

3 Einleitung

Das Melanom der Aderhaut ist der häufigste maligne Tumor des Auges bei Erwachsenen. Jährlich treten ca. 6 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner auf (1). Die Diagnose wird in der Regel mittels Ophthalmoskopie und Ultraschalluntersuchung mit einer Treffsicherheit von 95% gestellt. Die Enukleation, die früher die Standardtherapie des Aderhautmelanoms darstellte, wurde in den letzten Jahrzehnten durch bulbuserhaltende Maßnahmen, wie der lokalen Brachytherapie, der chirurgischen Resektion und der Protonenbestrahlung abgelöst und muss heute seltener in ausgewählten Situationen angewendet werden. Mehrere große und gut dokumentierte klinische Serien zeigten, dass die lokalen Therapieverfahren der Enukleation bezüglich der Prognose der Patienten gleichwertig sind (2).

Obwohl durch die Entwicklung dieser modernen lokalen Therapieverfahren erhebliche Verbesserungen beim Visus- bzw. Bulbuserhalt erzielt werden konnten, hat sich das Metastasierungsrisiko und das Überleben der Patienten in den letzten Jahrzehnten nicht verändert. Etwa 35 - 40% aller Patienten mit Aderhautmelanom erkranken im Laufe der Zeit an Fernmetastasen (3). Wegen der fehlenden Lymphdrainage des Auges spielt die lymphogene Metastasierung keine Rolle. Die Metastasierung tritt hämatogen auf. Durch einen bisher ungeklärten Tropismus des Aderhautmelanoms zur Leber, ist die Leber bei mehr als 90 % der Patienten die erste klinisch manifeste und zumeist multilokuläre Metastasenlokalisation (4). Aufgrund der teilweise sehr langen Zeitintervalle zwischen Erstdiagnose des Aderhautmelanoms und des Auftretens der Lebermetastasen muss von einer frühen, hämatogenen Aussaat der Tumorzellen ausgegangen werden (3). Die Prognose des metastasierten Aderhautmelanoms ist mit einem medianen Überleben zwischen 2 und 15 Monaten nach Erstdiagnose der metastasierten Erkrankung schlecht (5 - 7).

Das Risiko der Metastasierung kann durch klinische, histopathologische und vor allem durch zytogenetische und molekulare Prognosefaktoren bestimmt werden (8). In einer retrospektiven Analyse des eigenen Krankengutes untersuchten wir die klinischen Prognosefaktoren für die Metastasierung und das Überleben. Ziel dieser Untersuchung war

es, ein Patientenkollektiv mit hohem Metastasierungsrisiko zu definieren. An diesem Patientenkollektiv soll zukünftig eine adjuvante Therapie untersucht werden, die letztlich auf eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens abzielt. Das Verständnis der Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen hat die Entwicklung von Vakzierungsstrategien ermöglicht, die auf die in vivo Induktion bzw. Expansion tumorspezifischer zytotoxischer T Lymphozyten abzielen. Um die Wirksamkeit solcher Vakzinierungsansätze beurteilen zu können, etablierte unsere Arbeitsgruppe den ELISPOT Assay, der eine direkte ex-vivo Quantifizierung von spezifischen T Lymphozyten ermöglicht. Ferner konnte gezeigt werden, dass T Lymphozyten mit Reaktivität gegen Melanomantigene reproduzierbar quantifiziert werden können. Diese Untersuchungen stellen die Basis für ein immunologisches read-out System dar, mit dem die immunologische Effizienz einer Vakzinierung in klinischen Studien direkt ex vivo analysiert werden kann. Da die Effektivität von peptidbasierten Vakzinierungstherapien bei Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko beim kutanen Melanom gezeigt werden konnte, ist diese Therapieform auch beim Hochrisiko-Aderhautmelanom von besonderem Interesse.

Im biologischen Verhalten und im Metastasierungsmuster unterscheidet sich das Aderhautmelanom wesentlich vom kutanen Melanom. Insbesondere die fehlende lymphogene Metastasierung, der Tropismus der Metastasierung zur Leber und die Unwirksamkeit von Zytostatika, wie dem Dacarbazin, welches beim metastasierten kutanen Melanom als Standardtherapie angesehen werden kann, machen deutlich, dass sich die Entwicklung medikamentöser Therapieansätze von der beim kutanen Melanom unterscheiden muss. Basierend auf in-vitro Untersuchungen zur Chemotherapie-Sensitivität konnte in einer Reihe von klinischen Phase I und II Studien die Kombination aus Gemcitabin und Treosulfan entwickelt werden. Der in-vitro beobachtete Synergismus dieser beider Substanzen konnte in einer randomisierten Phase II Studie bestätigt werden. Neben diesen systemischen Therapieansätzen wurden auch lokoregionäre Therapien zur Behandlung der disseminierten Lebermetastasierung entwickelt, deren Stellenwert zu definieren bleibt.

4 Entwicklung adjuvanter Therapieansätze bei Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko

4.1 Klinische Definition eines Hochrisikokollektivs für Metastasierung

Das Risiko, nach einer lokalen Behandlung des Aderhautmelanoms an Metastasen zu erkranken, beträgt etwa 35% (9). Da die Primärbehandlung der Aderhautmelanome in der Regel ohne Durchführung einer Biopsie mit histologischer oder molekularer Charakterisierung des Tumors erfolgt, ist die Untersuchung klinischer Prognosefaktoren für Metastasierung und Überleben von besonderem Interesse. Daher wurde in Kooperation mit der Augenklinik eine Studie durchgeführt, um an einem Patientenkollektiv mit ausreichender Nachbeobachtungszeit die bislang beschriebenen Prognosefaktoren zu vergleichen und zu validieren. Alle 271 Patienten, bei denen in den Jahren 1994 und 1995 in der Augenklinik der Charité, Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. M. H. Foerster) ein Aderhautmelanom erstdiagnostiziert wurde, wurden über mindestens 5 Jahre nachverfolgt. Es zeigte sich bei der Analyse 2001 eine Metastasierungsrate von 15.9% nach 5 Jahren. In der univariaten Analyse waren extraokuläres Tumorwachstum und eine Ziliarkörperbeteiligung mit einem signifikant schlechteren progressionsfreien Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) assoziiert. Ein Tumordurchmesser von > 14mm war ebenfalls mit einem schlechteren PFS verbunden. Die multivariate Analyse definierte die Ziliarkörperbeteiligung als einen unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben mit einer hazard-ratio von 2,4 und die Ziliarkörperbeteiligung sowie den Tumordurchmesser als unabhängigen Prognosefaktor für die Metastasierung mit einer hazard-ratio von 2,6 und 1,7. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Ziliarkörperbeteiligung und der größte Tumordurchmesser von > 14 mm als klinische Parameter dazu geeignet sind, ein Risikokollektiv zu definieren. Das extraokuläre Tumorwachstum ist selten mit einer Häufigkeit von 3,7% aller Patienten in unserer Untersuchung. Daher definiert es nur ein kleines Hochrisikokollektiv. Insgesamt kann durch die Kombination der gefundenen Faktoren ein Patientenkollektiv definiert werden, das mit einem Risiko von > 35% innerhalb von 5 Jahren Metastasen entwickelt (siehe Publikation I, S.7ff).

Publikation I

Schmittel A, Bechrakis NE, Martus P, Mutlu D, Scheibenbogen C, Bornfeld N, Foerster MH, Thiel E, Keilholz U.

Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma.

European Journal of Cancer, 40: 2389-2395 (2004)

Publikation I
Seite 2389

Publikation I
Seite 2390

Publikation I
Seite 2391

Publikation I
Seite 2392

Publikation I
Seite 2393

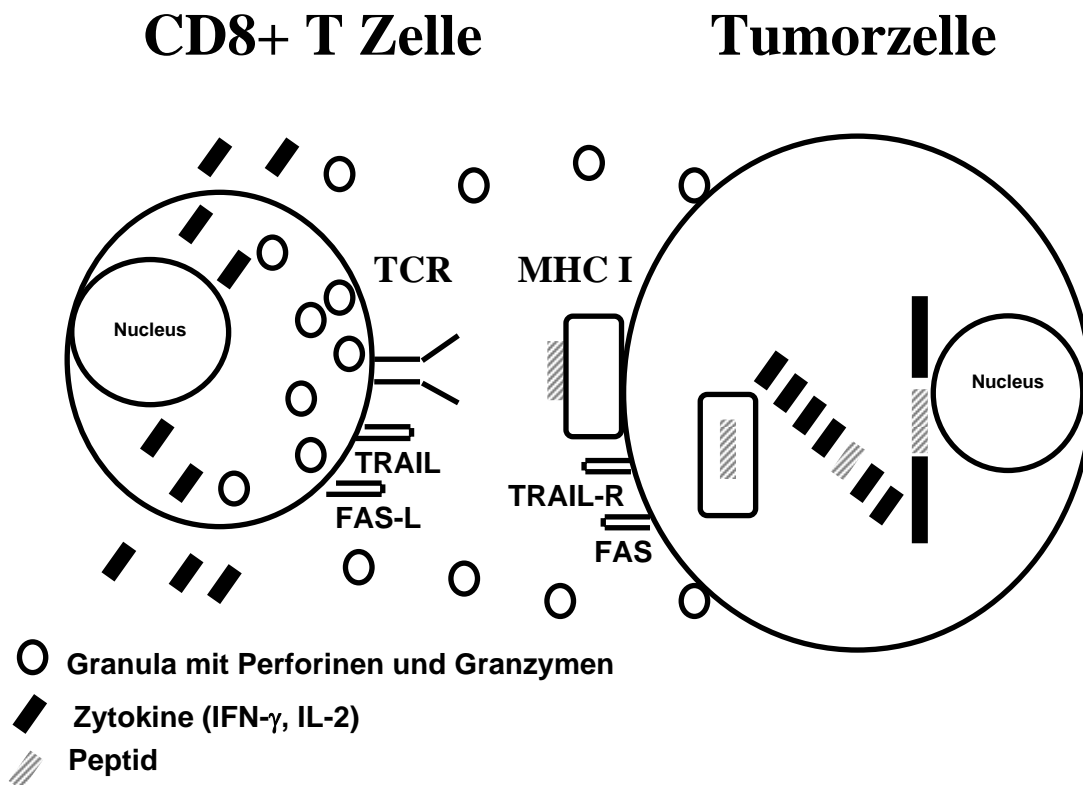
Publikation I
Seite 2394

Publikation I
Seite 2395

4.2 Evaluierung des ELISPOT Assays als Voraussetzung zur klinischen Entwicklung von Peptidvakzinierungsstrategien

Ein neues interessantes Therapiekonzept ist die tumorspezifischen Vakzinierung. Ziel ist es tumorspezifische, zytotoxische T Lymphozyten, auch T Zellen genannt, in vivo zu induzieren, die zytotoxische Effektorfunktion gegenüber Tumorzellen ausüben können. Das Verständnis der Interaktion zwischen Tumorzellen und T Lymphozyten ist in den letzten 15 Jahren deutlich gewachsen. Es konnten tumorassoziierte Antigene charakterisiert werden und eine Reihe von Tumorantigenfamilien identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigene, mutierte Antigene, virale Antigene und sog. „Cancer-testis-Antigene“ (10). Fragmente der tumorassoziierten Antigene werden in Form kleiner Peptidfragmente im Kontext von MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert. Diese Peptid / MHC Klasse I Moleküle können von CD8 positiven T Zellen über den membranständigen T-Zell Rezeptor spezifisch erkannt werden. Nach Erkennung können CD 8 positive T Zellen zytotoxische Effektorfunktion ausüben, indem sie Perforine und Granzyme aus Granula freisetzen, die direkt zytotoxisch auf die Tumorzelle wirken. Außerdem kann durch Interaktion zwischen dem Fas-Liganden und Fas bzw. TRAIL und dem TRAIL-Rezeptor Apoptose in der Tumorzelle induziert werden (siehe schematische Darstellung Abb. 1). Darüber hinaus induziert die Antigenerkennung über den T-Zell Rezeptor in der T Zelle die Bildung und Sekretion von Zytokinen. Die Zytokinproduktion wird im ELISPOT Assay genutzt, um tumorspezifische T Zellen nachzuweisen.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen CD8 positivem T Lymphozyten und der Tumorzelle über die Interaktion von T-Zell Rezeptor (TCR) und Peptid - MHC Klasse I Molekül.



Peptidbasierte Vakzinierungsstrategien versuchen durch Gabe von Peptiden und immunologischen Adjuvantien in vivo tumorspezifische T Zellen zu primen und die Frequenz der spezifischen T Zellen zu erhöhen. Durch intradermale / subkutane Gabe des Zytokins GM-CSF wird die Migration professioneller APC, insbesondere von Dendritischen Zellen (DC), in die Kutis induziert (11). Durch Einspritzen der Peptidantigene in ein mit GM-CSF vorbehandeltes Areal der Haut kann das Peptid auf leere MHC Klasse I Moleküle der DC binden. DC migrieren dann in die Lymphknoten und können dort peptidspezifische T Zellen primen und zu einer Expansion dieser T Zellen führen.

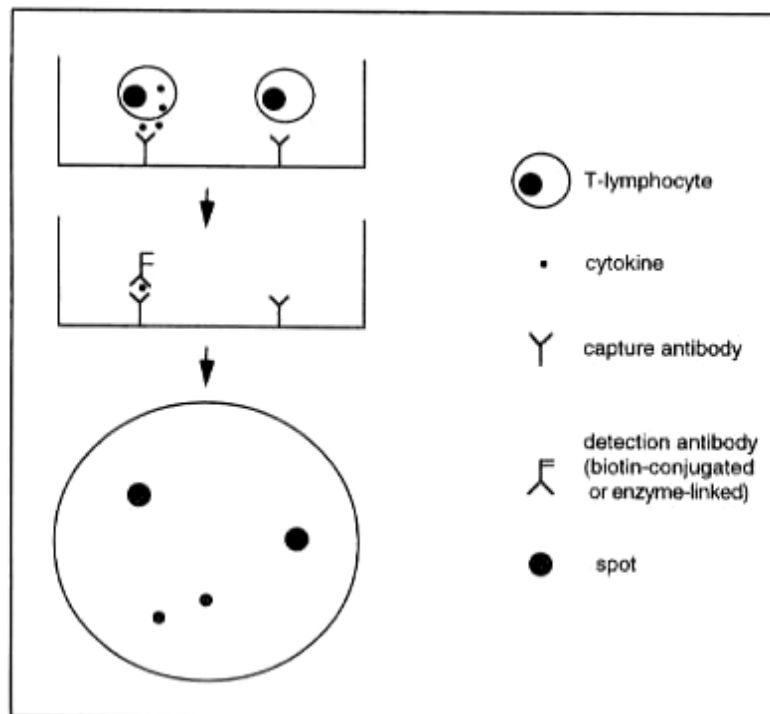
Die Vakzinierung mit Peptiden aus dem Differenzierungsantigen Tyrosinase wurde besonders bei ausgewählten Patienten mit rezidivierender Metastasierung, die chirurgisch entfernt werden konnte, untersucht. So konnte beobachtet werden, dass Patienten, die multiple subkutane und lymphatische Metastasen hatten, durch eine Vakzinierung mit

Tyrosinaseptiden nach chirurgischer Resektion mehr als 3 Jahre rezidivfrei waren (12). Diese klinischen Beobachtungen zeigen, dass peptidbasierte Vakzinierungsansätze bei Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko wirksam sind, die zum Zeitpunkt der Therapie eine sehr geringe Tumorlast haben.

Für die Entwicklung und Optimierung der peptidbasierten Vakzinierung, insbesondere bei Patienten mit geringer Tumorlast, ist die Analyse der T Zell Frequenz ex vivo von Interesse. Hierfür wurden Methoden, wie der ELISPOT Assay etabliert, der die exakte Messung der Frequenz peptidspezifischer T Zellen erlaubt.

Der ELISPOT Assay ist ein Verfahren mit dem antigenspezifische T Lymphozyten ohne vorherige in-vitro Expansion nachgewiesen werden können. Hierzu werden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut mit einem Peptidepitop inkubiert. Das Peptid bindet auf leere MHC Klasse I Moleküle. T Zellen, die das Peptid MHC Klasse I Molekül erkennen, sezernieren Zytokine, wie das Interferon- γ . Dies kann, ähnlich wie in einem ELISA, in der 96 well Platte durch einen Zytokin-spezifischen Antikörper am Boden gebunden werden und nach einem Waschschrift mit Hilfe eines zweiten Antikörpers detektiert werden. Unter dem Mikroskop kann dann an jeder Stelle der Interferon- γ Sekretion ein Spot nachgewiesen werden (Abb. 2).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des ELISPOT Assays



Bevor der ELISPOT Assay zur Quantifizierung von tumorspezifischen T Zellen im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt werden konnte, war die Evaluierung des Assays notwendig. Eine Serie von Experimenten zeigte eine hohe Sensitivität und Spezifität, sowie eine hohe Reproduzierbarkeit des Assays (siehe Publikation II, S. 20ff).

Die Anwendbarkeit des ELISPOT Assays zur Analyse der Frequenz peptidspezifischer T Zellen wurde in einem Ringversuch, der in mehreren europäischen Labors durchgeführt wurde, untersucht. Hier zeigte sich, dass die Ergebnisse in den unterschiedlichen Labors sehr gut korrelierten, so dass der ELISPOT Assay zur Analyse der Frequenz spezifischer T Zellen im Rahmen von multizentrischen klinischen Studien geeignet ist (13).

Ferner wurden die Ergebnisse der ELISPOT Analyse mit den Ergebnissen des Limiting Dilution Assays (LDA) und des Multiple Microculture Assays (MMA) verglichen. LDA und MMA untersuchen die Frequenz peptidspezifischer T-Zellen nach mehreren in-vitro Restimulationsschritten, die über 10 bis 14 Tage erfolgen. Die Frequenzbestimmung erfolgt dann durch Messung der Zytotoxizität gegenüber radioaktivmarkierten Zielzellen im

Chromium-release Assay. Die Frequenzanalyse im ELISPOT Assay korrelierte gut mit dem LDA, aber nicht mit dem MMA, so dass wegen des viel geringeren Aufwandes sich der ELISPOT Assay zum Monitoring der Frequenz peptidspezifischer T Zellen im Rahmen von klinischen Vakzinierungsstudien durchgesetzt hat (13).

Publikation II

Schmittel A, Keilholz U and Scheibenbogen C.

Evaluation of the IFN-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood.

Journal of Immunological Methods, 210: 167-174 (1997)

Publikation II
Seite 167

Publikation II
Seite 168

Publikation II
Seite 169

Publikation II
Seite 170

Publikation II
Seite 171

Publikation II
Seite 172

Publikation II
Seite 173

Publikation II
Seite 174

4.3 Anwendung des ELISPOT Assays zur Analyse spezifischer T Lymphozyten beim Melanom

Der ELISPOT Assay ist geeignet, die Frequenz spezifischer T Lymphozyten bei Patienten mit malignem Melanom zu untersuchen. Es gelang der Nachweis, dass eine kombinierte Chemo-Zytokintherapie beim Melanom Tyrosinase-Peptid spezifische T Lymphozyten induzieren kann (siehe Publikation III, S. 30ff). Die Frequenzanalyse von T Zellen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Protokollen zur Peptidvakzinierung zeigte, dass die Verwendung von GM-CSF in Kombination mit dem immunologischen Adjuvanz KLH zu einer stärkeren Induktion peptidspezifischer T Zellen führte, als die Gabe des alleinigen Peptides oder des Peptides in Kombination mit GM-CSF oder KLH als alleinige Adjuvantien (14).

Publikation III

Schmittel A, Keilholz U, Max, R, Thiel, E, Scheibenbogen C.

Induction of tyrosinase-reactive T cells by the treatment with dacarbazine, cisplatin, interferon-alpha + interleukin-2 in patients with metastatic melanoma.

International Journal of Cancer, 80, 39-43 (1999)

Publikation III
Seite 39

Publikation III
Seite 40

Publikation III
Seite 41

Publikation III
Seite 42

Publikation III
Seite 43

4.4 Adaptation des ELISPOT Assays zur Quantifizierung spezifischer T Lymphozyten gegen Proteinantigene

Proteinantigene sind ebenso wie Peptidantigene von besonderem Interesse für die klinische Entwicklung von Vakzinierungsprotokollen. Proteinantigene werden von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen internalisiert und in Peptidfragmente gespalten. Diese werden dann im Kontext von MHC Klasse II Molekülen präsentiert. Diese Peptid MHC Klasse II Komplexe werden dann von CD4 positiven T-Helferzellen erkannt. Hierdurch wird die T-Helfer Antwort gegen den Tumor zusätzlich stimuliert.

Der Nachweis von T Lymphozyten mit Spezifität gegen Proteinantigene konnte ebenfalls im ELISPOT Assay etabliert werden. Als entscheidender Schritt für den Nachweis der Proteinreaktiven T Zellen im ELISPOT Assay stellte sich ein Präinkubationschritt heraus (siehe Publikation IV, S. 37ff). Durch diese Adaptation kann der ELISPOT Assay auch für das Monitoring von proteinbasierten Vakzinierungsstudien eingesetzt werden.

Publikation IV

Schmittel A, Keilholz U, Bauer S, Kuhne U, Stevanovic S, Thiel E, Scheibenbogen C.

Application of the IFN-gamma ELISPOT assay to quantify T cell responses against proteins.

Journal of Immunological Methods, 247: 17-24 (2001)

Publikation IV
Seite 17

Publikation IV
Seite 18

Publikation IV
Seite 19

Publikation IV
Seite 20

Publikation IV
Seite 21

Publikation IV
Seite 22

Publikation IV
Seite 23

Publikation IV
Seite 24

4.5 Quantifizierung von Tumorantigen-spezifischen T Lymphozyten mit dem ELISPOT Assay

Die relativ einfache Methodik des Nachweises der Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau im ELISPOT Assay führte zu einer raschen Verbreitung dieser Technik mit einigen methodischen Variationen. Diese Variationen, sowie die Verwendung des Assays zum Nachweis von tumorspezifischen T Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit Tumorerkrankungen, wurden in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (siehe Publikation V, S. 47ff). Ferner wurden die Daten zum Monitoring der Frequenz tumorspezifischer T Zellen im Rahmen von klinischen Studien zur Tumorstimmung dargestellt.

Publikation V

Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C.

Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay.

Journal of Immunotherapy, 23: 289-295 (2000)

Publikation V
Seite 289

Publikation V
Seite 290

Publikation V
Seite 291

Publikation V
Seite 292

Publikation V
Seite 293

Publikation V
Seite 294

Publikation V
Seite 295