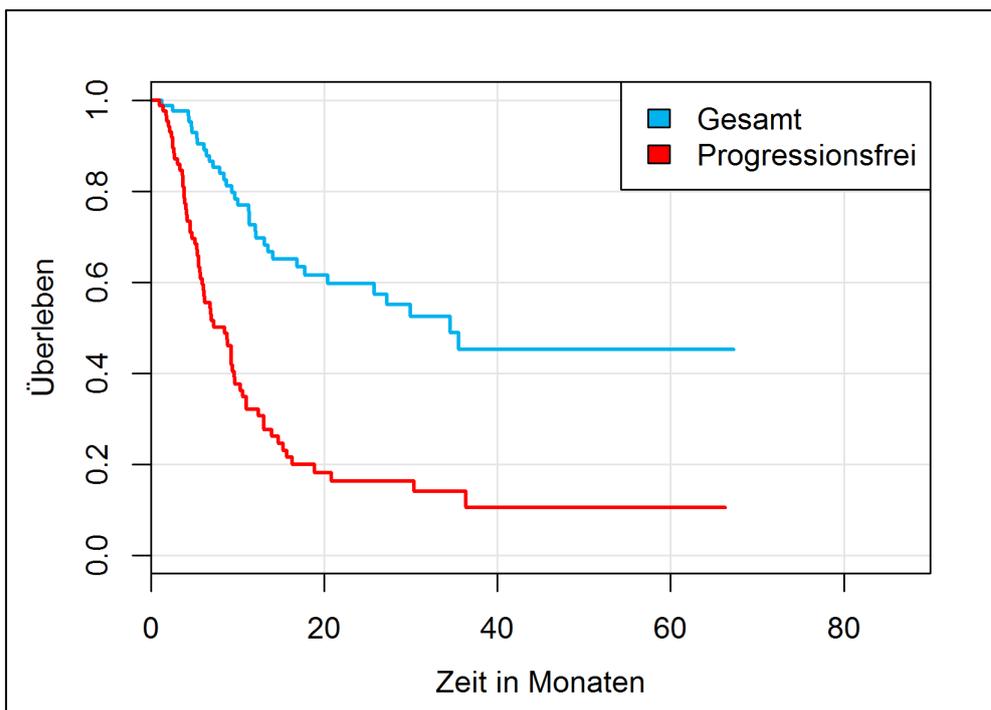


Abbildung 7: BRAFi und MEKi Kohorte: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben

### 3.1.3 Analyse des Einflusses klinischer Merkmale auf das Gesamtüberleben und das Progressionsfreie Überleben bei Patienten mit BRAFi- Mono- und BRAFi und MEKi-Kombinationstherapie

Zunächst wurde, wie im Methodik-Kapitel beschrieben, für jedes Merkmal ein Grenzwert ermittelt. Anhand dieser Grenze, die die klinischen Merkmale in „Niedrig“ und „Hoch“ einteilt, wurde es möglich den Einfluss der unterschiedlich ausgeprägten Merkmale auf das Therapieansprechen, gemessen an OS, PFS und dem besten objektiven Ansprechen, zu erfassen. Dadurch war für jeden metrischen Wert eine konkrete Aussage bezüglich der prognostischen Wertigkeit möglich. Die Einteilung der Merkmale anhand der ermittelten Grenzwerte ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Klinische Merkmale - Grenzwerte

<b>Faktor</b>	<b>Niedrig</b>	<b>Hoch</b>
Alter	≤ 47 Jahre	> 47 Jahre
LDH	≤ 250 U/l	> 250 U/l
S100B	≤ 0.10 ug/l	> 0.10 ug/l
Anzahl betroffener Regionen	≤ 2	> 2
Wachstumsrate	≤ 4.30 mm/Monat	> 4.30 mm/Monat
Verdoppelungszeit	≤ 218 Tage	> 218 Tage
Tumorgesamtmasse (RECIST TLs)	≤ 68.7 mm	> 68.7 mm
Durchmesser der größten Metastase	≤ 26.4 mm	> 26.4 mm
Neutrophile Granulozyten	≤ 8.34/ml	> 8.34/ml
Lymphozyten	≤ 2.34/ml	> 2.34/ml
Monozyten	≤ 0.98/ml	> 0.98/ml
Eosinophile Granulozyten	≤ 0.03/ml	> 0.03/ml
Basophile Granulozyten	≤ 0.08/ml	> 0.08/ml

Die Untersuchung der ausgewählten metrischen Merkmale anhand der Grenzwerte wurde getrennt in den BRAFi und BRAFi und MEKi Kohorten durchgeführt. Die medianen Überlebenszeiten sowie die p-Werte des Log-Rank-Tests werden in der nachstehenden Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 2: Univariate Analyse der Auswirkung metrischer klinischer Merkmale auf OS und PFS

<b>Klinische Merkmale</b>	<b>BRAFi</b>			<b>BRAFi u. MEKi</b>		
	<b>Niedrig</b>	<b>Hoch</b>	<b>p</b>	<b>Niedrig</b>	<b>Hoch</b>	<b>p</b>
<b>Alter</b>						
Gesamtüberleben	14.0	26.7	0.23	34.6	35.5	0.57
Progressionsfreies Überleben	5.7	5.3	0.63	5.4	8.9	0.41
<b>Anzahl betroffener Regionen</b>						
Gesamtüberleben	38.7	16.8	0.0182	-	14.1	0.0009
Progressionsfreies Überleben	6.2	4.9	0.17	15.24	5.7	<0.0001
<b>LDH</b>						
Gesamtüberleben	28.6	16.3	0.14	-	13.6	0.0004
Progressionsfreies Überleben	5.7	5.2	0.0775	15.2	5.5	<0.0001
<b>S100B</b>						
Gesamtüberleben	28.6	23.5	0.53	-	27.2	0.0899
Progressionsfreies Überleben	5.4	5.3	0.43	20.83	6.1	0.0066

Klinische Merkmale	BRAFi			BRAFi u. MEKi		
	Niedrig	Hoch	p	Niedrig	Hoch	p
<b>Wachstumsrate</b>						
Gesamtüberleben	49.1	15.2	0.0331	-	16.9	0.0391
Progressionsfreies Überleben	7.9	5.3	0.0354	13.9	5.4	0.0012
<b>Tumor-Verdoppelungszeit</b>						
Gesamtüberleben	18.9	-	0.0263	30.0	-	0.19
Progressionsfreies Überleben	5.3	18.0	0.0079	8.5	13.0	0.19
<b>Tumorgesamtmasse</b>						
Gesamtüberleben	49.1	14.1	0.0032	-	27.2	0.0429
Progressionsfreies Überleben	6.2	4.6	0.0112	12.4	5.5	0.0058
<b>Durchmesser</b>						
Gesamtüberleben	50.8	15.2	0.0115	-	27.2	0.0815
Progressionsfreies Überleben	6.2	4.7	0.10	12.42	6.1	0.0139
<b>Neutrophile Granulozyten</b>						
Gesamtüberleben	25.0	12.2	0.12	-	9.7	0.0379
Progressionsfreies Überleben	5.4	4.9	0.36	7.3	5.7	0.29
<b>Lymphozyten</b>						
Gesamtüberleben	23.5	5.7	0.045	35.5	15.2	0.56
Progressionsfreies Überleben	5.7	3.7	0.0508	7.3	6.9	0.70
<b>Monozyten</b>						
Gesamtüberleben	25.0	12.2	0.0065	-	12.1	0.0165
Progressionsfreies Überleben	5.7	4.9	0.16	9.3	5.0	0.0154
<b>Eosinophile Granulozyten</b>						
Gesamtüberleben	25.0	18.9	0.52	9.7	35.5	0.0686
Progressionsfreies Überleben	6.6	5.3	0.99	4.7	8.5	0.40
<b>Basophile Granulozyten</b>						
Gesamtüberleben	20.1	11.0	0.38	35.5	11.4	0.0286
Progressionsfreies Überleben	5.7	3.5	0.0597	8.5	5.4	0.32

Legende: mediane Überlebenszeitangaben in Monaten; p- p-Wert; " - " Nichterreichen des medianen Überlebens

In Tabelle 2 wird gezeigt, dass das Alter keinen signifikanten Einfluss auf das PFS und das OS, weder in der BRAFi, noch in der MEKi Kohorte, hatte.

Bei Betrachtung der Zellreihen des Differentialblutbildes wird deutlich, dass die eosinophilen Granulozyten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das PFS und das OS hatten. Dies gilt für die BRAFi als auch für die BRAFi und MEKi Kohorte.

Für einzelne klinische Merkmale konnten gleichermaßen in der BRAFi als auch in der BRAFi und MEKi Kohorte signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Das Vorhandensein von mehr als zwei von Metastasen betroffenen Regionen führte zu einer signifikanten Verkürzung des Gesamtüberleben (OS) (BRAFi,  $p=0.0182$ ; BRAFi u. MEKi,  $p=0.0009$ ).

Ein weiteres Merkmal, für das in beiden Kohorten sowohl signifikante Einschränkungen für das OS als auch für das PFS festgestellt werden können, ist die Metastasenwachstumsrate. Patienten der BRAFi Monotherapie Kohorte mit einer Metastasenwachstumsrate von mehr als 4.3 mm/Monat wiesen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben auf (OS, 15.2 vs. 49.1 Monate,  $p=0.0331$ ; PFS, 5.3 v.s. 7.9 Monate,  $p=0.0354$ ). Für die BRAFi u. MEKi Kohorte wurde ein signifikanter Unterschied von  $p=0.0391$  für das OS errechnet, ebenso für das PFS,  $p=0.0012$ .

Des Weiteren hatte die Tumorgesamtmasse einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben und das Progressionsfreie Überleben in beiden Kohorten. Betrug der Durchmesser der Tumorgesamtmasse mehr als 68.7mm, wurde das OS und das PFS signifikant verkürzt (BRAFi, OS  $p=0.0032$ , PFS  $p=0.0112$ ; BRAFi u. MEKi, OS  $p=0.0429$ , PFS  $p=0.0058$ ).

Für das Merkmal Durchmesser der größten Metastase (Zielläsion  $>26.4\text{mm}$ ) wurde in der BRAFi u. MEKi Kohorte eine signifikante Abnahme des PFS auf circa die Hälfte von 12.42 auf 6.11 Monate nachgewiesen ( $p=0.0139$ ).

Schließlich konnte für die Monozyten im Differentialblutbild ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben in der BRAFi aber auch in der BRAFi u. MEKi Kohorte gezeigt werden. Waren die Monozyten über 0.98/ml, verringerte sich das OS von 25.0 auf 12.2 Monate in der BRAFi Kohorte ( $p=0.0065$ ). In der BRAFi u. MEKi Kohorte wurde das Gesamtüberleben auf 12.1 Monate verkürzt ( $p=0.0165$ ).

Für die folgenden Merkmale wurde in der Auswirkung auf OS und PFS entweder nur in der BRAFi Kohorte oder nur in der BRAFi u. MEKi Kohorte ein signifikanter Einfluss festgestellt. In der BRAFi Kohorte konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem größten Durchmesser der größten Metastase und dem Gesamtüberleben festgestellt werden. War der Durchmesser größer als 26.4mm, wurde das mediane Gesamtüberleben der BRAF Kohorte von 50.8 auf 15.2 Monate verkürzt ( $p=0.0115$ ).

Das mediane Gesamtüberleben der BRAFi Kohorte wurde außerdem durch die Anzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild signifikant beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass das OS bei einer Lymphozytenzahl größer als 2.34/ml von 23.5 auf 5.7 Monate vermindert wurde ( $p=0.045$ ).

Die etablierten Parameter LDH und S100B zeigten in der BRAFi u. MEKi Kohorte einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben und das Progressionsfreie Überleben. LDH Werte größer als 250 U/l, waren assoziiert mit einem verkürzten PFS von 15.2 auf 5.5 Monate ( $p<0.0001$ ) und einem signifikant verkürzten OS ( $p=0.0004$ ). Der Tumormarker S100B größer als 0.10 $\mu$ g/l korrelierte mit einer Reduktion des PFS von 20.8 auf 6.1 Monate in der BRAFi u. MEKi Kohorte ( $p=0.0066$ ).

Für einzelne Werte des Differentialblutbildes konnte ein Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden. In der BRAFi u. MEKi Kohorte wurde gezeigt, dass bei einer Erhöhung der Basophilen Granulozyten  $>0.08$ /ml das OS von 35.5 auf 11.4 Monate reduziert wurde ( $p=0.0286$ ). Ein Anstieg der Monozyten über 0.98/ml ging nicht nur, wie oben beschrieben, in beiden Kohorten mit einem verminderten OS, sondern in der BRAFi u. MEKi Kohorte auch mit einem verkürzten PFS einher. Es wurde eine Reduktion von 9.30 auf 4.99 Monaten bestimmt ( $p=0.0154$ ). Weiterhin wurde deutlich, dass einem erhöhten Wert der Neutrophilen Granulozyten bei Therapiebeginn über 8.34/ml das OS signifikant verkürzt war (BRAFi u. MEKi,  $p=0.0379$ ).

Die folgenden Graphiken in Abbildung 8 zeigen die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für Gesamt- und progressionsfreies Überleben. Es werden die Merkmale dargestellt, die im Verlauf auch in der multivariaten Analyse signi-

fikante Einflüsse aufwiesen. Die Merkmale, die in der multivariaten Analyse nicht signifikant waren, werden in Anhang 2 und 3 als Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt.

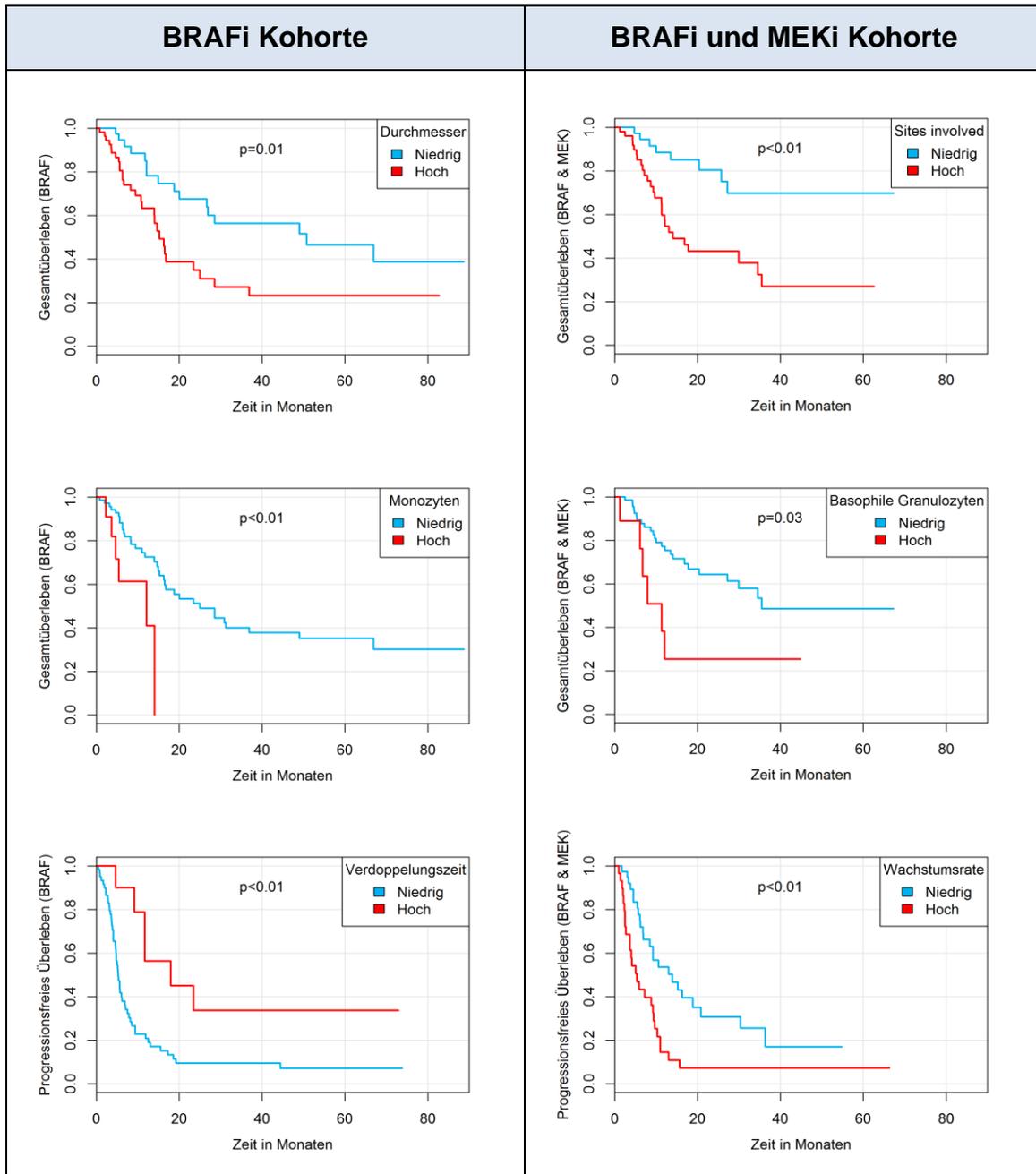


Abbildung 8: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben beider Kohorten in Abhängigkeit klinischer Merkmale

Im Weiteren wurden die nicht numerischen Merkmale Geschlecht, Lebermetastasen, Knochenmetastasen und Gehirnetastasen und deren Auswirkung auf PFS und OS in beiden Kohorten univariat untersucht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Univariate Analyse der Auswirkung nicht metrischer klinischer Merkmale auf OS und PFS

	BRAFi			BRAFi u. MEKi		
<b>Gesamtüberleben</b>	<b>Nein</b>	<b>Ja</b>	<b>P</b>	<b>Nein</b>	<b>Ja</b>	<b>p</b>
Geschlecht Männlich	15.4	27.0	0.76	-	34.6	0.56
Lebermetastasen	25.0	16.6	0.25	-	16.9	0.0115
Knochenmetastasen	28.6	14.1	0.0424	-	11.4	0.0064
Hirnetastasen	36.9	12.2	0.0011	34.6	14.1	0.0032
<b>Progressionsfreies Überleben</b>	<b>Nein</b>	<b>Ja</b>	<b>P</b>	<b>Nein</b>	<b>Ja</b>	<b>p</b>
Geschlecht Männlich	5.7	5.3	0.87	9.3	7.0	0.63
Lebermetastasen	5.8	4.9	0.27	9.7	6.1	0.0200
Knochenmetastasen	5.3	5.9	0.34	9.3	6.2	0.24
Hirnetastasen	5.7	5.3	0.48	9.3	5.1	0.0115

Legende: mediane Überlebenszeitangaben in Monaten; p- p-Wert

Die Analyse des Geschlechts ergab in beiden Kohorten keinen signifikanten Einfluss, weder auf das Gesamtüberleben noch auf das progressionsfreie Überleben. Für den Einfluss der Knochenmetastasen konnte eine signifikante Verkürzung des medianen Gesamtüberlebens sowohl in der BRAFi als auch in der BRAFi u. MEKi Kohorte gezeigt werden ( $p=0.0424$ ;  $p=0.0064$ ). In der BRAFi Kohorte konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben (OS) von 36.9 auf 12.2 Monate um zwei Drittel verkürzt war, wenn Hirnetastasen vorhanden waren ( $p=0.0011$ ), ebenso in der BRAFi u. MEKi Kohorte (34.6 auf 14.1 Monate,  $p=0.0032$ ). In der BRAFi u. MEKi Kohorte hatten Hirnetastasen auch einen signifikant reduzierenden Einfluss auf das Progressionsfreie Überleben. Es wurde von 9.3 auf 5.1 Monate vermindert ( $p=0.0115$ ). Abschließend konnte bei Vorhandensein von Lebermetastasen in der BRAFi u. MEKi Kohorte eine signifikante Reduktion des Gesamtüberlebens und des Progressionsfreien Überlebens nachgewiesen werden ( $p=0.0115$ ;  $p=0.0200$ ).

### 3.1.4 Multivariate Analyse

#### 3.1.4.1 Multivariate Analyse Gesamtüberleben

Die univariat untersuchten Parameter wurden im nächsten Schritt auf ihre Unabhängigkeit in Bezug auf den risikoerhöhenden Effekt multivariat untersucht. Die Ergebnisse für das Gesamtüberleben sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt.

In der BRAFi Kohorte konnte gezeigt werden, dass zwei Merkmale einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten. War der Durchmesser der größten Metastase größer als 26.4mm, war das Gesamtüberleben beeinträchtigt ( $p=0.0135$ ; HR 6.5, CI 1.5-28.6). Als zweites Merkmal wurde für die Monozytenzahl gezeigt, dass das Gesamtüberleben, bei einem Ausgangswert vor Therapiebeginn von größer als 0.98/ml, vermindert war ( $p=0.0080$ ; HR 6.3; CI 1.6-24.3).

In der BRAFi u. MEKi Kohorte zeigten ebenfalls zwei Merkmale einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Das Vorhandensein von mehr als zwei durch Metastasen betroffene Regionen, führte zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtüberlebens ( $p=0.0018$ ); HR 8.8, CI 2.2-34.6). Bei Erhöhung der basophilen Granulozyten ( $>0.08$ /ml) konnte ebenfalls ein signifikanter Rückgang des Gesamtüberlebens in der BRAFi u. MEKi Kohorte gezeigt werden ( $p=0.0349$ ; HR 4.4, CI 1.1-17.5)

Tabelle 4: Multivariate Cox-Regression: Gesamtüberleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale

Klinische Merkmale	Ausprägung	BRAFi-Inhibitor (n = 86)	
		HR (95% CI)	p
Knochenmetastasen	Nein	1	0.79
	Ja	1.1 (0.4-3.1)	
Hirnmetastasen	Nein	1	0.0593
	Ja	2.6 (1.0-6.8)	
Anzahl betroffener Regionen	≤ 2	1	0.16
	> 2	0.5 (0.2-1.3)	
Wachstumsrate	≤ 4.30 mm/Monat	1	0.51
	> 4.30 mm/Monat	0.7 (0.2-2.2)	
Verdoppelungszeit	≤ 217.99 Tage	1	0.0765
	> 217.99 Tage	0.1 (0.0-1.2)	
Tumorgesamtmasse	≤ 68.7 mm	1	0.65
	> 68.7 mm	0.8 (0.2-2.7)	
Durchmesser	≤ 26.4 mm	1	0.0135
	> 26.4 mm	6.5 (1.5-28.6)	
Lymphozyten	≤ 2.34/ml	1	0.10
	> 2.34/ml	3.4 (0.8-14.3)	
Monozyten	≤ 0.98/ml	1	0.0080
	> 0.98/ml	6.3 (1.6-24.3)	

Legende: CI- Konfidenzintervall; HR- Hazard Ratio; p- p-Wert; LDH- Laktatdehydrogenase

Tabelle 5: Multivariate Cox-Regression: Gesamtüberleben der BRAFi u. MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale

Klinische Merkmale	Ausprägung	BRAFi- u. MEKi- Inhibitor (n = 105)	
		HR (95% CI)	p
Lebermetastasen	Nein	1	0.24
	Ja	0.5 (0.1-1.7)	
Knochenmetastasen	Nein	1	0.52
	Ja	1.4 (0.5-3.7)	
Anzahl betroffener Regionen	≤ 2	1	0.0018
	> 2	8.8 (2.2-34.6)	
LDH	≤ 250 U/l	1	0.0541
	> 250 U/l	4.2 (1.0-18.3)	
Wachstumsrate	≤4.30mm/Monat	1	0.0686
	>4.30mm/Monat	2.75 (0.9-8.2)	
Tumorgesamtmasse	≤ 68.7 mm	1	0.71
	> 68.7 mm	0.8 (0.3-2.2)	
Neutrophile Granulozyten	≤ 8.34/ml	1	0.11
	> 8.34/ml	3.4 (0.8-15.4)	
Monozyten	≤ 0.98/ml	1	0.60
	> 0.98/ml	0.7 (0.1-3.0)	
Basophile Granulozyten	≤ 0.08/ml	1	0.0349
	> 0.08/ml	4.4 (1.1-17.5)	

Legende: CI- Konfidenzintervall; HR- Hazard Ratio; p- p-Wert; LDH- Laktatdehydrogenase

### 3.1.4.2 Multivariate Analyse Progressionsfreies Überleben

Die univariat untersuchten Parameter wurden neben dem Einfluss auf das Gesamtüberleben auch auf das Progressionsfreie Überleben hinsichtlich ihrer Unabhängigkeit in Bezug auf den risikoerhöhenden Effekt multivariat untersucht. Die Ergebnisse des Progressionsfreien Überlebens sind in Tabelle 6 und 7 dargestellt.

In der BRAFi Kohorte zeigte sich eine negative Assoziation zwischen der Tumorverdoppelungszeit und dem Risiko einer Progression. Eine Verdoppelungs-

zeit größer als 217.99 Tage korrelierte mit einem verminderten Progressionsrisiko ( $p=0.0372$ ; HR 0.4, CI 0.2-0.9). In der BRAFi u. MEKi Kohorte konnte für das Merkmal Anzahl der betroffenen Regionen und die Wachstumsrate ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Waren mehr als zwei Regionen durch Metastasen betroffen, zeigte sich das Risiko der Progression signifikant erhöht ( $p=0.0019$ ; HR 4.4, CI 1.7-14.4). Die Wachstumsrate  $>4.3\text{mm/Monat}$  korrelierte ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko für einen Krankheitsprogress ( $p=0.0111$ ; HR 3.3, CI 1.3-8.5).

Tabelle 6: Multivariate Cox-Regression: Progressionsfreies Überleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale

Klinische Merkmale	Ausprägung	BRAFi-Inhibitor (n = 86)	
		HR (95% CI)	p
Wachstumsrate	$\leq 4.30\text{ mm/Monat}$	1	
	$> 4.30\text{ mm/Monat}$	1.1 (0.6-2.0)	0.87
Verdoppelungszeit	$\leq 217.99\text{ Tage}$	1	
	$> 217.99\text{ Tage}$	0.4 (0.2-0.9)	0.0372
Tumorgesamtmasse	$\leq 68.7\text{ mm}$	1	
	$> 68.7\text{ mm}$	1.7 (0.9-3.2)	0.0864

Legende: CI- Konfidenzintervall; HR- Hazard Ratio; p- p-Wert; LDH- Laktatdehydrogenase

Tabelle 7: Multivariate Cox-Regression: Progressionsfreies Überleben der BRAFi u. MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale

Klinische Merkmale	Ausprägung	BRAF & MEK Inhibitor (n = 105)	
		HR (95% CI)	p
Lebermetastasen	Nein	1	0.22
	Ja	0.6 (0.2-1.4)	
Hirnmetastasen	Nein	1	0.83
	Ja	1.12 (0.4-3.0)	
Anzahl betroffener Regionen	≤ 2	1	0.0019
	> 2	4.4 (1.7-11.4)	
LDH	≤ 250 U/l	1	0.27
	> 250 U/l	1.7 (0.6-4.6)	
S100B	≤ 0.1 µg/l	1	0.25
	> 0.1 µg/l	1.8 (0.7-4.6)	
Wachstumsrate	≤ 4.30 mm/Monat	1	0.0111
	> 4.30 mm/Monat	3.3 (1.3-8.5)	
Tumorgesamtmasse	≤ 68.7 mm	1	0.12
	> 68.7 mm	0.5 (0.2-1.2)	
Durchmesser	≤ 26.4 mm	1	0.93
	> 26.4 mm	1.0 (0.3-2.7)	
Monozyten	≤ 0.98/ml	1	0.11
	> 0.98/ml	2.2 (0.8-5.9)	

Legende: CI- Konfidenzintervall; HR- Hazard Ratio; p- p-Wert; LDH- Laktatdehydrogenase

### 3.1.5 Analyse Bestes Objektives Ansprechen

In der Gesamtstichprobe zeigten 121 von 193 (70,8%) Patienten ein partielles oder komplettes Ansprechen, 21 von 193 (12,3%) Patienten einen Progress und 29 von 193 (17,0%) eine stabile Erkrankung. Für keines der untersuchten Merkmale konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem besten objektiven Ansprechen nach RECIST gezeigt werden, wie die Tabelle in Anhang 4 zeigt. Das Therapieansprechen in Patienten, behandelt mit BRAFi u. MEKi, war, gemessen am besten objektiven Ansprechen, unabhängig von der Ausprägung der Merkmale, annähernd gleich gut.

## **3.2 Ergebnisse Nivolumab und Pembrolizumab**

### **3.2.1 Stichprobenbeschreibung**

Die Analyse wurde anhand eines Datensatzes von N=179 Patienten vorgenommen. Die Kohorte wurde in zwei Gruppen aufgeteilt. Hiervon wurden 53 Patienten mit Nivolumab und 126 mit Pembrolizumab behandelt.

#### **3.2.1.1 Geschlechterverteilung**

In der Nivolumab Kohorte waren 21 Patienten (39.6 %) weiblich und 32 Patienten (60,4%) männlich. Die Pembrolizumab Kohorte bestand aus 49 weiblichen (38,9%) und 77 männlichen (61,1%) Patienten. Hierbei wurde beobachtet, dass in beiden Gruppen ein ähnliches Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten bestand, jedoch die männlichen Patienten in beiden Gruppen überwogen.

#### **3.2.1.2 Altersverteilung**

Um die Altersverteilung zu beschreiben wurde eine Einteilung  $\leq 60$  Jahre und  $> 60$  Jahre vorgenommen. In der Nivolumab Kohorte waren 31 Patienten (58,5 %),  $\leq 60$  Jahre alt und 22 Patienten (41.5 %), die  $> 60$  Jahre alt waren. Der größere Anteil der Patienten war daher  $\leq 60$  Jahre alt. In der Pembrolizumab Kohorte waren 45 Patienten (35,7 %),  $\leq 60$  Jahre alt und 81 Patienten (64,3 %), die  $> 60$  Jahre alt. Der größere Anteil der Patienten war  $>$  als 60 Jahre alt. Die Zahlen sind Tabelle 8 zu entnehmen.

#### **3.2.1.3 Hirn- und Lebermetastasen**

Wie in Tabelle 8 zu sehen, wiesen in der Nivolumab Kohorte 15 Patienten (28,3 %) Hirnmetastasen auf. In der Pembrolizumab Gruppe konnte hingegen bei 45 Patienten (35,7%) eine Metastasierung in das Gehirn festgestellt werden. Hinsichtlich der Lebermetastasen ergab sich folgende Verteilung. In der Nivolumab Kohorte hatten 17 Patienten (32,1 %) Lebermetastasen. In der Pembrolizumab Kohorte waren 35 Patienten (27,8 %) mit Lebermetastasen vor Therapiebeginn eingeschlossen.

Tabelle 8: Stichprobenübersicht – Immuncheckpoint Blockade

Merkmal	Ausprägung	Nivolumab Kohorte (n = 53) No. (%)	Pembrolizumab Kohorte (n = 126) No. (%)
Alter (Jahre)	≤ 60	31 (58.5)	45 (35.7)
	> 60	22 (41.5)	81 (64.3)
Geschlecht	Weiblich	21 (39.6)	49 (38.9)
	Männlich	32 (60.4)	77 (61.1)
Hirnmetastasen	Nein	38 (71.7)	81 (64.3)
	Ja	15 (28.3)	45 (35.7)
Lebermetastasen	Nein	36 (67.9)	91 (72.2)
	Ja	17 (32.1)	35 (27.8)
Anzahl der Vortherapien	Erstlinie	12 (22.6)	48 (38.1)
	Zweitlinie	24 (45.3)	40 (31.7)
	≥ Drittlinie	17 (32.1)	38 (30.2)

### 3.2.2 Multivariate Analyse Gesamtüberleben

In der multivariaten Analyse der Nivolumab und der Pembrolizumab Kohorte konnte für beide Kohorten jeweils eine deutliche Signifikanz hinsichtlich der Wachstumsrate der Zielläsion vor Therapiebeginn, gemessen am Gesamtüberleben, gezeigt werden. Es wurde deutlich, dass bei einer Wachstumsrate von mehr als 3,9 mm pro Monat, das Gesamtüberleben unter Immuncheckpoint-Blockade signifikant herabgesetzt war (Nivolumab  $p=0.00037$ ; Pembrolizumab  $p=0.000011$ ).

Des Weiteren ergab die Untersuchung der Nivolumab Kohorte eine signifikante Reduktion des Gesamtüberlebens bei einer Gesamttumormasse, angegeben als Gesamtdurchmesser nach RECIST, von mehr als 100,8 mm ( $p=0.0074$ ). In der Pembrolizumab Kohorte konnte diese Signifikanz in der multivariaten Cox Regression nicht gezeigt werden.

Neben den metrischen Merkmalen Wachstumsrate und Tumorgesamtmasse konnte für das prätherapeutische Vorhandensein von Hirnmetastasen eine signifikante Abnahme des Gesamtüberlebens in der Pembrolizumab Kohorte gezeigt werden ( $p=0.0021$ ).

Die Merkmale, LDH, Durchmesser der Zielläsion und Lebermetastasen, wiesen in keiner Kohorte einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben auf. Die beschriebenen Zusammenhänge sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Multivariate Analyse: Einfluss klinischer Merkmale auf das Gesamtüberleben in den Immuntherapie Kohorten

Merkmal	Ausprägung	Nivolumab (n = 53)		Pembrolizumab (n = 126)	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Wachstumsrate	≤ 3.9 mm/Monat	1		1	
	> 3.9 mm/Monat	6.2 (2.3-17.0)	.00037	3.4 (2.0-6.0)	.000011
Durchmesser	≤ 23.5 mm	1		1	
	> 23.5 mm	0.8 (0.3-2.3)	.64	1.0 (0.5-2.0)	.92
Gesamt-tumormasse	≤ 100.8 mm	1		1	
	> 100.8 mm	3.8 (1.4-10.2)	.0074	1.2 (0.6-2.3)	.64
Lebermetastasen	Nein	1		1	
	Ja	2.0 (0.8-5.5)	.15	1.7 (1.0-3.0)	.057
Hirnmetastasen	Nein	1		1	
	Ja	1.9 (0.8-4.3)	.12	2.3 (1.4-4.0)	.0021
LDH	≤ ULN	1		1	
	> ULN	1.6 (0.7-3.5)	.22	1.4 (0.8-2.5)	.26

Legende: CI- Konfidenzintervall; HR- Hazard Ratio; LDH- Laktatdehydrogenase; n- Anzahl der Patienten; p- p-Wert; ULN- Upper Limit of Normal; RECIST- Response Evaluation Criteria in solid Tumors Version 1.1.

### 3.2.3 Analyse Bestes Objektives Ansprechen

Die Untersuchung des besten objektiven Ansprechens in Abhängigkeit von der Wachstumsrate ergab, wie in Tabelle 10 gezeigt, sowohl für die Nivolumab als auch für die Pembrolizumab Kohorte ein signifikantes Ergebnis. Patienten, die prätherapeutisch eine Wachstumsrate der Zielläsion von mehr als 3,9 mm pro Monat aufweisen, erreichten keine Krankheitskontrolle (CR/PR/SD) im Vergleich zu den Patienten, deren Zielläsionen prätherapeutisch eine Wachstumsrate von 3,9 mm pro Monat oder weniger aufwiesen (Nivolumab p=0.00000033; Pembrolizumab p=0.000035).

Tabelle 10: Bestes Objektives Ansprechen in Abhängigkeit von der Wachstumsrate

Merkmal	Nivolumab Gruppe Anzahl (%)			Pembrolizumab Gruppe Anzahl (%)		
	PD	SD	PR/CR	PD	SD	PR/CR
<b>Wachstumsrate ≤ 3.9 mm/Monat</b>	4 (14)	9 (32)	15 (54)	23 (31)	13 (17)	39 (52)
<b>Wachstumsrate &gt; 3.9 mm/Monat</b>	21 (84)	1 (4)	3 (12)	32 (70)	3 (7)	11 (24)
	OR 28.4 (5.9-187.5) p = .00000033			OR 5.1 (2.2-12.5) p = .000035		
Legende: OR- Odds Ratio; p- p-Wert; CR- Complete Response; PD- Progressive Disease; PR- Partial Response; SD- Stable Disease						

### 3.3 Vergleich: Ergebnisse Zielgerichtete Therapie und Immuncheckpoint Blockade

Die untersuchten Kohorten der unterschiedlichen Therapieregime (BRAFi Monotherapie, BRAFi u. MEKi Kombinationstherapie, Immuncheckpoint-Inhibitor) schlossen ähnlich viele Patienten ein. Es erhielten 193 Patienten BRAFi u. MEKi und 179 Patienten eine Immuncheckpoint-Blockade mit Nivolumab oder Pembrolizumab. Auch die Altersverteilung innerhalb der Kohorten war ähnlich aufgebaut und daher vergleichbar. Das mediane Alter der Patienten in der BRAFi und BRAFi u. MEKi Kohorte war bei Therapiebeginn 56 Jahre. Die mit Nivolumab behandelten Patienten waren im Median 58 Jahre alt und die, die mit Pembrolizumab behandelt wurden, 67 Jahre. In allen untersuchten Kohorten gab es einen leichten Überschuss der erkrankten Männer im Vergleich zu den Frauen. Die Geschlechts- und Altersverhältnisse der Kohorten zeigten sich ausgeglichen.

Vergleichend wurde das Vorhandensein von Leber- oder Hirnmetastasen und dessen Auswirkung auf den Therapieerfolg gemessen am Gesamtüberleben untersucht. In der Nivolumab Kohorte konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Demgegenüber wurde in der Pembrolizumab Kohorte bei Vorliegen von Hirn- oder Lebermetastasen eine signifikante Verkürzung des Gesamtüberlebens festgestellt. In der BRAFi und BRAFi u. MEKi Kohorte war diesbezüglich keine Signifikanz nachweisbar.

Außerdem wurde der Einfluss der Metastasenkinetik auf das Überleben in den Kohorten untersucht. In der Nivolumab Kohorte zeigte die Gesamttumormasse einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Bei Überschreiten der Tumormasse über 100.8 mm, gemessen am Gesamtdurchmesser der fünf größten Metastasen, zeigte sich das OS signifikant vermindert. Diese Korrelation konnte im Rahmen der multivariaten Analyse in keiner anderen Kohorte signifikant festgestellt werden.

In der BRAFi Kohorte konnte das prätherapeutische Merkmal Durchmesser der größten Metastase (Zielläsion) ein signifikantes Ergebnis, bezogen auf das OS festgestellt werden, nicht jedoch in den Immuncheckpoint Kohorten. War der Durchmesser der größten Metastase größer als 26,4mm, zeigte sich die Gesamtüberlebenszeit signifikant verkürzt.

In den Immuncheckpoint- Inhibitor Kohorten konnte ein Einfluss der Wachstumsrate auf das Gesamtüberleben und auf das beste objektive Ansprechen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei einem Schwellenwert von 3,9 mm pro Monat. In den Kohorten der zielgerichteten Therapie war ein Grenzwert von 4,3 mm pro Monat bezogen auf das OS nur in der univariaten Analyse, nicht jedoch in der multivariaten Analyse, signifikant.

Anhand der Daten lässt sich ableiten, dass eine prätherapeutische Wachstumsrate von größer als 4.3 mm pro Monat eine signifikante Abnahme des Progressionsfreien Überlebens zur Folge hatte. Bezogen auf das beste objektive Ansprechen nach RECIST konnte in der BRAFi und BRAFi u. MEKi Kohorte weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wachstumsrate ermittelt werden.

Laborparameter wie LDH zeigten weder in der Immuncheckpoint Blockade Kohorte noch in der Zielgerichteten Therapie Kohorte einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben und waren daher prognostisch weniger wertig.

## 4 Diskussion

Die Prognose des metastasierten Melanoms war bis zur Entwicklung neuer Therapieregime, mit einem Gesamtüberleben von etwa 8 bis 9 Monaten, deutlich eingeschränkt (Weide et al., 2012), (Weide et al., 2013). Unter dem Einsatz der zielgerichteten Therapie und der Immuncheckpoint Blockade konnten erstmals dramatische Fortschritte erzielt werden (Luke et al., 2017), (Schadendorf et al., 2015), (Sloot et al., 2018). Deshalb ist es umso wichtiger, prognostisch relevante und möglicherweise auch prädiktive Marker zu identifizieren. Hierdurch könnte die wirksamste Therapie bestimmt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, klinische Parameter herauszuarbeiten, die rasch in den klinischen Alltag integriert werden können und die bei unterschiedlichen Therapieregimen prognostisch relevant sein könnten. Bei der Suche nach geeigneten Merkmalen wählten wir einerseits, die in der Melanomdiagnostik etablierten Serummarker LDH und S100B (Weide et al., 2012), (Balch et al., 2009), (Tarhini et al., 2009) und andererseits untersuchten wir weniger etablierte Merkmale, wie die Zellen des Differentialblutbildes.

In der Onkologie gibt es bewährte Laborparameter, die standardisiert bestimmt werden um eine Aussage über die Entwicklung der Tumormasse oder die Tumoraktivität treffen zu können (Weide et al., 2012). In der Dermatookologie, beziehungsweise der Melanomtherapie sind dies vor allem LDH (Manola et al., 2000), (Eton et al., 1998) und S100B (Henze et al., 1997). LDH ist ein ubiquitär in jeder Zelle vorkommendes Enzym, das bei vermehrtem Zellumsatz unspezifisch auch im Blut messbar ansteigt. Dieses ist bei großen Tumormassen sowie insbesondere bei hepatischen Metastasen der Fall (Finck et al., 1983). Der Tumormarker S100B ist ein kalziumbindendes Protein und wird vor allem von Melanomzellen, aber auch von Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (BÖNI et al., 1997). Daher eignet es sich als Maß für die Tumormasse und zur Verlaufskontrolle unter Therapie (Egberts et al., 2012), (Hauschild et al., 1999). In einer Arbeit von Weide und Kollegen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen S100B und LDH Erhöhung bei Therapiestart und reduziertem OS festgestellt (Weide et al., 2013).

Um zu untersuchen ob Veränderungen der LDH- und S100B- Spiegel im peripheren Blut, zusätzlich zu der allgemeinen Aussagekraft hinsichtlich des OS auch eine prognostische Relevanz unter verschiedenen Therapieregimen haben, untersuchten wir die prätherapeutisch erfassten LDH- und S100B- Werte. Wir konnten in einer früheren Arbeit zeigen, dass ein Anstieg des S100B um mehr als 145% innerhalb der ersten Therapiewochen mit PD-1- oder PD-1- und CTLA-4- Antikörpern, mit einer signifikanten Reduktion des 1-Jahres-Überleben assoziiert ist (Wagner et al., 2018). Unsere jetzige Arbeit konnte bei ausschließlicher Betrachtung der Ausgangswerte vor Therapiebeginn keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erhöhten LDH (>250 U/l) oder einem erhöhten S100 (>0.1µg/l) und einer Verkürzung des OS, in der BRAFi- und MEKi-Kohorte, nachweisen. Genauso wenig konnte in der Immuncheckpoint-Inhibitor Kohorte für ein erhöhtes prätherapeutisches LDH eine Signifikanz nachgewiesen werden. Die Bestimmung von S100B und LDH ist demnach eher geeignet für Verlaufskontrollen nach Therapieeinleitung bei Melanomatpatienten, insbesondere bei großen Tumormassen (Peric et al., 2011), (Hein et al., 2006), (Diem et al., 2015) und nicht als prädiktiver Ausgangswert für Therapieplanungen.

Die Zellen des Differentialblutbildes sind jederzeit und einfach bestimmbare Parameter und daher für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs geeignet. Eine Erhöhung der NLR (engl. „neutrophil-to-lymphocyte ratio“), die das prozentuale Verhältnis von neutrophilen Granulozyten zu Lymphozyten darstellt, hat beispielsweise einen negativen Einfluss auf das OS und das PFS, wie Ding und Kollegen 2018 in einer Metaanalyse, welche verschiedene Therapieformen einbezog (Ipilimumab, BRAFi, etc.), gezeigt haben (Ding et al., 2018). Weiterhin haben Gandini und Kollegen gezeigt, dass erhöhte Monozyten und ein erhöhtes Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten einen signifikant negativen Einfluss auf die Prognose haben (Gandini et al., 2016). Auch in unserer Arbeit konnte bei Patienten, die mittels zielgerichteter Therapie behandelt wurden, herausgearbeitet werden, dass die Anzahl der Monozyten vor Therapiebeginn ein prognostisch relevanter Parameter ist, um das Therapieansprechen einzuschätzen. Wir haben in unserer Analyse einen signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten der BRAFi- Kohorte feststellen können, die vor

Therapiebeginn eine Monozytenzahl von mehr als 0.98/ml aufwiesen ( $p=0.0080$ , HR 6.3, CI 1.6-24.3). Basophile Granulozyten, die eher mit Allergien in Zusammenhang gebracht werden (Siracusa et al., 2013), aber auch schon in Verbindung mit dem Ovarialkarzinom untersucht wurden (Williams et al., 2014), zeigten in unserer Studie ebenfalls eine signifikant negative Auswirkung auf das OS in der BRAFi- und MEKi- Kohorte ( $p=0.0349$ , HR 4.4, CI 1.1-17.5). Diese Daten stehen jedoch im Widerspruch zu einer Arbeit von Sektioglu und Kollegen, die kürzlich zeigen konnten, dass Basophile Granulozyten via CCL3- und CCL4-Produktion die Tumorabstoßung unterstützen (Sektioglu et al., 2017). Das würde bedeuten, dass die Erhöhung der basophilen Granulozyten im Blut einen protektiven Charakter hätte. Diese zunächst konträr erscheinenden Ergebnisse müssen keinen Widerspruch darstellen. Möglich wäre es, dass eine erhöhte Anzahl der Basophilen Granulozyten zunächst eine Art körpereigene Abwehr gegen das Tumorwachstum darstellt. Stark erhöhte Basophilen-Spiegel könnten ein indirekter Ausdruck einer großen Tumorlast sein, ohne jedoch einen ausreichenden Antitumor-Effekt auszuüben und wären damit ein negativ prädiktiver Parameter. Unsere Untersuchung des Differentialblutbildes gibt Hinweise, die prätherapeutisch genutzt werden können, das Therapieansprechen für verschiedene Therapien einzuschätzen. Im Rahmen der Therapieentscheidung, könnte es sinnvoll sein die Anzahl der basophilen Granulozyten zu bestimmen. Ob ein Grenzwert von 0.08/ml in der BRAFi- und MEKi- Kohorte allgemeine Gültigkeit besitzen kann muss mittels weiterer Untersuchungen ermittelt werden. Außerdem wäre es interessant den Verlauf der basophilen Granulozyten und der Monozyten unter dem Einfluss der zielgerichteten Therapie hinsichtlich des Therapieverlaufs zu untersuchen

Neben den gängigen Laborparametern gibt es andere, neue Ansätze, um das Therapieansprechen einzuschätzen, beziehungsweise den Therapieverlauf zu beobachten. Es kann mit Hilfe von RNA basierter Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) vor und während einer Immuntherapie bei Melanompatienten durchgeführt werden, um das Ansprechen auf die Therapie vorausszusagen und den Therapieverlauf zu monitorieren (Hong et al., 2018). Genauso wenig invasiv ist die Bestimmung

von zellfreier zirkulierender DNA (cfDNA) als Maß für die Tumorlast (Leonardi et al., 2018). Hohe cfDNA- Spiegel korrelieren demnach im Rahmen der BRAFi und MEKi Therapie mit einem verminderten Ansprechen (Gray et al., 2015), (Girotti et al., 2016). Neben den erwähnten Formen der Liquid Biopsy, die sehr teuer ist (Arneth, 2018), gibt es hinsichtlich des Ansprechens auf PD-1 Antikörper immunhistochemische Untersuchungen von Tumormaterial und Stroma, um die PD-L1 Expression zu überprüfen (Hong et al., 2018), (Wang et al., 2017), (Leonardi et al., 2018). Die Ergebnisse hierzu sind widersprüchlich (Robert et al., 2015), (Morrison et al., 2018). Außerdem ist das Verfahren durch die Probengewinnung deutlich invasiver und nur bei Vorhandensein einer operativ oder bioptisch zugänglichen Metastase möglich (Patel and Kurzrock, 2015). Im Vergleich zu unserem Ansatz sind die genannten Verfahren daher nur eingeschränkt in den Alltag translatierbar.

Neben den Parametern des Differentialblutbildes und den anderen zirkulierenden Biomarkern war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, den prognostischen Einfluss der Tumorkinetik zu untersuchen. Auch wenn bereits in den 1970er bis 1990er Jahren der Tumorkinetik Aufmerksamkeit gewidmet wurde (Joseph et al., 1971), (Ollila et al., 1998), handelt es sich bei der Erfassung der Metastasenkinetik um einen innovativen Ansatz. Die zuletzt von mehreren Arbeitsgruppen angewandte Methodik, alle RECIST Targetläsionen oder sogar alle messbaren Läsionen mit einem Durchmesser von mindestens einem Zentimeter zu bestimmen, um Tumorkinetik zu berechnen, steht im Gegensatz zu dem von uns gewählten neuen Ansatz (Hartung et al., 2017). Dieser erfasst die Kinetik anhand der größten Metastase, mittels Wachstumsrate, Tumor- Verdopplungszeit und Veränderung der Tumormasse unter Therapie nach den Response Evaluation Criteria In Solid Tumors 1.1 (RECIST) (Eisenhauer et al., 2009).

Aus klinischer Erfahrung wissen wir, dass es besonders schnell und langsam wachsende Metastasen gibt. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten von Metastasen kann auch bei Metastasen eines Patienten beobachtet werden, wie dies auch in Arbeiten von Gaudy-Marqueste und Kollegen 2014 und Hartung und Kollegen 2017 gezeigt wird (Gaudy-Marqueste et al., 2014), (Hartung et al., 2017). Hartung und Kollegen postulierten 2017, dass Tumoraggressivität und

Tumorkinetik miteinander korrelierten und daher die Erfassung der Kinetik prognostisch relevant sei (Hartung et al., 2017). Prätherapeutisch schnell wachsende Metastasen und Heterogenität bzgl. Wachstumsgeschwindigkeit aller Metastasen eines Patienten sprächen für ein vermindertes Ansprechen auf BRAF Inhibitoren initial und im Verlauf der Therapie für vermehrte Resistenzbildung (Hartung et al., 2017). Gaudy-Marqueste und Kollegen haben 2014 bereits zuvor den prädiktiven Mehrwert des Tumolvolumens (TMV) im Vergleich zu AJCC Stadium und LDH in einer kleinen Kohorte mit 126 Patienten, die vorwiegend Monochemotherapie erhielten, erarbeitet (Gaudy-Marqueste et al., 2014). Unsere Hypothese lautete, die Metastasenkinetik als prognostisch relevanten Parameter einsetzen zu können. Um den prädiktiven Einfluss der Metastasenkinetik auf die Therapieentscheidung weiter zu ergründen, haben wir verschiedene kinetische Indikatoren untersucht. Wir erfassten zunächst anhand der fünf größten Durchmesser die prätherapeutische Tumormasse nach RECIST, die allerdings kein direktes Maß für die Tumorkinetik darstellt, sondern als Momentaufnahme lediglich indirekte Hinweise liefert. Allerdings konnte in der multivariaten Analyse weder in der BRAFi Monotherapie noch in der BRAFi u. MEKi Kombinationstherapie-Kohorte eine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben oder das Progressionsfreie Überleben gezeigt werden. Unter Immuntherapie mit Nivolumab konnte jedoch eine signifikante Verminderung des OS bei einer Tumormasse nach RECIST von  $> 100.8$  mm ermittelt werden ( $p=0.007$ , HR 3.8, CI=1.4-10.2). In einer 2017 erschienenen Arbeit von Nishino und Kollegen konnte für Pembrolizumab gezeigt werden, dass das OS von der Entwicklung der Tumormasse nach Therapiestart abhängig sei (Nishino et al., 2017). Eine Veränderung der Tumormasse um weniger als 20 % ginge laut der Studie mit einem verlängertem OS einher (Nishino et al., 2017). Obwohl Nishino et al. 2017 die Tumormasse unter der Therapie und nicht wie wir die Baseline Tumormasse als Einflussgröße untersucht haben, unterstützt dies unsere Vermutung des Einflusses der Tumormasse bei Immuntherapie auf das Therapieansprechen. Auch eine Arbeit von Joseph und Kollegen aus dem Jahr 2018 zeigten, dass eine große Tumormasse (gemäß RECIST 1.1) bei Baseline mit geringeren Chancen eines Therapieansprechens und reduziertem OS assoziiert wa-

ren (Joseph et al., 2018). Da es hinsichtlich der Therapieplanung sinnvoller ist, bestimmten wir die Tumorlast vor Therapiebeginn. Für die zielgerichtete Therapie mit BRAFi u. MEKi konnten wir jedoch mittels Bestimmung der Tumormasse gegenüber den indirekten Parametern der Tumormasse, wie zum Beispiel LDH keine Überlegenheit zeigen. Anders bei in der Immuncheckpoint-Inhibitor Kohorte mit Nivolumab. Eine prätherapeutische Tumormasse, gemessen am Durchmesser, von  $>100.8\text{mm}$  reduziert das Gesamtüberleben signifikant ( $p=0.0074$ , HR 3.8, CI 1.4-10.2). Auch die Bestimmung des Durchmessers der größten Metastase stellt einen aussagekräftigen Parameter dar. Ist die größte Metastase größer als 26.4 mm im Durchmesser, kommt es zur signifikanten Reduktion des Gesamtüberleben unter BRAFi Monotherapie ( $p=0.0135$ , HR 6.5, CI 1.5-28.6). Die Idee der prognostischen Relevanz der prätherapeutischen Tumorlast wird hierdurch unterstützt.

Die Metastasenkinetik erfassten wir mit Hilfe der Tumor- Verdoppelungszeit und der Wachstumsrate von prätherapeutisch gemessenen Zielläsionen. Bereits in einer Studie von Tejera-Vaquerizo und Kollegen 2012, welche allerdings die Wachstumsrate des Primärtumors und nicht wie wir die Metastasenkinetik bestimmt haben, konnte die Bedeutung der Wachstumsrate des Primärtumors in Zusammenhang mit der Zeit bis zur Entstehung von Metastasen, hervorgehoben werden (Tejera-Vaquerizo et al., 2012). Das unterstreicht, wie von uns ebenfalls vermutet, die Bedeutung der Wachstumsrate als Maß für die Aggressivität des Tumors, einerseits die Aggressivität des Primärtumors, die auch durch die Mitoserate sowie den Proliferationsmarker Ki-67 charakterisiert wird (Thompson et al., 2011), (Balch et al., 2009), (Henrique et al., 2000), andererseits wie in unsere Studie untersucht, die Aggressivität der Metastasen. Unter der Prämisse, dass ein aggressives Wachstumsverhalten der Metastasen für das Therapieansprechen von Bedeutung ist haben wir die Tumor- Verdoppelungszeit untersucht. Hier zeigen wir in unserer Arbeit einen signifikanten Zusammenhang mit dem PFS bei BRAFi Therapie. Eine prätherapeutisch berechnete Verdoppelungszeit unter 217.99 Tagen führte zur Verminderung des PFS ( $p=0.03724$ , HR 0.4, CI 0.2-0.9). Anders als die Bestimmung der Mitoserate, die für die Klassifikation von Melanomen von Bedeutung ist, aber nicht gut reprodu-

zierbar zu sein scheint (Garbe et al., 2016), ist die Bestimmung der Tumor-Verdoppelungszeit anhand von vorhandener Bildgebung einfach und reproduzierbar durchzuführen.

In der BRAFi und MEKi Kohorte sowie in der Immuncheckpoint- Inhibitor Kohorte ist die prätherapeutische Bestimmung der Metastasenwachstumsrate in unserer Arbeit von Bedeutung. Bei einer Wachstumsrate von  $> 4.3$  mm/ Monat haben wir unter BRAFi und MEKi Therapie eine signifikante Verminderung des PFS festgestellt ( $p=0.0111$ , HR 3.3, CI 1.3-8.5). Besonders aussagekräftig war die Auswirkung der prätherapeutischen Wachstumsrate auf das Gesamtüberleben bei Immuncheckpoint- Inhibitoren. Sowohl unter Pembrolizumab ( $p=0.000011$ , HR 3.9, CI 2.0-6.0) als auch unter Nivolumab ( $p=0.00037$ , HR 6.2, CI 2.3-17.0) konnten wir eine signifikante Einschränkung des OS bei einer Wachstumsrate über 3.9 mm/ Monat feststellen. Bei den Grenzwerten handelte es sich um experimentelle Marker, die noch nicht etabliert waren und statistisch berechnet wurden. Daher ergaben sich in den Immuntherapie und BRAFi und MEKi Kohorten unterschiedliche Grenzwerte. Weiterhin korreliert die prätherapeutische Wachstumsrate in der Kohorte der mit Anti PD-1 Antikörpern behandelten Patienten ebenfalls eindrücklich mit dem besten objektiven Ansprechen nach RECIST. Ab einer Wachstumsrate  $> 3.9$  mm/Monat kommt es signifikant häufiger zu einem Tumorprogress nach RECIST (PD) (Pembrolizumab:  $p=0.000035$ , OR 5.1, CI 2.2-12.5; Nivolumab:  $p=0,00000032$ , OR 28.4, CI 5.9-187.5). Für die mittels zielgerichteter Therapie behandelten Patienten konnte bei der Analyse der Metastasenwachstumsrate kein signifikanter Unterschied des besten objektiven Therapieansprechens nach RECIST festgestellt werden. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Wirksamkeit der kombinierten Therapie mit BRAFi- und MEKi- Inhibitoren initial relativ unabhängig von der Wachstumsrate sowie der Tumormasse, mit 68% Therapieansprechen, hoch ist (Larkin et al., 2014). Auch die Vemurafenib Monotherapie zeigt initial ein Therapieansprechen von 50-80% (Garbe and Eigentler, 2018). Dagegen wird, wie unsere Studie zeigt, die Wirksamkeit der Immuncheckpoint- Inhibitoren stärker von hohen Wachstumsraten beeinflusst. Das könnte bedeuten, dass es sinnvoll wäre bei schnell wachsenden Metastasen mit großer Tumormasse eine zielge-

richtete Therapie einzuleiten, um in kurzer Zeit die Tumormasse zu reduzieren und hierdurch eine Symptomkontrolle zu erzielen (Leonardi et al., 2018). Dieses Vorgehen sehen wir durch unsere klinischen Erfahrungen bestätigt. Problematisch ist allerdings die Resistenzentwicklung, die bei BRAF und MEK Inhibitoren nach anfänglichem Ansprechen die Therapie limitiert und teilweise dazu führt, dass der Tumor im Anschluss rasch progredient wächst (Amaral et al., 2017), (Tentori et al., 2013). Abhängig von der Wachstumsrate der Metastasen, sollte daher in Erwägung gezogen werden, ob die alleinige Immuntherapie mit Anti PD-1 ausreichend ist, oder ob andere Therapieregime, insbesondere die kombinierte Immuntherapie mit Ipilimumab und Nivolumab, berücksichtigt werden sollten.

Ein weiterer Fokus unserer Studie lag auf der Untersuchung des Einflusses der prätherapeutischen Lokalisation sowie der prätherapeutischen Anzahl der Metastasen auf das Therapieansprechen. In Arbeiten von Weide und Kollegen sowie Vosoughi Kollegen wird beispielsweise ein unabhängiger signifikant negativer Einfluss von Hirnmetastasen auf das Gesamtüberleben bei Melanompatienten im Stadium IV beschrieben (Weide et al., 2013), (Vosoughi et al., 2018). Diesen signifikanten Zusammenhang konnten wir in unserer Studie teilweise bestätigen. Die Patienten, die mit Pembrolizumab behandelt wurden, zeigten bei Vorhandensein von Hirnmetastasen ein signifikant reduziertes OS ( $p=0.021$ , HR 2.3, CI 1.4-4.0). In der Kohorte, die mit zielgerichteter Therapie behandelt wurde, zeigte sich kein signifikant unterschiedliches OS bei Patienten mit im Vergleich zu Patienten ohne Hirnmetastasen. Aufgrund der neuen Therapien mit Immuncheckpoint Blockade oder zielgerichteter Therapie hat sich die Prognose der Patienten mit Hirnmetastasen verbessert (Vosoughi et al., 2018). Insgesamt ist das Vorhandensein von Hirnmetastasen als prognostisch relevanter Parameter bei einzelnen Therapien weniger geeignet, da es ohnehin einer multimodalen Therapie bedarf (Kuske et al., 2018). Unter anderem sollten Patienten mit Hirnmetastasierung mittels einer kombinierten Immuntherapie, bestehend aus Ipilimumab und Nivolumab, therapiert werden (Tawbi et al., 2018, Michielin et al., 2019). Für das prätherapeutische Vorhandensein von Knochen- und Lebermetastasen konnten wir in keiner der untersuchten Kohorten eine

signifikante Einschränkung im Therapieansprechen feststellen. Zusammenfassend schließen wir daraus, dass die Metastasenlokalisation allein kein geeigneter prognostischer Parameter ist.

Das Gesamtüberleben ist abhängig vom AJCC-Stadium (Dickson and Gershenwald, 2011), (Balch et al., 2009). Es ist bekannt, dass Patienten mit Fernmetastasen eine schlechtere Prognose haben als Patienten ohne Fernmetastasen (Dickson and Gershenwald, 2011). Auch die Anzahl der Metastasen, wie es in einer Studie von Eigentler und Kollegen 2011 anhand von zerebralen Metastasen demonstriert wird, ist ein prognostischer Faktor für das Langzeitüberleben in Melanompatienten (Eigentler et al., 2011). Basierend auf dieser Erkenntnis untersuchten wir, ob die Anzahl der prätherapeutisch metastasierten Organsysteme Einfluss auf die Prognose in den unterschiedlichen Kohorten hat. In der BRAFi und MEKi Kohorte konnte bei mehr als zwei betroffenen Organsystemen eine signifikante Verminderung des OS beobachtet werden ( $p=0.0018$ , HR 8.8, CI 2.2-34.6). Die Erfassung der Anzahl der betroffenen Organsysteme scheint daher ein geeigneter Parameter zu sein, prognostische Einschätzungen bzgl. des Therapieansprechens vorzunehmen.

Zu den Limitationen dieser Arbeit zählt das retrospektive Design. Bei der Auswahl der Patienten haben wir strenge Einschlusskriterien angewandt, jedoch können in retrospektiven Analysen nicht alle Störfaktoren eliminiert werden. Teilweise erhielten die Patienten vor der Einleitung der in dieser Studie untersuchten Therapien sehr unterschiedliche Vorbehandlungen, andere wurden zwischenzeitlich operiert, sodass es zum Verlust der Zielläsion kam. In diesen Fällen wurde für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit die zweitgrößte Metastase verwendet. Ein Nachteil der Wachstumsgeschwindigkeit als prognostisch relevanter Parameter, ist die Tatsache, dass zwei Bildgebungen an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vor Therapieeinleitung durchgeführt werden müssen. Dieses kann mit einer Zeitverzögerung des Therapiebeginns einhergehen, was bei einer Erkrankung, die rasch fortschreitet und daher wenig Zeit lässt, ein Nachteil ist (Gaudy-Marqueste et al., 2014). Relativierend kann festgehalten werden, dass der Großteil der Patienten im Stadium IV in unserer Studie bereits mehrere Bildgebungen erhalten hatte, sodass eine Berechnung der

Wachstumsgeschwindigkeit der Metastasen ohne Zeitverzögerung möglich gewesen wäre. Wenn keine zwei Bildgebungen vor Therapiebeginn vorhanden sind, muss abgewogen werden, ob es sinnvoll ist, in einem sehr kurzen Zeitabstand vor Therapiebeginn eine zweite Bildgebung durchzuführen, um die Wachstumsgeschwindigkeit zu bestimmen. Auf der einen Seite steht der Informationsgewinn, welcher durch eine verhältnismäßig günstige und praktikable Methode erzielt werden kann, um eine prognostisch relevante Aussage bezüglich der Therapien zu treffen. Auf der anderen Seite steht die Therapieverzögerung bei einer Erkrankung, die zwar eine zunehmend bessere, aber noch immer eine deutlich reduzierte Lebenserwartung aufweist. So lag das 3 Jahres OS 2013/14 bei 37 % (Forschner et al., 2017) und das aktuelle 5 Jahres OS bei >50% (Larkin et al., 2019). Dieses, sowie die psychische Belastung, die bei einer Therapieverzögerung entstünde, müssen ethisch kritisch hinterfragt werden. Unsere Ergebnisse sprechen dafür die Metastasenkinetik prätherapeutisch zu bestimmen. Retrospektiv waren hierfür keine Zeitverzögerungen notwendig. Die häufigsten Gründe für das Vorhandensein zweier Bildgebungen waren vorausgegangene Vortherapien mit durchgeführten Staging-Untersuchungen oder zusätzliche Fragestellungen, beispielsweise bei inkompletten Bildgebungen oder bei Verlaufskontrollen metastasensuspекter, aber nicht beweisender Befunde.

Die Alters- und Geschlechtsverteilung in unseren Studienkohorten entspricht der Verteilung in der allgemeinen Population, sodass die Repräsentativität gegeben ist (Robert et al., 2011), (Gaudy-Marqueste et al., 2014). Hinsichtlich der Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens unter BRAFi und MEKi Therapie zeigen unsere Daten weder für das Geschlecht noch für das Alter einen signifikanten Zusammenhang, sodass das therapeutische Vorgehen davon unbeeinflusst sein sollte.

Die Größe unserer Kohorten ist mit 193 Patienten, die mit zielgerichteter Therapie, und 179 Patienten, die mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt wurden repräsentativer als die Arbeit von Hartung und Kollegen, die 37 Patienten umfasst (Hartung et al., 2017). In der französischen Studie von Gaudy-Marqueste und Kollegen 2014 wurden 127 Patienten analysiert, allerdings nur hinsichtlich der Metastasenkinetik, außerdem erhielt die Mehrzahl der Patienten in dieser

Zeit Chemotherapie und keine der neueren Behandlungsmethoden (Gaudy-Marqueste et al., 2014). Im Gegensatz zu unserer Arbeit haben Hartung und Kollegen 2017 jede einzelne Metastase eines Patienten vermessen. Dieses Vorgehen ermöglicht nicht nur eine Aussage über die Kinetik einer Zielläsion, sondern auch über die Heterogenität der Wachstumskinetik aller Metastasen eines Patienten (Hartung et al., 2017). Patienten mit großer Heterogenität zeigten eine verminderte Überlebensrate, was mit beschleunigter Resistenzentwicklung zu erklären sei (Hartung et al., 2017). Die beschriebene Methodik ist jedoch sehr zeitaufwendig und daher im klinischen Alltag ohne eine automatisierte Bilderkennungssoftware kaum umsetzbar. Die Methode unserer Arbeit, die größte Metastase zur Berechnung der Wachstumsrate heranzuziehen und die fünf größten Metastasen als Maßstab für die Tumorlast zu verwenden, erzielt vergleichbar signifikante Ergebnisse und ist im klinischen Alltag praktikabel umsetzbar. Arbeiten aus dem Jahr 1971 von Joseph WL und Kollegen und aus dem Jahr 1956 von Collins VP und Kollegen zeigen anhand von radiologisch nachgewiesenen Lungenmetastasen, dass eine geringe Heterogenität der Metastasenkinetik zwischen den einzelnen Läsionen bestünde (Collins et al., 1956), (Joseph et al., 1971). Die Ergebnisse dieser Arbeiten unterstützen daher unsere Methode die größte Metastase repräsentativ als Zielläsion zu vermessen, ohne dabei einen Informationsverlust hinnehmen zu müssen. Ein weiterer Unterschied zwischen unserer Arbeit und den Arbeiten von Hartung und Gaudy-Marqueste und Kollegen ist die Durchführung der Ausmessung der Metastasen. Um die Kinetik der Metastasen zu ermitteln, haben wir die Messung des größten Durchmessers in einer Ebene durchgeführt. Die Dreidimensionalität der Metastase wird hierbei nicht berücksichtigt, aber die Aussagekraft durch Verwendung des größten Durchmessers dabei nicht vermindert. Dieses Vorgehen dient der weiteren Vereinfachung des Verfahrens.

Unsere Arbeit ist die erste Arbeit, die bei Therapie mit Immuncheckpoint Inhibitoren einen negativen prognostischen Einfluss einer großen prätherapeutischen Tumorkinetik nachweisen konnte. Außerdem ist sie eine der ersten Arbeiten, die den prognostischen Einfluss der Tumorkinetik bei unterschiedlichen Therapie-Regimen vergleichend analysiert, um Therapieentscheidungen zu beein-

flussen. Unser Ansatz, anhand einer singulären Metastase die Kinetik zu erfassen, ist innovativ und rasch in die klinische Routine translatierbar. Um das Verfahren des Ausmessens der Metastasen und damit die Bestimmung der Kinetik noch weiter zu vereinfachen ist im Gegensatz zu dem Ansatz, bei dem alle Metastasen ausgemessen werden, keine Entwicklung einer aufwendigen Software notwendig. Sinnvoll ist es, weiterführende prospektive Studien mit größeren Kohorten durchzuführen, um allgemein gültige Grenzwerte, z.B. für die Metastasenwachstumsrate, zu erarbeiten, die einen Leitfaden für die einzelnen Therapien darstellen können. Außerdem sollte die Metastasenkinetik auch für die heute beim metastasierten Melanom durchgeführte Kombinationstherapie mit Anti-CTLA-4 und Anti-PD-1 Antikörpern vergleichend getestet werden (Wolchok et al., 2017).

## 5 Zusammenfassung

In unserer retrospektiven Studie mit 193 Patienten, die mit zielgerichteter Therapie, sowie 179 Patienten, die mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt wurden, sind prätherapeutische klinische Parameter erfasst worden. Zu den untersuchten Parametern gehörten etablierte Laborparameter wie LDH, S100B sowie Zellen des Differentialblutbildes. Zusätzlich zu diesen bekannten Biomarkern wurden Parameter der Metastasenkinetik, wie z.B. die Wachstumsrate und die Tumor-Verdoppelungszeit betrachtet. Die Parameter wurden bei den unterschiedlichen Therapieregimen darauf untersucht, ob sie in unterschiedlichem Ausmaß prognostisch relevant sein können. Das Ziel war es, einfach zu erfassende und im klinischen Alltag schnell und praktikabel einzusetzende Merkmale zu finden. Aus ethischer Sicht war es von großer Bedeutung, dass die Erfassung der Merkmale nicht zu einer klinisch relevanten, das Gesamtüberleben beeinträchtigenden Therapieverzögerung führte.

Zusammenfassend stellten sich in unserer Arbeit dabei folgende Parameter als prognostisch relevant heraus.

Waren prätherapeutisch mehr als zwei Regionen im Körper von Metastasen betroffen, war das Gesamtüberleben bei Patienten mit BRAFi und MEKi Therapie signifikant vermindert. Bei Patienten, die mit Pembrolizumab behandelt wurden, war dagegen die prätherapeutische Bildgebung zum Ausschluss von zerebralen Metastasen besonders wichtig, denn hier kam es in unserer Arbeit zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtüberleben bei vorhandenen Hirnmetastasen. Weitere Parameter für ein vermindertes Ansprechen, einhergehend mit vermindertem Gesamtüberleben, waren in unserer Studie die Monozyten und die basophilen Granulozyten. Bei einem prätherapeutisch erhöhten Monozyten Wert ( $\geq 0.98$  Monozyten/ml) konnte ein signifikant vermindertes Ansprechen der Monotherapie mit BRAF Inhibitoren nachgewiesen werden. Hingegen war eine erhöhte Anzahl der basophilen Granulozyten ( $\geq 0.08$ /ml) mit einem signifikant reduzierten Ansprechen der Kombinationstherapie mit BRAFi und MEKi assoziiert.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Metastasenkinetik bei Systemtherapie des metastasierten Melanoms mit einerseits BRAF- und MEK-Inhibitoren und andererseits PD-1 Antikörpern. Als prognostisch relevante Parameter, identifizierten wir eine Metastasenwachstumsrate  $>3,9/4,3$  mm/ Monat sowie die Tumor-Verdoppelungszeit als Vertreter der dynamischen Parameter und den Durchmesser der größten Metastase (Zielläsion) und die Tumorgesamtmasse nach RECIST. In der BRAFi Therapie Kohorte konnte der absolute Durchmesser der größten Zielläsion als prognostisch besonders relevanter Faktor herausgearbeitet werden. Hatte die Zielläsion einen Durchmesser von  $\geq 26,4$  mm, war dies mit einem signifikant verringertem Gesamtüberleben assoziiert. Eine Tumor-Verdoppelungszeit von weniger als 218 Tagen ging in der BRAFi Kohorte mit einem signifikant reduzierten progressionsfreien Überleben einher. In der Immuncheckpoint-Inhibitor Kohorte (Nivolumab) konnte bei Patienten mit einer Tumorlast, gemessen an der Summe der Targetläsionen nach RECIST, von  $>100,8$  mm, eine signifikant negative Assoziation mit dem Gesamtüberleben gezeigt werden. Der aussagekräftigste Parameter der Metastasenkinetik in unserer Arbeit war die Wachstumsrate. Sie korrelierte deutlich signifikant mit dem Gesamtüberleben und dem besten objektiven Ansprechen nach RECIST in der Immuncheckpoint-Inhibitor Kohorte und dem progressionsfreien Überleben in der BRAFi- und MEKi- Kohorte.

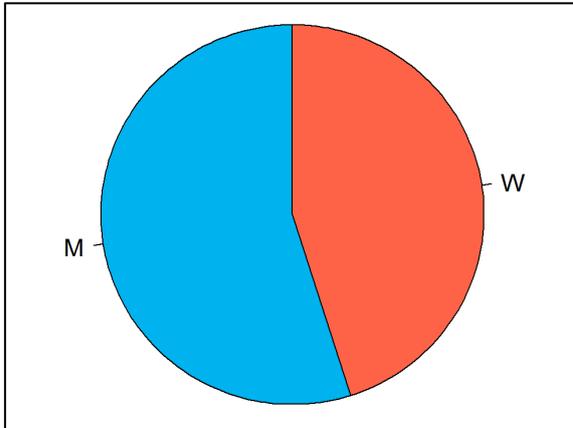
Abschließend kann festgehalten werden, dass neben einzelnen laborchemischen Markern, die Metastasenkinetik, hier besonders die Wachstumsrate, ein aussagekräftiger Parameter hinsichtlich des Therapieansprechens war, der lediglich an das Vorhandensein zweier CT-Untersuchungen vor Therapiestart geknüpft ist. Dennoch sollten diesbezüglich prospektive Studien mit großen Fallzahlen unter Beachtung der ethischen Normen im klinischen Alltag durchgeführt werden, um die prognostische Wertigkeit der Parameter weiter zu untersuchen.

## Anhang

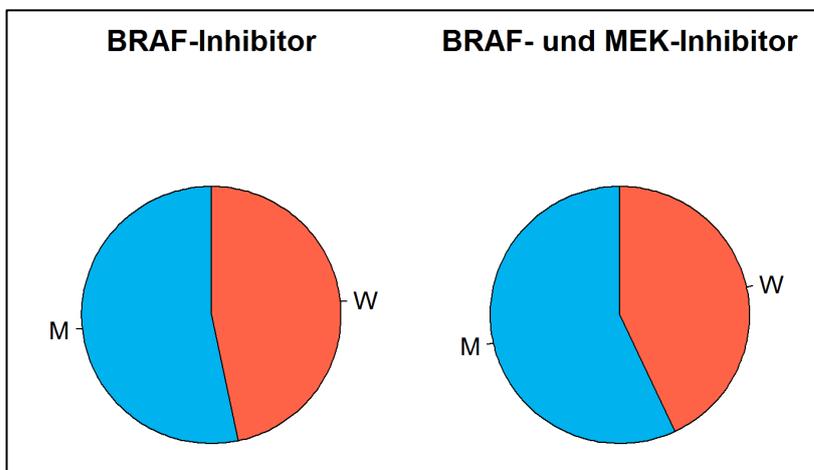
### Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Geschlechterverteilung: Kohorte mit zielgerichteter Therapie .....	54
Anhang 2: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	55
Anhang 3: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben der BRAFi und MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale .....	57
Anhang 4: Analyse Best Objective Response in Abhängigkeit klinischer Merkmale aufgeteilt in BRAFi und BRAFi und MEKi Kohorte .....	60

## Anhang 1: Geschlechterverteilung: Kohorte mit zielgerichteter Therapie

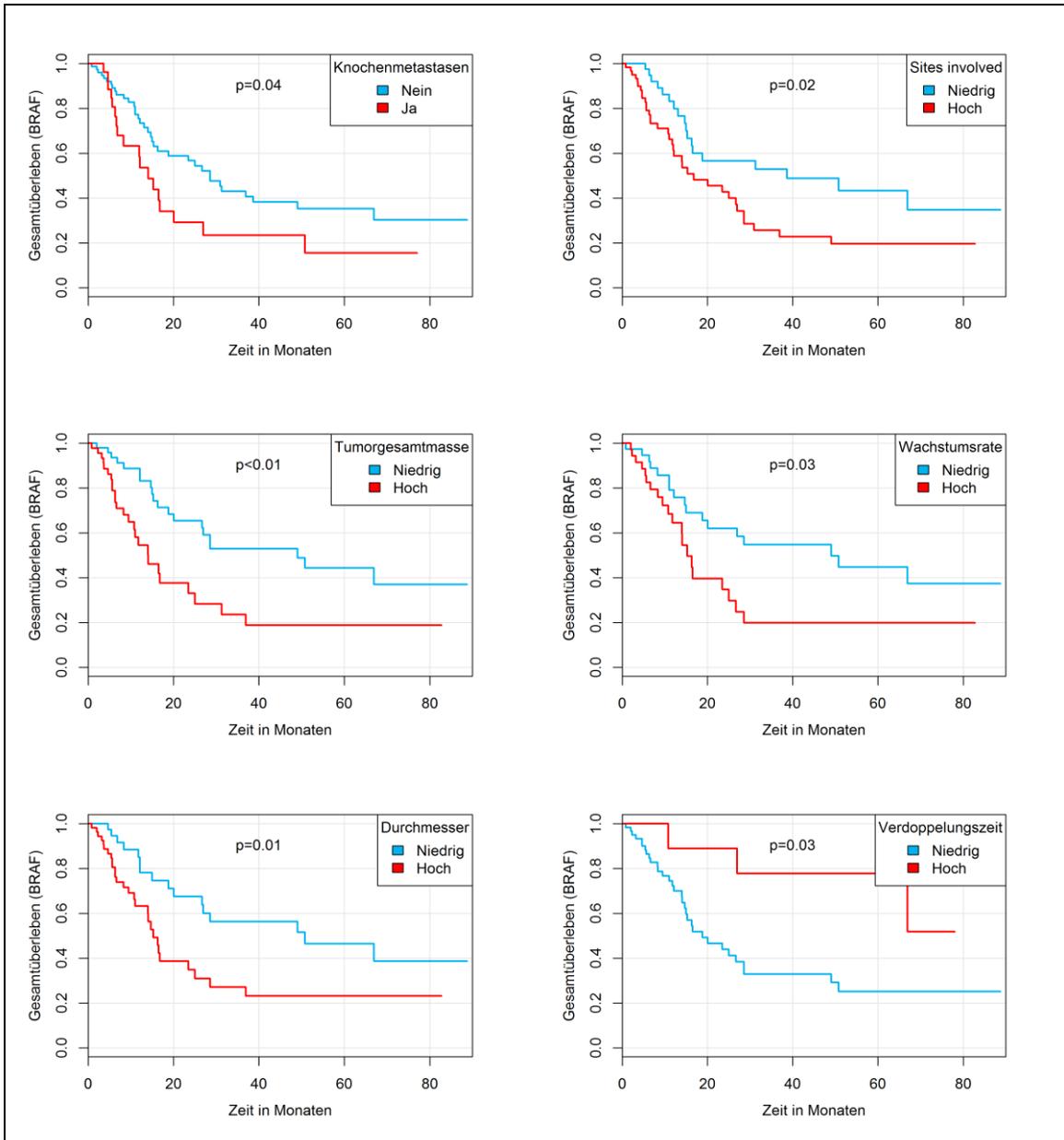


Geschlechterverteilung (m-männlich; w-weiblich) - gesamte Stichprobe der zielgerichteten Therapie

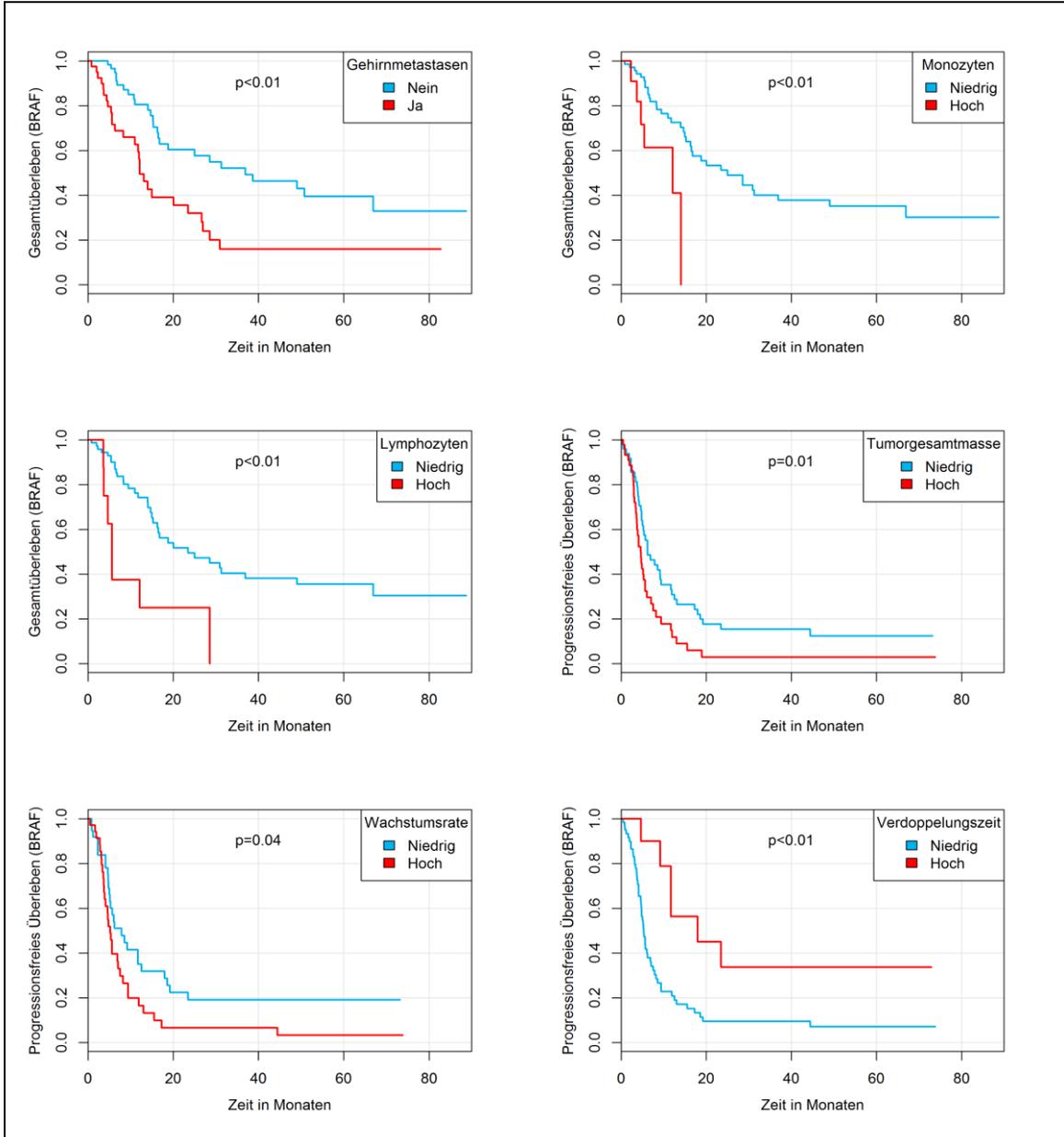


Geschlechterverteilung (m-männlich; w-weiblich) – aufgeteilt in BRAFi und BRAFi und MEKi Kohorte

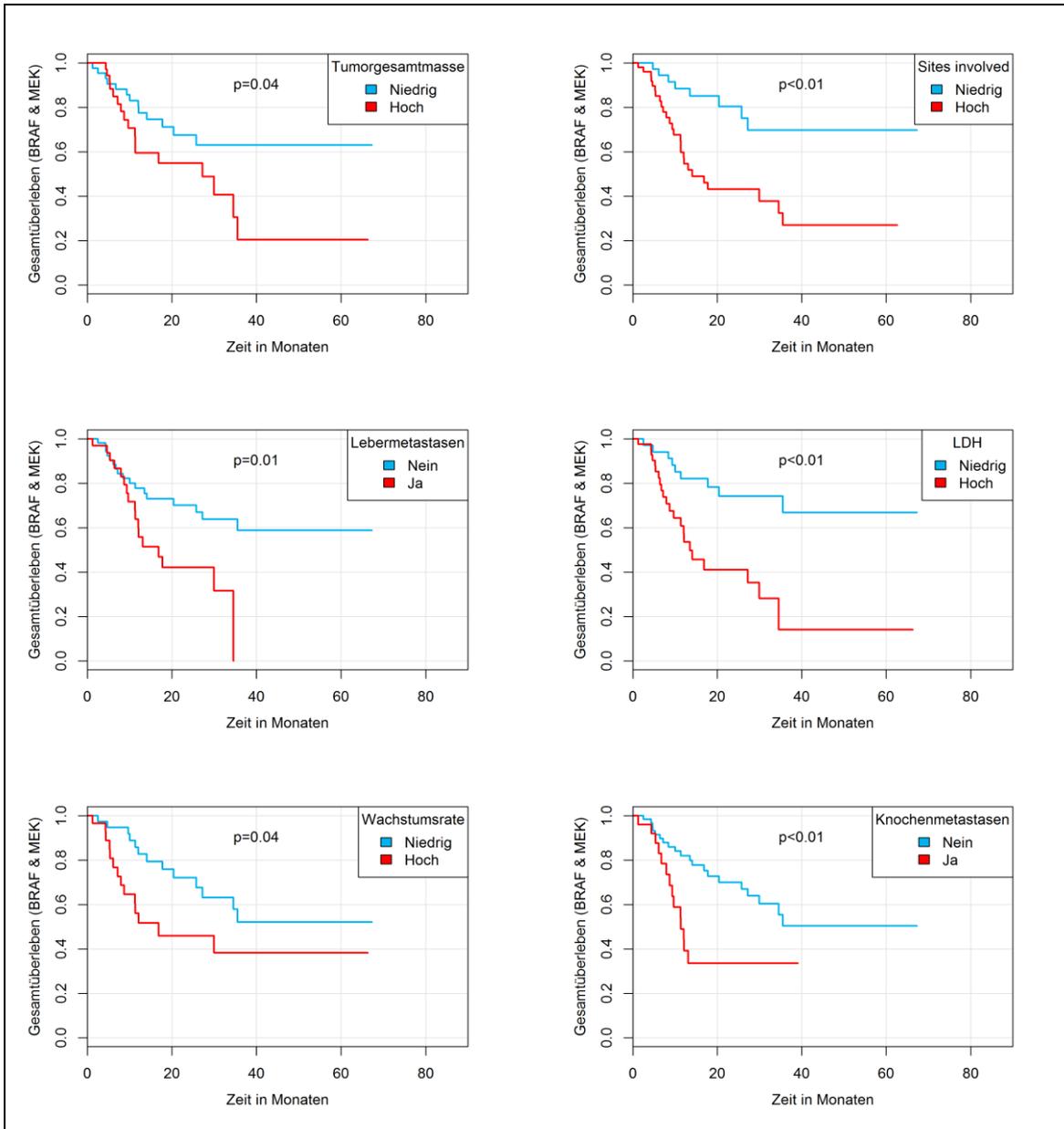
## Anhang 2: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben der BRAFi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale



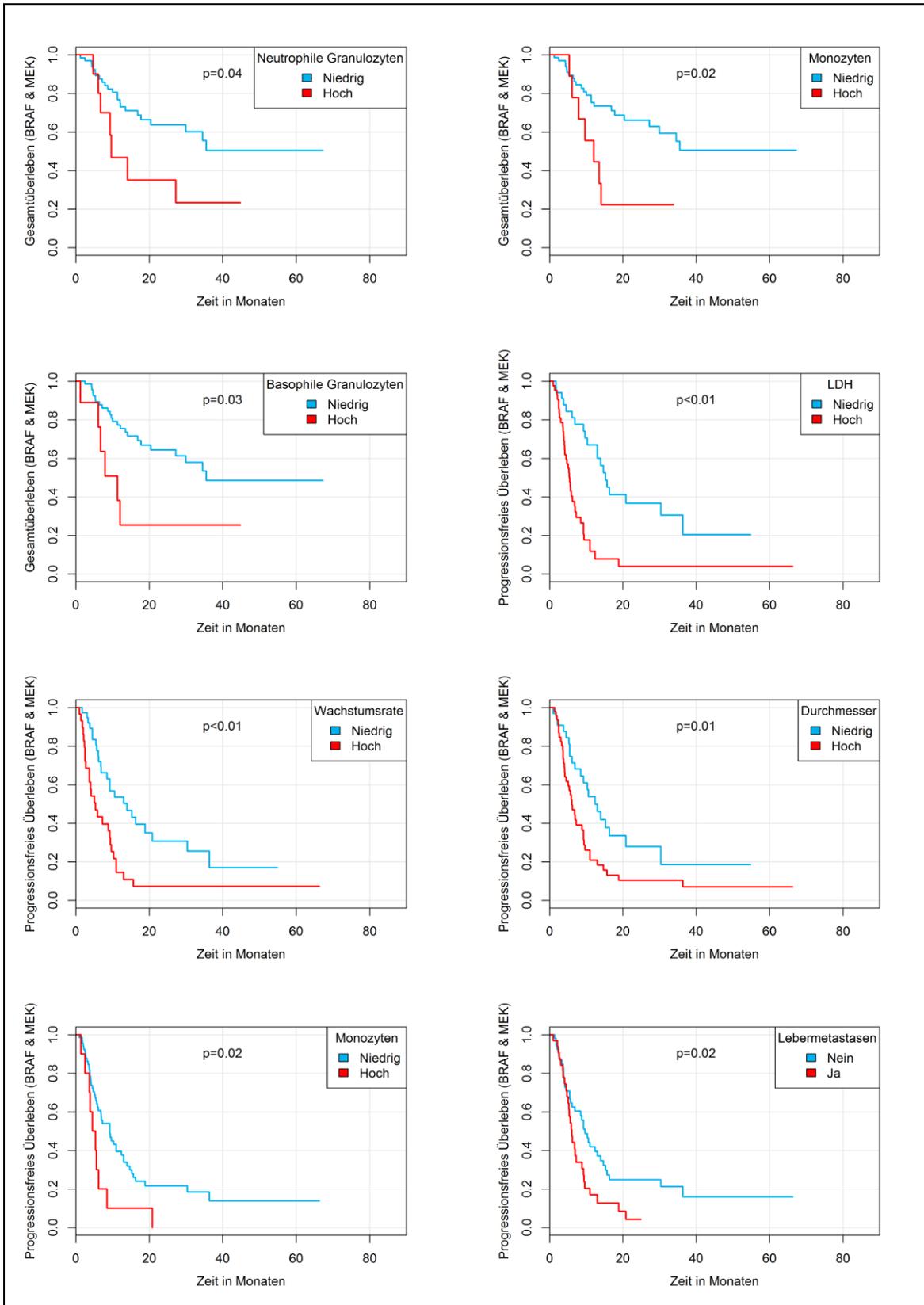
Fortsetzung Anhang 2



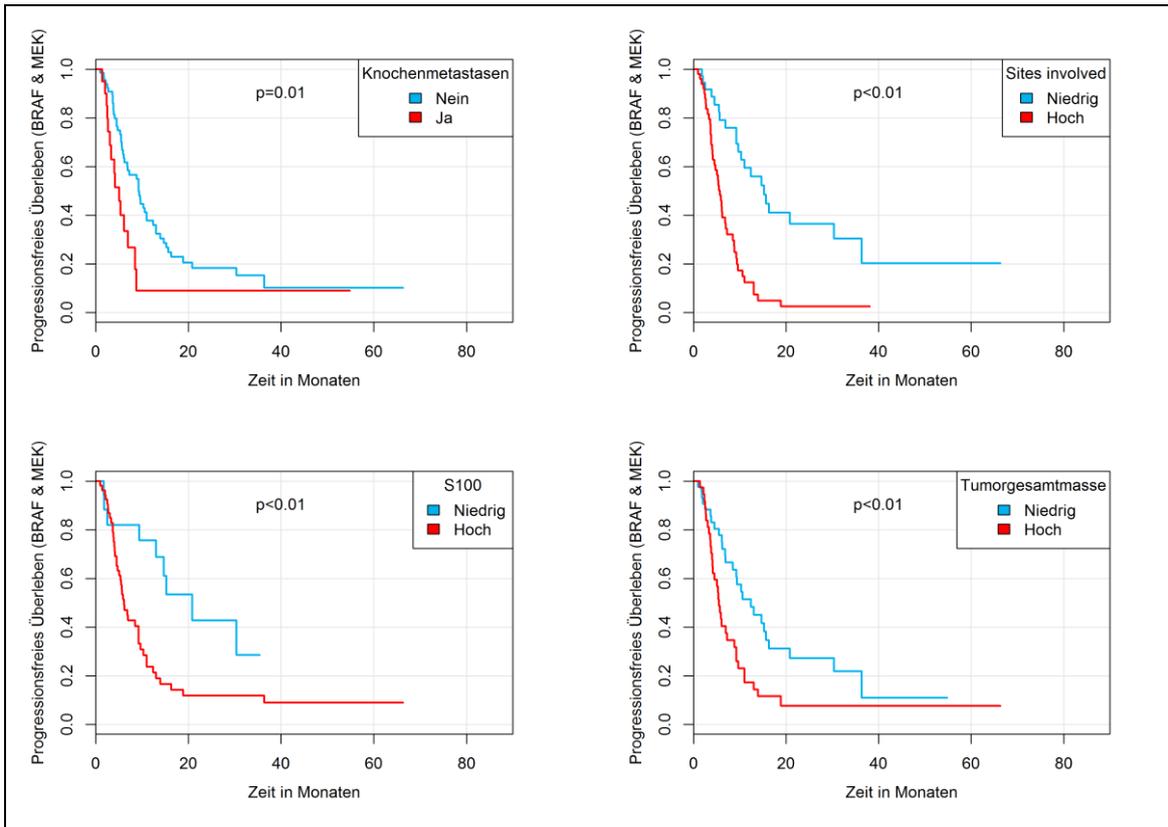
### Anhang 3: Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben der BRAFi und MEKi Kohorte in Abhängigkeit klinischer Merkmale



Fortsetzung Anhang 3



Fortsetzung Anhang 3



Anhang 4: Analyse Best Objective Response in Abhängigkeit klinischer Merkmale aufgeteilt in BRAFi und BRAFi und MEKi Kohorte

Merkmale	BRAFi-Inhibitor No. (%)			BRAFi- und MEKi-Inhibitor No. (%)		
	PD	SD	PR/CR	PD	SD	PR/CR
<b>Weiblich</b>	7 (16)	10 (23)	27 (61)	3 (9)	5 (14)	27 (77)
<b>Männlich</b>	6 (13)	8 (17)	32 (70)	4 (9)	6 (14)	34 (77)
	OR† 0.80 (0.23-2.67) p = 0.770			OR 1.05 (0.21-6.08) p = 1.000		
<b>Keine Lebermetastasen</b>	8 (14)	9 (15)	43 (72)	4 (8)	7 (14)	38 (78)
<b>Lebermetastasen</b>	5 (17)	9 (30)	16 (53)	3 (10)	4 (13)	23 (77)
	OR† 1.31 (0.35-4.43) p = 0.750			OR 1.3 (0.22-6.47) p = 1.000		
<b>Keine Knochenmetastasen</b>	10 (15)	11 (17)	44 (68)	4 (7)	9 (16)	42 (76)
<b>Knochenmetastasen</b>	3 (12)	7 (28)	15 (60)	3 (13)	2 (8)	19 (79)
	OR† 0.78 (0.16-2.88) p = 1.000			OR 1.83 (0.3-9.5) p = 0.429		
<b>Keine Gehirnmetastasen</b>	10 (18)	5 (9)	41 (73)	4 (7)	9 (15)	47 (78)
<b>Gehirnmetastasen</b>	3 (9)	13 (38)	18 (53)	3 (16)	2 (11)	14 (74)
	OR† 0.46 (0.09-1.69) p = 0.361			OR 2.61 (0.4-13.8) p = 0.350		
<b>Alter ≤ 46.52 Jahre</b>	3 (18)	2 (12)	12 (71)	2 (11)	2 (11)	14 (78)
<b>Alter &gt; 46.52 Jahre</b>	10 (14)	16 (22)	47 (64)	5 (8)	9 (15)	47 (77)
	OR† 0.72 (0.19-3.74) p = 0.706			OR 0.69 (0.1-5.8) p = 0.655		
<b>Sites involved ≤ 2</b>	6 (17)	2 (6)	28 (78)	2 (6)	6 (19)	24 (75)
<b>Sites involved &gt; 2</b>	7 (13)	16 (30)	30 (57)	5 (11)	5 (11)	37 (79)
	OR† 0.76 (0.23-2.64) p = 0.762			OR 1.70 (0.33-14.0) p = 0.695		
<b>LDH ≤ 250 U/l</b>	8 (19)	6 (14)	28 (67)	4 (24)	4 (24)	9 (53)
<b>LDH &gt; 250 U/l</b>	5 (12)	12 (29)	24 (59)	3 (6)	4 (8)	41 (85)
	OR† 0.60 (0.16-2.02) p = 0.548			OR 2.23 (0.42-18.36) p = 0.438		
<b>S100 ≤ 0.1 ug/l</b>	5 (19)	4 (15)	18 (67)	4 (31)	4 (17)	9 (52)
<b>S100 &gt; 0.1 ug/l</b>	8 (16)	10 (20)	33 (65)	3 (70)	4 (7)	41 (24)
	OR† 0.81 (0.24-3.06) p = 0.758			OR 0.23 (0.04-1.21) p = 0.070		
<b>Wachstumsrate ≤ 3.4 mm/Monat</b>	4 (11)	4 (11)	27 (77)	2 (5)	7 (18)	29 (76)
<b>Wachstumsrate &gt; 3.4 mm/Monat</b>	4 (12)	6 (18)	23 (70)	4 (14)	3 (11)	21 (75)
	OR† 1.07 (0.22-5.14) p = 1.000			OR 2.86 (0.49-24.56) p = 0.389		
<b>Verdopp-Zeit ≤ 271.99 Monate</b>	8 (11)	8 (14)	41 (72)	5 (11)	7 (15)	34 (74)
<b>Verdopp-Zeit &gt; 271.99 Monate</b>	0 (0)	2 (20)	8 (80)	1 (5)	3 (15)	16 (80)
	OR† - p = 0.460			OR 0.48 (0.02-3.43) p = 0.659		

## Fortsetzung Anhang 4

Merkmale	BRAF-Inhibitor No. (%)			BRAF- und MEK-Inhibitor No. (%)		
	PD	SD	PR/CR	PD	SD	PR/CR
<b>Tumorgesamtmasse ≤ 68.7 mm</b>	6 (13)	7 (15)	35 (73)	3 (7)	7 (16)	33 (77)
<b>Tumorgesamtmasse &gt; 68.7 mm</b>	7 (18)	11 (28)	22 (55)	4 (11)	4 (11)	28 (78)
	OR <sup>†</sup> 1.47 (0.44-5.11) p = 0.558			OR 1.64 (0.32-9.45) p = 0.696		
<b>Durchmesser ≤ 26.40 mm</b>	4 (11)	7 (18)	27 (71)	1 (3)	6 (18)	26 (79)
<b>Durchmesser &gt; 26.40 mm</b>	9 (18)	11 (22)	30 (60)	6 (13)	5 (11)	34 (76)
	OR <sup>†</sup> 1.82 (0.53-7.47) p = 0.379			OR 4.37 (0.67-117.30) p = 0.228		
Legende: OR- Odds Ratio; p- p-Wert; CR- Complete Response; PD- Progressive Disease; PR- Partial Response; SD- Stable Disease						

## Literaturverzeichnis

- ALI, Z., YOUSAF, N. & LARKIN, J. 2013. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl*, 11, 81-91.
- AMARAL, T., SINNBERG, T., MEIER, F., KREPLER, C., LEVESQUE, M., NIESSNER, H. & GARBE, C. 2017. MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer*, 73, 93-101.
- ARMSTRONG, B. K. 1988. Epidemiology of Malignant Melanoma: Intermittent or Total Accumulated Exposure to the Sun? *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 14, 835-849.
- ARNETH, B. 2018. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC Cancer*, 18, 527.
- BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S. J., THOMPSON, J. F., ATKINS, M. B., BYRD, D. R., BUZAID, A. C., COCHRAN, A. J., COIT, D. G., DING, S., EGGERMONT, A. M., FLAHERTY, K. T., GIMOTTY, P. A., KIRKWOOD, J. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. C., JR., MORTON, D. L., ROSS, M. I., SOBER, A. J. & SONDAK, V. K. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27, 6199-206.
- BÖNI, R., BURG, G., DOGUOGLU, A., ILG, E. C., SCHÄFER, B. W., MÜLLER, B. & HEIZMANN, C. W. 1997. Immunohistochemical localization of the Ca<sup>2+</sup> binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. 137, 39-43.
- CHAN, X. Y., SINGH, A., OSMAN, N. & PIVA, T. J. 2017. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci*, 18.
- CHAPMAN, P. B., HAUSCHILD, A., ROBERT, C., HAANEN, J. B., ASCIERTO, P., LARKIN, J., DUMMER, R., GARBE, C., TESTORI, A., MAIO, M., HOGG, D., LORIGAN, P., LEBBE, C., JOUARY, T., SCHADENDORF, D., RIBAS, A., O'DAY, S. J., SOSMAN, J. A., KIRKWOOD, J. M., EGGERMONT, A. M., DRENO, B., NOLOP, K., LI, J., NELSON, B., HOU, J., LEE, R. J., FLAHERTY, K. T. & MCARTHUR, G. A. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364, 2507-16.
- CHEEMA, P. K. & BURKES, R. L. 2013. Overall survival should be the primary endpoint in clinical trials for advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*, 20, e150-60.
- CHENG, L., LOPEZ-BELTRAN, A., MASSARI, F., MACLENNAN, G. T. & MONTIRONI, R. 2018. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*, 31, 24-38.
- COLLINS, V. P., LOEFFLER, R. K. & TIVEY, H. 1956. Observations on growth rates of human tumors. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 76, 988-1000.
- CURL, P., VUJIC, I., VAN 'T VEER, L. J., ORTIZ-URDA, S. & KAHN, J. G. 2014. Cost-effectiveness of treatment strategies for BRAF-mutated metastatic melanoma. *PLoS One*, 9, e107255.

- CURTIN, J. A., FRIDLYAND, J., KAGESHITA, T., PATEL, H. N., BUSAM, K. J., KUTZNER, H., CHO, K.-H., AIBA, S., BRÖCKER, E.-B., LEBOIT, P. E., PINKEL, D. & BASTIAN, B. C. 2005. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 353, 2135-2147.
- DENNIS, L. K., VANBEEK, M. J., BEANE FREEMAN, L. E., SMITH, B. J., DAWSON, D. V. & COUGHLIN, J. A. 2008. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol*, 18, 614-27.
- DICKSON, P. V. & GERSHENWALD, J. E. 2011. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 20, 1-17.
- DIEM, S., KASENDA, B., MARTIN-LIBERAL, J., LEE, A., CHAUHAN, D., GORE, M. & LARKIN, J. 2015. Prognostic score for patients with advanced melanoma treated with ipilimumab. *Eur J Cancer*, 51, 2785-91.
- DING, Y., ZHANG, S. & QIAO, J. 2018. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in melanoma: Evidence from a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97, e11446.
- DOMINGUES, B., LOPES, J. M., SOARES, P. & PÓPULO, H. 2018. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther*, 7, 35-49.
- EGBERTS, F., KOTTHOFF, E. M., GERDES, S., EGBERTS, J. H., WEICHENTHAL, M. & HAUSCHILD, A. 2012. Comparative study of YKL-40, S-100B and LDH as monitoring tools for Stage IV melanoma. *European Journal of Cancer*, 48, 695-702.
- EIGENTLER, T. K., FIGL, A., KREX, D., MOHR, P., MAUCH, C., RASS, K., BOSTROEM, A., HEESE, O., KOELBL, O., GARBE, C. & SCHADENDORF, D. 2011. Number of metastases, serum lactate dehydrogenase level, and type of treatment are prognostic factors in patients with brain metastases of malignant melanoma. *Cancer*, 117, 1697-703.
- EISENHAUER, E. A., THERASSE, P., BOGAERTS, J., SCHWARTZ, L. H., SARGENT, D., FORD, R., DANCEY, J., ARBUCK, S., GWYTHYER, S., MOONEY, M., RUBINSTEIN, L., SHANKAR, L., DODD, L., KAPLAN, R., LACOMBE, D. & VERWEIJ, J. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45, 228-47.
- EROGLU, Z. & RIBAS, A. 2016. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*, 8, 48-56.
- ETON, O., LEGHA, S. S., MOON, T. E., BUZAID, A. C., PAPADOPOULOS, N. E., PLAGER, C., BURGESS, A. M., BEDIKIAN, A. Y., RING, S., DONG, Q., GLASSMAN, A. B., BALCH, C. M. & BENJAMIN, R. S. 1998. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol*, 16, 1103-11.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.
- FINCK, S. J., GIULIANO, A. E. & MORTON, D. L. 1983. LDH and melanoma. *Cancer*, 51, 840-3.

- FLAHERTY, K. T. 2012. Targeting metastatic melanoma. *Annu Rev Med*, 63, 171-83.
- FLAHERTY, K. T., INFANTE, J. R., DAUD, A., GONZALEZ, R., KEFFORD, R. F., SOSMAN, J., HAMID, O., SCHUCHTER, L., CEBON, J., IBRAHIM, N., KUDCHADKAR, R., BURRIS, H. A., 3RD, FALCHOOK, G., ALGAZI, A., LEWIS, K., LONG, G. V., PUZANOV, I., LEBOWITZ, P., SINGH, A., LITTLE, S., SUN, P., ALLRED, A., OUELLET, D., KIM, K. B., PATEL, K. & WEBER, J. 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367, 1694-703.
- FORSCHNER, A., EICHNER, F., AMARAL, T., KEIM, U., GARBE, C. & EIGENTLER, T. K. 2017. Improvement of overall survival in stage IV melanoma patients during 2011-2014: analysis of real-world data in 441 patients of the German Central Malignant Melanoma Registry (CMMR). *J Cancer Res Clin Oncol*, 143, 533-540.
- GALLAGHER, R. P., LEE, T. K., BAJDIK, C. D. & BORUGIAN, M. 2010. Ultraviolet radiation. *Chronic Dis Can*, 29 Suppl 1, 51-68.
- GANDINI, S., FERRUCCI, P. F., BOTTERI, E., TOSTI, G., BARBERIS, M., PALA, L., BATTAGLIA, A., CLERICI, A., SPADOLA, G., COCOROCCHIO, E. & MARTINOLI, C. 2016. Prognostic significance of hematological profiles in melanoma patients. 139, 1618-1625.
- GARBE, C. & EIGENTLER, T. K. 2018. Vemurafenib. *Recent Results Cancer Res*, 211, 77-89.
- GARBE, C., EIGENTLER, T. K., BAUER, J., BLODORN-SCHLICHT, N., CERRONI, L., FEND, F., HANTSCHKE, M., KURSCHAT, P., KUTZNER, H., METZE, D., MIELKE, V., PRESSLER, H., REUSCH, M., REUSCH, U., STADLER, R., TRONNIER, M., YAZDI, A. & METZLER, G. 2016. Mitoserate beim primären Melanom: Interobserver- und Intraobserver-Reproduzierbarkeit am HE-Schnitt und in der Immunhistologie. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14, 910-6.
- GAUDY-MARQUESTE, C., ARCHIER, E., GROB, A., DURIEUX, O., LOUNDOU, A., RICHARD, M. A. & GROB, J. J. 2014. Initial metastatic kinetics is the best prognostic indicator in stage IV metastatic melanoma. *Eur J Cancer*, 50, 1120-4.
- GIBLIN, A. V. & THOMAS, J. M. 2007. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60, 32-40.
- GIROTTI, M. R., GREMEL, G., LEE, R., GALVANI, E., ROTHWELL, D., VIROS, A., MANDAL, A. K., LIM, K. H., SATURNO, G., FURNEY, S. J., BAENKE, F., PEDERSEN, M., ROGAN, J., SWAN, J., SMITH, M., FUSI, A., OUDIT, D., DHOMEN, N., BRADY, G., LORIGAN, P., DIVE, C. & MARAIS, R. 2016. Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma. *Cancer Discov*, 6, 286-99.
- GRAY, E. S., RIZOS, H., REID, A. L., BOYD, S. C., PEREIRA, M. R., LO, J., TEMBE, V., FREEMAN, J., LEE, J. H., SCOLYER, R. A., SIEW, K., LOMMA, C., COOPER, A., KHATTAK, M. A., MENIAWY, T. M., LONG, G. V., CARLINO, M. S., MILLWARD, M. & ZIMAN, M. 2015. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired

- resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*, 6, 42008-18.
- HARGADON, K. M., JOHNSON, C. E. & WILLIAMS, C. J. 2018. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*, 62, 29-39.
- HARTUNG, N., HUYNH, C. T., GAUDY-MARQUESTE, C., FLAVIAN, A., MALISSEN, N., RICHARD-LALLEMAND, M. A., HUBERT, F. & GROB, J. J. 2017. Study of metastatic kinetics in metastatic melanoma treated with B-RAF inhibitors: Introducing mathematical modelling of kinetics into the therapeutic decision. *PLoS One*, 12, e0176080.
- HAUSCHILD, A., ENGEL, G., BRENNER, W., GLÄSER, R., MÖNIG, H., HENZE, E. & CHRISTOPHERS, E. 1999. S100B Protein Detection in Serum Is a Significant Prognostic Factor in Metastatic Melanoma. *Oncology*, 56, 338-344.
- HEIN, R., BOSSERHOFF, A. & RING, J. 2006. Tumormarker beim malignen Melanom. *Dtsch Arztebl International*, 103, 943-.
- HENRIQUE, R., AZEVEDO, R., BENTO, M. J., DOMINGUES, J. C., SILVA, C. & JERÓNIMO, C. 2000. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43, 991-1000.
- HENZE, G., DUMMER, R., JOLLER-JEMELKA, H. I., BONI, R. & BURG, G. 1997. Serum S100--a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology*, 194, 208-12.
- HONG, X., SULLIVAN, R. J., KALINICH, M., KWAN, T. T., GIOBBIE-HURDER, A., PAN, S., LICAUSI, J. A., MILNER, J. D., NIEMAN, L. T., WITTNER, B. S., HO, U., CHEN, T., KAPUR, R., LAWRENCE, D. P., FLAHERTY, K. T., SEQUIST, L. V., RAMASWAMY, S., MIYAMOTO, D. T., LAWRENCE, M., TONER, M., ISSELBACHER, K. J., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2018. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 2467-2472.
- HUGDAHL, E., KALVENES, M. B., PUNTERVOLL, H. E., LADSTEIN, R. G. & AKSLEN, L. A. 2016. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. *Br J Cancer*, 114, 801-8.
- JANG, S. & ATKINS, M. B. 2013. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol*, 14, e60-9.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J. & THUN, M. J. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59, 225-49.
- JOSEPH, R. W., ELASSAÏSS-SCHAAP, J., KEFFORD, R., HWU, W.-J., WOLCHOK, J. D., JOSHUA, A. M., RIBAS, A., HODI, F. S., HAMID, O., ROBERT, C., DAUD, A., DRONCA, R., HERSEY, P., WEBER, J. S., PATNAIK, A., DE ALWIS, D. P., PERRONE, A., ZHANG, J., KANG, S. P., EBBINGHAUS, S., ANDERSON, K. M. & GANGADHAR, T. C. 2018. Baseline Tumor Size Is an Independent Prognostic Factor for Overall Survival in Patients with Melanoma Treated with Pembrolizumab. *Clinical Cancer Research*, 24, 4960-4967.

- JOSEPH, W. L., MORTON, D. L. & ADKINS, P. C. 1971. Variation in tumor doubling time in patients with pulmonary metastatic disease. *J Surg Oncol*, 3, 143-9.
- KARIMKHANI, C., GREEN, A. C., NIJSTEN, T., WEINSTOCK, M. A., DELLAVALLE, R. P., NAGHAVI, M. & FITZMAURICE, C. 2017. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*, 177, 134-140.
- KUSKE, M., RAUSCHENBERG, R., GARZAROLLI, M., MEREDYTH-STEWART, M., BEISSERT, S., TROOST, E. G. C., GLITZA, O. I. C. & MEIER, F. 2018. Melanoma Brain Metastases: Local Therapies, Targeted Therapies, Immune Checkpoint Inhibitors and Their Combinations-Chances and Challenges. *American journal of clinical dermatology*, 19, 529-541.
- LARKIN, J., ASCIERTO, P. A., DRÉNO, B., ATKINSON, V., LISZKAY, G., MAIO, M., MANDALÀ, M., DEMIDOV, L., STROYAKOVSKIY, D., THOMAS, L., DE LA CRUZ-MERINO, L., DUTRIAU, C., GARBE, C., SOVAK, M. A., CHANG, I., CHOONG, N., HACK, S. P., MCARTHUR, G. A. & RIBAS, A. 2014. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 371, 1867-1876.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., RUTKOWSKI, P., LAO, C. D., COWEY, C. L., SCHADENDORF, D., WAGSTAFF, J., DUMMER, R., FERRUCCI, P. F., SMYLLIE, M., HOGG, D., HILL, A., MARQUEZ-RODAS, I., HAANEN, J., GUIDOBONI, M., MAIO, M., SCHOFFSKI, P., CARLINO, M. S., LEBBE, C., MCARTHUR, G., ASCIERTO, P. A., DANIELS, G. A., LONG, G. V., BASTHOLT, L., RIZZO, J. I., BALOGH, A., MOSHYK, A., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2019. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 381, 1535-1546.
- LASITHIOTAKIS, K. G., LEITER, U., GORKIEVICZ, R., EIGENTLER, T., BREUNINGER, H., METZLER, G., STROBEL, W. & GARBE, C. 2006. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in southern Germany. 107, 1331-1339.
- LEONARDI, G. C., FALZONE, L., SALEMI, R., ZANGHÌ, A., SPANDIDOS, D. A., MCCUBREY, J. A., CANDIDO, S. & LIBRA, M. 2018. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*, 52, 1071-1080.
- LIU, Y. & SHEIKH, M. S. 2014. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*, 6, 228.
- LIVINGSTONE, E., ZIMMER, L., VAUBEL, J. & SCHADENDORF, D. 2014. BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management. *Chin Clin Oncol*, 3, 29.
- LUKE, J. J., FLAHERTY, K. T., RIBAS, A. & LONG, G. V. 2017. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 463-482.
- MACKIEWICZ, J. & MACKIEWICZ, A. 2018. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Contemp Oncol (Pozn)*, 22, 68-72.

- MANOLA, J., ATKINS, M., IBRAHIM, J. & KIRKWOOD, J. 2000. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol*, 18, 3782-93.
- MARTENS, A., WISTUBA-HAMPRECHT, K., YUAN, J., POSTOW, M. A., WONG, P., CAPONE, M., MADONNA, G., KHAMMARI, A., SCHILLING, B., SUCKER, A., SCHADENDORF, D., MARTUS, P., DRENO, B., ASCIERTO, P. A., WOLCHOK, J. D., PAWELEC, G., GARBE, C. & WEIDE, B. 2016. Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4+ and CD8+ T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*, 22, 4848-4858.
- MÅRTENSON, E. D., HANSSON, L. O., NILSSON, B., SCHOULTZ, E. V., BRAHME, E. M., RINGBORG, U. & HANSSON, J. 2001. Serum S-100B Protein as a Prognostic Marker in Malignant Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 824-831.
- MICHIELIN, O., VAN AKKOOI, A. C. J., ASCIERTO, P. A., DUMMER, R. & KEILHOLZ, U. 2019. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up &#x2020;. *Annals of Oncology*, 30, 1884-1901.
- MOCELLIN, S., ZAVAGNO, G. & NITTI, D. 2008. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 123, 2370-2376.
- MORRISON, C., PABLA, S., CONROY, J. M., NESLINE, M. K., GLENN, S. T., DRESSMAN, D., PAPANICOLAOU-SENGOS, A., BURGHER, B., ANDREAS, J., GIAMO, V., QIN, M., WANG, Y., LENZO, F. L., OMILIAN, A., BSHARA, W., ZIBELMAN, M., GHATALIA, P., DRAGNEV, K., SHIRAI, K., MADDEN, K. G., TAFE, L. J., SHAH, N., KASUGANTI, D., DE LA CRUZ-MERINO, L., ARAUJO, I., SAENGER, Y., BOGARDUS, M., VILLALONA-CALERO, M., DIAZ, Z., DAY, R., EISENBERG, M., ANDERSON, S. M., PUZANOV, I., GALLUZZI, L., GARDNER, M. & ERNSTOFF, M. S. 2018. Predicting response to checkpoint inhibitors in melanoma beyond PD-L1 and mutational burden. *J Immunother Cancer*, 6, 32.
- NARAYANAN, D. L., SALADI, R. N. & FOX, J. L. 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, 49, 978-86.
- NISHINO, M., GIOBBIE-HURDER, A., MANOS, M. P., BAILEY, N., BUCHBINDER, E. I., OTT, P. A., RAMAIYA, N. H. & HODI, F. S. 2017. Immune-Related Tumor Response Dynamics in Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab: Identifying Markers for Clinical Outcome and Treatment Decisions. *Clin Cancer Res*, 23, 4671-4679.
- OLLILA, D. W., STERN, S. L. & MORTON, D. L. 1998. Tumor doubling time: a selection factor for pulmonary resection of metastatic melanoma. *J Surg Oncol*, 69, 206-11.
- PASSARELLI, A., MANNAVOLA, F., STUCCI, L. S., TUCCI, M. & SILVESTRIS, F. 2017. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*, 8, 106132-106142.

- PATEL, S. P. & KURZROCK, R. 2015. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 14, 847-56.
- PERIC, B., ZAGAR, I., NOVAKOVIC, S., ZGAJNAR, J. & HOCEVAR, M. 2011. Role of serum S100B and PET-CT in follow-up of patients with cutaneous melanoma. *BMC Cancer*, 11, 328.
- RAEDLER, L. A. 2015. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Health Drug Benefits*, 8, 180-3.
- RASTRELLI, M., TROPEA, S., ROSSI, C. R. & ALAIBAC, M. 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28, 1005-11.
- ROBERT, C., LONG, G. V., BRADY, B., DUTRIAUX, C., MAIO, M., MORTIER, L., HASSEL, J. C., RUTKOWSKI, P., MCNEIL, C., KALINKA-WARZOCHA, E., SAVAGE, K. J., HERNBERG, M. M., LEBBÉ, C., CHARLES, J., MIHALCIOIU, C., CHIARION-SILENI, V., MAUCH, C., COGNETTI, F., ARANCE, A., SCHMIDT, H., SCHADENDORF, D., GOGAS, H., LUNDGREN-ERIKSSON, L., HORAK, C., SHARKEY, B., WAXMAN, I. M., ATKINSON, V. & ASCIERTO, P. A. 2015. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. 372, 320-330.
- ROBERT, C., THOMAS, L., BONDARENKO, I., O'DAY, S., WEBER, J., GARBE, C., LEBBE, C., BAURAIN, J.-F., TESTORI, A., GROB, J.-J., DAVIDSON, N., RICHARDS, J., MAIO, M., HAUSCHILD, A., MILLER, W. H., GASCON, P., LOTEM, M., HARMANKAYA, K., IBRAHIM, R., FRANCIS, S., CHEN, T.-T., HUMPHREY, R., HOOS, A. & WOLCHOK, J. D. 2011. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. 364, 2517-2526.
- SCHADENDORF, D., FISHER, D. E., GARBE, C., GERSHENWALD, J. E., GROB, J.-J., HALPERN, A., HERLYN, M., MARCHETTI, M. A., MCARTHUR, G., RIBAS, A., ROESCH, A. & HAUSCHILD, A. 2015. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15003.
- SCOLYER, R. A., LONG, G. V. & THOMPSON, J. F. 2011. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*, 5, 124-36.
- SEKTIOGLU, I. M., CARRETERO, R., BULBUC, N., BALD, T., TÜTING, T., RUDENSKY, A. Y. & HÄMMERLING, G. J. 2017. Basophils Promote Tumor Rejection via Chemotaxis and Infiltration of CD8<sup>+</sup> T Cells. *Cancer Research*, 77, 291.
- SIRACUSA, M. C., KIM, B. S., SPERGEL, J. M. & ARTIS, D. 2013. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 789-801; quiz 788.
- SLOOT, S., CHEN, Y. A., ZHAO, X., WEBER, J. L., BENEDICT, J. J., MULÉ, J. J., SMALLEY, K. S., WEBER, J. S., ZAGER, J. S., FORSYTH, P. A., SONDAK, V. K. & GIBNEY, G. T. 2018. Improved survival of patients with melanoma brain metastases in the era of targeted BRAF and immune checkpoint therapies. 124, 297-305.
- SPECENIER, P. 2016. Nivolumab in melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 16, 1247-1261.

- TARHINI, A. A., STUCKERT, J., LEE, S., SANDER, C. & KIRKWOOD, J. M. 2009. Prognostic significance of serum S100B protein in high-risk surgically resected melanoma patients participating in Intergroup Trial ECOG 1694. *J Clin Oncol*, 27, 38-44.
- TAWBI, H. A., FORSYTH, P. A., ALGAZI, A., HAMID, O., HODI, F. S., MOSCHOS, S. J., KHUSHALANI, N. I., LEWIS, K., LAO, C. D., POSTOW, M. A., ATKINS, M. B., ERNSTOFF, M. S., REARDON, D. A., PUZANOV, I., KUDCHADKAR, R. R., THOMAS, R. P., TARHINI, A., PAVLICK, A. C., JIANG, J., AVILA, A., DEMELO, S. & MARGOLIN, K. 2018. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med*, 379, 722-730.
- TEJERA-VAQUERIZO, A., NAGORE, E., MELÉNDEZ, J. J., LÓPEZ-NAVARRO, N., MARTORELL-CALATAYUD, A., HERRERA-ACOSTA, E., TRAVES, V., GUILLÉN, C. & HERRERA-CEBALLOS, E. 2012. Chronology of Metastasis in Cutaneous Melanoma: Growth Rate Model. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 1215-1221.
- TENTORI, L., LACAL, P. M. & GRAZIANI, G. 2013. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 656-666.
- THOMPSON, J. F., SOONG, S.-J., BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., DING, S., COIT, D. G., FLAHERTY, K. T., GIMOTTY, P. A., JOHNSON, T., JOHNSON, M. M., LEONG, S. P., ROSS, M. I., BYRD, D. R., CASCINELLI, N., COCHRAN, A. J., EGGERMONT, A. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. C., JR., MORTON, D. L. & SONDAK, V. K. 2011. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29, 2199-2205.
- VOSOUGHI, E., LEE, J. M., MILLER, J. R., NOSRATI, M., MINOR, D. R., ABENDROTH, R., LEE, J. W., ANDREWS, B. T., LENG, L. Z., WU, M., LEONG, S. P., KASHANI-SABET, M. & KIM, K. B. J. B. C. 2018. Survival and clinical outcomes of patients with melanoma brain metastasis in the era of checkpoint inhibitors and targeted therapies. 18, 490.
- WAGNER, N. B., FORSCHNER, A., LEITER, U., GARBE, C. & EIGENTLER, T. K. 2018. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies. *Br J Cancer*, 119, 339-346.
- WANG, Q., LIU, F. & LIU, L. 2017. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96, e6369.
- WATSON, M., HOLMAN, D. M. & MAGUIRE-EISEN, M. 2016. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Semin Oncol Nurs*, 32, 241-54.
- WEIDE, B., ELSÄSSER, M., BÜTTNER, P., PFLUGFELDER, A., LEITER, U., EIGENTLER, T. K., BAUER, J., WITTE, M., MEIER, F. & GARBE, C. 2012. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. *British Journal of Cancer*, 107, 422-428.

- WEIDE, B., RICHTER, S., BUTTNER, P., LEITER, U., FORSCHNER, A., BAUER, J., HELD, L., EIGENTLER, T. K., MEIER, F. & GARBE, C. 2013. Serum S100B, lactate dehydrogenase and brain metastasis are prognostic factors in patients with distant melanoma metastasis and systemic therapy. *PLoS One*, 8, e81624.
- WILLIAMS, K. A., LABIDI-GALY, S. I., TERRY, K. L., VITONIS, A. F., WELCH, W. R., GOODMAN, A. & CRAMER, D. W. 2014. Prognostic significance and predictors of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 132, 542-50.
- WILLIAMS, M. L. & PENNELLA, R. 1994. Melanoma, melanocytic nevi, and other melanoma risk factors in children. *J Pediatr*, 124, 833-45.
- WOLCHOK, J. D., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., RUTKOWSKI, P., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., WAGSTAFF, J., SCHADENDORF, D., FERRUCCI, P. F., SMYLLIE, M., DUMMER, R., HILL, A., HOGG, D., HAANEN, J., CARLINO, M. S., BECHTER, O., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., GUIDOBONI, M., MCARTHUR, G., LEBBE, C., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CEBON, J., SOSMAN, J., POSTOW, M. A., CALLAHAN, M. K., WALKER, D., ROLLIN, L., BHOORE, R., HODI, F. S. & LARKIN, J. 2017. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 377, 1345-1356.

Internetquellen:

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätshautklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Eigentler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Nikolaus Wagner, Assistenzarzt Universitätshautklinik Tübingen und Hautklinik St. Gallen.

Die Sammlung der Daten sowie die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Nikolaus Wagner durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 13.10.2020

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Eigentler, der mir ermöglicht hat, dieses Thema zu bearbeiten.

Nicht minder möchte ich mich bei Dr. Nikolaus Wagner bedanken, der die direkte Betreuung meiner Arbeit übernommen und mich mit hervorragenden Ratschlägen unterstützt hat.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht und mir immer Kraft gegeben haben.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.