

## Zusammenfassende Diskussion

Auf der Suche nach Melanom-spezifischen Antikörpern, deren erkannte Antigene möglicherweise auch für eine antigen-spezifische Immuntherapie von Belang sein könnten, wurde ein tolerisierendes Immunisierungsprotokoll entwickelt, mit dem Melanommetastasen-spezifische Antikörper generiert werden können. Hierbei wurden Mäuse zunächst mit der humanen Melanomlinie SMMU<sub>neg</sub> inokuliert, welche aus einem primären Melanom etabliert worden war. Die sich entwickelnde Antikörperantwort gegen Antigene, welche auf SMMU<sub>neg</sub> exprimiert sind, wurde durch eine Cyclophosphamidbehandlung der Tiere unterdrückt. Durch die Inokulation der Tiere mit der aus einer Metastase des gleichen Patienten generierten Zelllinie war beabsichtigt, Metastasen-spezifische Antikörper zu induzieren. Nach Fusion der Splenozyten mit Myelomzellen wurden die 15 generierten monoklonalen Antikörper hinsichtlich der Reaktivität für Melanomzellen untersucht und der mAk SM5-1 als vielversprechendster identifiziert, mit Reaktivitäten sowohl auf Kryo-konserviertem Gewebe, als auch auf Paraffin-eingebettetem Melanomgewebe. Hier zeigte sich, dass nicht nur Melanommetastasen, sondern auch Nävi und primäre Melanome mit SM5-1 reagieren. Allerdings zeichnet sich dieser mAk durch eine außerordentlich hohe Sensitivität mit einer Reaktivität bei 146/151 untersuchter Metastasen (96%) und bei 248/250 (99%) der untersuchten primären Melanome aus. Im Vergleich dazu zeigte sich für den anti-gp100 Antikörper HMB-45 nur eine Sensitivität von 83% bei Metastasen und von ebenfalls 99% bei primären Melanomen. Die Spezifität für Tumore des mAk SM5-1 lag bei 100%, da 40 verschiedene nicht-Melanom Tumore keine Reaktivität aufwiesen. Diese Ergebnisse widerspiegeln den häufigen Antigenverlust des bei Immuntherapien (z.B. bei Peptidvakzinierungen) eingesetzten gp100 Antigens<sup>37;59</sup>. Neben dem möglichen Wert für Immuntherapien kann mAk SM5-1 als ein dem HMB-45 (anti-gp100) für die Immunohistochemische Analyse von Melanom-verdächtigen Läsionen überlegenes Reagenz angesehen werden (**Anlage 1**).

Weitere häufig für spezifische Immuntherapien eingesetzte Antigene sind Tyrosinase und MART-1<sup>4;20;31;53</sup>. Beim Vergleich der Reaktivitäten auf primären Melanomen und Melanommetastasen eines MART-1-spezifischen mAks (A103), eines Tyrosinase-spezifischen mAks (T311) und des mAk SM5-1 zeigte sich zunächst, dass die Reaktivität von mAk SM5-1 für die als Ziel von Immuntherapien gewählten

Melanommetastasen mit 91.3% wesentlich höher lag als für anti-MART-1 mit 76.9% und für anti-Tyrosinase mit nur 63.3%. Dieser Antigenverlust unterstreicht mögliche Probleme bei antigen-spezifischen Melanomtherapien<sup>35</sup>. Neben einem völligen Verlust ist allerdings auch ein partieller Verlust auf Melanommetastasen von Bedeutung für ein tumor-escape, ausgedrückt durch die Prozentzahl Antigen-positiver Zellen pro Primärtumor (bzw. pro Sichtfeld des Mikroskopes). Hier zeigte sich, dass der mAk SM5-1 in 85% der Fälle mit über 50% aller Tumorzellen reagierte, während dies bei MART-1 nur in 68% und bei Tyrosinase nur bei 63% der Tumorzellen der Fall war. Bei Metastasen zeigte sich, dass in 80% aller Fälle >50% der Zellen positiv für mAk SM5-1 waren, aber nur in 58% der Fälle für MART-1 und in 48% der Fälle für Tyrosinase, womit nicht mehr als ca. die Hälfte der Tumorzellen überhaupt auf eine MART-1 bzw. Tyrosinase-spezifische Therapie in der Lage sind zu reagieren und unterstreicht, dass die Antigenexpression selbst innerhalb eines Tumors heterogen ist<sup>28</sup>. Eine Tumorprogression kann in manchen Fällen durch Antigenverlust erklären werden<sup>43</sup>. Trotz der Gegenwart von Tumorantigen-spezifischen CTLs können immunogene Tumoren durch die Entwicklung von Antigen-Verlust Varianten wachsen<sup>56</sup>. Die Expressionslevel der Proteine korrelieren ebenfalls mit einem möglichen Ansprechen auf eine Immuntherapie<sup>11</sup>. Da gezeigt werden konnte, dass eine in-vivo Immunselektion von Antigen-Verlust Varianten auch durch die suboptimale Höhe einer Antigenexpression zustanden kommen kann, wurde dieses Phänomen am Melanom untersucht und bestätigt<sup>32</sup>. Bei der semi-quantitativ erhobenen Färbeintensität wurde deutlich, dass die Expressionsstärke der untersuchten Antigene bei primären Melanomen (n=101) vergleichbar stark bis sehr stark war (67-75% der Fälle). Bei Melanommetastasen (n=243) zeigte sich nur für mAk SM5-1 eine starke bis sehr starke Expression, während dies bei MART-1 und Tyrosinase nur bei 35% bzw. bei 29% der Fälle der Fall war und somit einen weiteren Hinweis für aktives Immune-escape in der Entwicklung vom Primärtumor zur Metastase darstellt. Ein simultaner Verlust mehrere Antigene konnte gezeigt werden. Während von 101 Primärmelanomen nur in einem Fall ein gleichzeitiger Verlust von MART-1 und Tyrosinase detektiert wurde, war dies unter den 243 Metastasen mit 15.6% deutlich über der statistisch zu erwartenden Negativität von 8.4% der Fall und stellt somit einen konkordanten Antigenverlust dar, was vermuten läßt, dass diese Antigene einer gemeinsamen Kontrolle unterliegen. Der mAk SM5-1 war davon nicht betroffen, da 35 der 38 gleichzeitig für MART-1 und Tyrosinase negativen

Metastasen positiv für mAk SM5-1 waren. Dies unterstreicht die Möglichkeit, dass Patienten von multi-Epitop Vakzinen vermutlich besser profitieren könnten (**Anlage 2**).

Es konnte gezeigt werden, dass die simultane Immunisierung mit multiplen Peptiden auch multi-Epitop spezifische CD8+ T-Zell Antworten gegen Antigen-exprimierende Tumore induzieren kann und dass diese T-Zellen in der Lage sind, Tumore zu infiltrieren<sup>57</sup>. Die multi-Epitop Vakzinierung kann auch in der Lage sein, die Evolution von Escape Klonen durch Immunselektion zu reduzieren<sup>42</sup>. Vor dem Einschluß von Patienten in Immuntherapien werden oftmals Antigenexpressionsanalysen einzelner Metastasen vorgenommen. Ob von diesen Ergebnissen auf die Antigenexpression nicht untersuchter Metastasen geschlossen werden kann, wurde untersucht. Zwischen 2 und 19 synchrone oder asynchrone Melanometastasen von gesamt 28 Patienten wurden untersucht. Hier zeigte sich, dass intraindividuell von den Metastasen nur 57% für gp100, 53% für MART-1, 21% für Tyrosinase und 21% - 39% für MAGE Antigene eine homogene Expression für das jeweilige Antigen aufwiesen, aber 71% homogen waren für mAk SM5-1. Eine immer wieder auftretende Metastasenentwicklung über bis zu 4 Jahre führt zu keiner weiteren Zunahme der Heterogenität. In den Metastasensets, die ausschließlich positiv waren, zeigten sich statistisch signifikant prozentual mehr Antigen-positive Zellen innerhalb der Läsion. Entsprechend zeigten sich in Metastasensets von Patienten, die eine oder mehrere Antigen-negative Läsionen aufwiesen auch deutlich weniger positive Zellen in den übrigen Metastasen. Das gleiche Phänomen wurde für die Expressionsstärke der Antigene detektiert. Wenn eine zufällig ausgewählte Metastase beispielsweise negativ für MART-1 ist kann extrapoliert werden, dass andere, nicht untersuchte Metastasen nicht nur zu 20% negativ sind, sondern die verbliebenen 80% positiven Läsionen auch geringere Proteinlevel für das jeweilige Antigen zeigen. Antigene der Cancer Testis Antigene der MAGE Gruppe gehen nicht konkordant verloren, aber die Melanom-Differenzierungsantigene MART-1, gp100 und Tyrosinase zeigen einen statistisch hochsignifikanten gleichzeitigen und somit konkordanten Verlust ( $p < 0.0005$ ). Der mAk SM5-1 ist hier ebenfalls nicht beteiligt, d.h. die Reaktivität für mAk SM5-1 unterliegt keinem konkordanten Verlust mit Cancer Testis Antigenen oder Melanom-Differenzierungsantigenen. Ob synchrone oder asynchrone Metastasen vom selben Tumorklon stammen ist unklar, aber vieles

Fibronectin spielen für die Melanommetastasierung eine wichtige Rolle<sup>40</sup>. Auch enthält dieses von mAk SM5-1 detektierte Fibronectin mit der ED-A Region eine Form, die für Adhäsionsvorgänge wichtig ist und in der Metastasierung eine Rolle spielt<sup>9;46;47</sup>. Die ED-A Region enthaltenden Fibronectinformen sind bei transformierten Zellen sehr viel stärker exprimiert als bei normalen Zellen<sup>7</sup>. In malignen Zellen ist die Bildung von Matrixgewebe gestört und Fibronectin fehlt in den Matrixes vieler Tumorzelllinien<sup>38</sup>. Die hier gefundene CS-1 und ED-A Region gibt Melanomzellen die Fähigkeit, schnell in der Gefäßwand hängen zu bleiben und durch das umgebende Gewebe zu treten. Die Melanom-assoziierte Fibronectinform kann hier entweder alleine oder am im Kontext mit anderen Adhäsionsmolekülen wirken. Da die ED-B Region des Fibronectinmoleküls als Target für immuntherapeutische Ansätze genutzt werden kann ist es vorstellbar, dass auch die hier gefundene ED-A Form für diese Zwecke eingesetzt werden kann<sup>13;36</sup>. **(Anlage 4)**.

Eine der Möglichkeiten der Vakzinationstherapie bei Malignomen ist den Tumor selbst als Antigenquelle und Antigenträger zu nutzen. Durch die Fusion von allogenen antigen-präsentierenden, aktivierten B-Zellen mit autologen Melanomzellen wird die breitest mögliche Repräsentanz der Antigenität des Tumors mit weitgehend nicht identifizierten Tumorantigenen, einschliesslich Tumorspezifischer Mutationen erreicht. Darüber hinaus werden durch die aktivierten B-Zellen ko-stimulatorische Signale und MHC Klasse II Moleküle für die Rekrutierung und Aktivierung von T-Helfer Zellen in das System eingebracht. Die Hybridvakzine wurde den Patienten mit metastasiertem Melanom und verschiedenen Vortherapien subkutan appliziert. Zwei von sechzehn Patienten zeigten objektive Tumorregressionen, während bei weiteren fünf Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung zu verzeichnen war. Anti-Tumor Antworten wurden nur bei Patienten gesehen, die noch in der Lage waren, eine Reaktion gegen mindestens ein recall Antigen in der DTH Reaktion zu zeigen. Histologisch konnte in einer Metastase eine inflammatorische Reaktion als Zeichen einer durch die Vakzine induzierten oder medierten T-Zell Infiltration gezeigt werden. Die Nebenwirkungen waren jeweils milde mit lokalem Erythem oder kurzzeitigem Fieber. Eine lokal auftretende Vitiligo kann als Zeichen der Aktivität zytotoxischer T-Zellen mit Melanom-assoziierten Antigenen gedeutet werden. Diese ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass T-Zell

Antworten gegen allogene MHC Moleküle zusätzlich ko-stimulatorische Unterstützung für tumor-spezifische T-Zell Antworten vermitteln (**Anlage 5**).

In einer zweiten klinischen Studie wurden allogene dendritische Zellen als Fusionspartner für die Elektrofusion mit autologen Melanomzellen eingesetzt. Die bestrahlte Vakzine wurde in 4-wöchigen Abständen Patienten mit metastasiertem Melanom subkutan verabreicht. Die Patienten erhielten zwischen 3 und 25 Vakzinierungen (Durchschnitt 8). Alle für die Vakzinegeneration benutzten Metastasen exprimierten mindestens zwei der Melanomantigene gp100, Melan A/MART-1, Tyrosinase, MAGE-1 oder MAGE-3, ebenso beta2-microglobulin and TAP-1. Die Frequenzanalyse antigen-spezifischer CTLs (intrazelluläre IFN $\gamma$  Expression) vor, sowie 24 h und 48 h nach Vakzinierung, durchgeführt bei 14/17 Patienten (HLA-A1+ oder HLA-A2+) zeigte bei 11/14 Patienten Tumor-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten im peripheren Blut. Diese waren jeweils transient und bis 48 h nach Vakzinierung nachweisbar. Hierbei waren Antworten gegen jeweils 3-5 verschiedene Antigene nachzuweisen. In 149 von 375 analysierten Proben wurde eine Induktion oder Verstärkung einer Immunantwort gezeigt, bei 55/149 Patienten waren die MHC Allomorphe der DCs identisch mit denen der Patienten, in 94/149 Analysen war dies nicht der Fall. Die meisten der T-Zell Antworten waren bei prä-therapeutisch negativen Patienten schon nach 24-48 h zu sehen, was gegen die Induktion einer de novo Antwort spricht, sondern eher Ausdruck der Verstärkung einer vorhandenen Immunreaktion ist. Bei 6 Patienten setzte die T-Zell Antwort erst nach der zweiten oder dritten Booster-Injektion ein, was für eine durch die Vakzination induzierte primäre Immunantwort spricht. In 36/56 Fällen korrelierte die spezifische CTL Induktion mit der Expression des korrespondierenden Antigens der für die Vakzine verwendeten Tumorzellen. In 8 Fällen korrelierte die Antigenexpression nicht mit einer T-Zell Antwort. Klinisch reagierte ein Patient mit einer kompletten Regression kutaner Metastasen, ein weiterer Patient mit Regression kutaner Metastasen und parallelem Auftreten neuer Metastasen (MR), 6 Patienten zeigten eine unterschiedlich lange Stabilisierung (SD) der Erkrankung. Die immunologischen Antworten korreliertem in keinem Falle mit dem klinischen Ansprechen.

Bei 6 Patienten konnte der Antigenstatus des Tumors vor Vakzinierung und bei einer unter Progression resezierten Metastase verglichen werden. Es zeigten sich bei allen

Patienten klare Hinweise für Immune escape Phänomene mit Verlust von Tumor-assoziierten Antigenen, beta2-microglobulin oder TAP-1. Dies ist wahrscheinlich Ausdruck einer Selektion durch die Immunantwort gegen verschiedene Tumorantigene, wobei beachtet werden muss, dass nur die wenigen bekannten Melanomantigene untersucht werden konnten und vermutlich einige oder viele weitere Verluste unbekannter Antigene auftraten (**Anlage 6**).

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass immunogene Tumoren, wie z.B. das maligne Melanom, unter optimalen Bedingungen durch Aktivierung adaptiver und nicht-adaptiver anti-Tumor Immunantworten erfolgreich bekämpft werden könnten. Dass die Mehrheit der Tumore der Erkennung durch das Immunsystem entgeht hat vielfältigen Ursachen. Das sogenannte Tumor escape ist eine der Haupthürden, welche einer erfolgreichen Immuntherapie entgegen stehen. Man geht heute davon aus, dass das Tumor escape multifaktoriell begründet ist<sup>36</sup>. Dies umfaßt die Herunterregulation von MHC Klasse I Molekülen durch Mutationen und Defekte in der Regulation HLA Klasse I abhängiger Antigenprozessierung. Sie findet sich in vielen Tumorentitäten und verhindert die Erkennung bzw. das killing durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) und kann eine schnelle Progression mit damit verbundener schlechter Prognose erklären<sup>22</sup>. Die Herunterregulation oder der Verlust von MHC Klasse II Molekülen auf APCs kann ebenfalls eine antigenspezifische Immunantwort verhindern. Dies konnte kürzlich beispielsweise für Monozyten im peripheren Blut von Melanompatienten gezeigt werden<sup>54</sup>.

Der Verlust von Tumorantigenen stellt einen weiteren Mechanismus dar, mit dem Tumorzellen einer CTL Detektion entgehen können. Hierbei reicht das Spektrum von der Modulation der Antigenexpression bis hin zum völligen Verlust, welcher unabhängig von der MHC Klasse I Expression auftreten kann. Es gibt Hinweise, dass selbst innerhalb desselben Tumors die Antigenexpression heterogen ist, was durch die vorliegende Arbeit unterstrichen wird<sup>28</sup>. Ein Verlust von gp100 und MART-1 war assoziiert mit einer Tumorprogression<sup>11</sup> und in einem murinen P815 Mastrozytom Modell zeigte sich Tumor escape als Folge der Entwicklung stabiler Antigenverlust-Varianten<sup>56</sup>. In einem Melanom Scid-Maus Modell führte die Behandlung mit MART-1 spezifischen CD8<sup>+</sup> T Zell Klonen zur Immunselektion von Antigenverlust-Varianten, welche sich durch die suboptimale Antigenexpression entwickelten<sup>32</sup>. MART-1 Verlust und Herunterregulation des TAP-1 Genes konnte in einem Melanomrezidiv

gezeigt werden. Die Beseitigung des Antigenverlustes durch retroviralen MART-1 und bioballistischen TAP-1 Gentransfer führte erneut zur Empfindlichkeit gegenüber MART-1 spezifischen zytotoxischen T Lymphozyten<sup>33</sup>. Nicht ausreichende Ko-Stimulation für die Induktion von T-Zell Antworten kann des weiteren zur ungenügenden Immunität beitragen. Die Folge fehlender Expression Ko-stimulatorischer Signale auf Tumorzellen führt entsprechend zur Anergie von T Zellen<sup>48</sup>. Die hier dargestellte Arbeit hat ausgedehnte, z.T. konkordante Antigenverluste beim malignen Melanom beschrieben. Eine Möglichkeit wie man immuntherapeutisch auf andere als die bekannten Antigen zurückgreifen kann, ist mit dem Beispiel einer Fusionsvakzine dargestellt, welche ein weites Repertoire von Antigenen nutzt, die im Einzelnen nicht identifiziert werden müssen.

## **Abkürzungsverzeichnis**

**MDA** Melanoma differentiation antigen

**CTL** Cytotoxic T lymphocyte

**MHC** Major histocompatibility complex

**APC** Antigen presenting cell

**FasL** Fas Ligand

**LK** Lymphknoten

**WLK** Wächterlymphknoten

**WLKB** Wächterlymphknotenbiopsie

**MR** Mixed response

**DC** Dendritic cell