

---

## 8 Appendix

### 8.1 Summary

Melanoma is an important general model for cancer immunology since a large body of evidence has accumulated that the human immune system can recognise the tumour. Moreover, many of the recognised melanoma-associated antigens have been identified in the past. The characterisation of antigens that can lead to the rejection of malignant tissue is of great importance for developing new and efficacious forms of therapy.

Vaccination with autologous irradiated GM-CSF-secreting melanoma cells elicits potent, specific and long-lasting anti-tumour immunity through improved tumour antigen presentation by dendritic cells and macrophages. A clinical phase I study in patients with disseminated melanoma induced the infiltration of distant metastases by T and B cells, which resulted in tumour destruction. While prior to treatment surgically excised metastases showed no infiltrating lymphocytes, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as well as B220<sup>+</sup> B cells and IgG-secreting plasma cells were detected by immunohistochemistry in 11 out of 16 patients examined. The infiltrates were associated with substantial tumour necrosis (at least 80%), fibrosis and oedema. None of the patients displayed signs of autoimmunity. To delineate the antigenic targets of this effective immune response, we analysed a melanoma-based expression library with postvaccination serum from a long-term responding patient. The screening identified the at this time unknown melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) as a target of high-titre IgG antibodies. The caspase inhibitor ML-IAP protects cells from a wide variety of apoptotic stimuli and is overexpressed in the majority of melanomas. This is of importance since melanoma is predominantly resistant to radio- and chemotherapy. Although antibodies were present in prevaccination serum, treatment increased antibody titre and led to isotope switching to IgG4. Moreover, intratumoral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes from inflamed and necrotic metastases recognised ML-IAP in proliferation, tetramer, ELISPOT and cytotoxicity assays. Staining tissue sections

of several surgically resected metastases with a ML-IAP-specific monoclonal antibody revealed that ML-IAP was heavily expressed at the beginning of treatment. Progressing disease and lack of lymphocytic infiltrates, however, was associated with the appearance of antigen loss variants.

Preliminary data suggest that ML-IAP is overexpressed in several other types of cancer. Since ML-IAP can serve as a target for the destruction of tumour tissue by the immune system, we are interested in developing ML-IAP-based vaccines. These strategies will have to include additional antigenic components to prevent evasion of the immune system by loss of antigen expression. Moreover, it will be of great interest to study the normal biologic role of ML-IAP in more detail.

## 8.2 Zusammenfassung (Summary in German)

Das Melanom ist als Modell für Krebserkrankungen bedeutungsvoll, da zahlreiche Hinweise auf die Immunogenität dieses Tumortyps vorliegen und eine große Zahl Melanomantigene identifiziert wurden. Diese mit Melanomen assoziierten Tumorantigene werden in einem Teil der Patienten vom Immunsystem erkannt. Die Identifizierung von Tumorantigenen, die zur Abstoßung des malignen Gewebes führen können, ist von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer und effizienter Krebstherapien.

Vakzinierung mit autologen bestrahlten und GM-CSF sezernierenden Melanomzellen ruft wirksame, spezifische und lange währende Antitumorimmunität durch verbesserte Tumorantigenpräsentation von dendritischen Zellen und Makrophagen hervor. Eine klinische Phase I-Studie führte in Patienten mit metastasierendem Melanom im Spätstadium zu Infiltration des Tumorgewebes durch T- und B-Zellen, die Nekrose und Fibrose hervorriefen. Während vor Behandlungsbeginn chirurgisch entfernte Metastasen keinerlei Infiltration durch Lymphozyten aufwiesen, konnten nach Injektion des Vakzins in 11 von 16 untersuchten Patienten  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen sowie  $B220^+$  B-Zellen und IgG sezernierende Plasmazellen durch Anfärben von Tumorgewebsschnitten nachgewiesen werden. Die Infiltrate traten zusammen mit weitgehend zerstörtem Tumorgewebe (mindestens 80%), Fibrose und Ödemen auf. Keiner der Patienten zeigte Anzeichen für Autoimmunreaktionen. Um die antigenen Ziele dieser wirkungsvollen Immunantwort zu charakterisieren, analysierten wir eine auf Melanomzellen basierende Expressionsbibliothek mit dem nach Studienbeginn entnommenen Serum einer auf die Therapie ansprechenden Patientin. Unser Screening identifizierte das zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes "melanoma inhibitor of apoptosis protein" (ML-IAP) als Ziel von in hoher Konzentration im Patientenserum vorhandenen IgG-Antikörpern. Der von der humoralen Immunantwort der Patientin erkannte Caspase-Inhibitor ML-IAP schützt Zellen vor einer Vielzahl apoptotischer Stimuli und wird in der Mehrzahl von Melanomen überexprimiert. Dies ist deswegen bedeutungsvoll,

weil Melanome überwiegend resistent gegenüber Radio- und Chemotherapie sind. Obwohl Antikörper gegen ML-IAP bereits vor Behandlungsbeginn im Serum vorhanden waren, verursachte die Vakzinierung eine Konzentrationserhöhung und "isotype switching" zu IgG4. Ferner erkannten intratumorale CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten aus entzündeten und nekrotischen Metastasen ML-IAP in Proliferations-, Tetramer-, ELISPOT- und Zytotoxizitäts-Assays. Anfärbungen der Gewebeschnitte von verschiedenen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten operativ entfernten Metastasen der Patientin mit einem für ML-IAP spezifischen monoklonalen Antikörper zeigten, daß ML-IAP zu Therapiebeginn stark in infiltrierten und nekrotischen Läsionen exprimiert war. Die fortschreitende Krebserkrankung und das Fehlen von lymphozytischen Infiltraten war jedoch mit dem Aufkommen von Krebszellen ohne ML-IAP-Exprimierung assoziiert ("antigen loss").

Vorläufige Daten legen nahe, dass ML-IAP in mehreren Krebsarten überexprimiert und in einer Zahl der Fälle von der humoralen Immunantwort der Patienten erkannt wird. Da ML-IAP als Ziel für die Zerstörung von Tumorgewebe durch das Immunsystem dienen kann, sind wir daran interessiert, auf ML-IAP basierende Vakzinierungsstrategien zu entwickeln. Diese Strategien werden neben ML-IAP weitere Antigenkomponenten enthalten, um ein Unterlaufen der Immunantwort durch Verlust der Antigenexprimierung zu verhindern. Ferner ist es von großem Interesse, mehr über die biologische Normalfunktion von ML-IAP zu erfahren.

### 8.3 Curriculum Vitae

Name: Jan Christof Schmollinger

Date of birth: February 12, 1972  
Place of birth: Berlin, Germany

Address: Dana-Farber Cancer Institute  
Dept. of Medical Oncology – Room D510  
44 Binney Street  
Boston, MA 02115

Telephone: (617) 632-5054  
Facsimile: (617) 632-5167  
E-mail: jan\_schmollinger@dfci.harvard.edu

#### Education

1991-1997 MSc student, Programme in Biochemistry (with focus on immunology), Dept. of Biology, Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Free University Berlin

09/1996-04/1997 MSc student in the laboratory of Associate Professor Glenn Dranoff at the Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, USA

04/1997 MSc in Biochemistry (awarded from the Free University Berlin, “Biochemie-Diplom, Gesamtnote ‘sehr gut’”)

09/1997-09/2003 PhD student in the laboratory of Associate Professor Glenn Dranoff at the Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, USA (enrolled at the Free University Berlin)

## Research

- 09/95-12/95 Immunology research rotation in the lab of Professor Stuart F. Schlossman, Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, MA
- 1996-1997 Master's thesis in the lab of Associate Professor Glenn Dranoff, Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, MA  
Title: "Characterisation of the Humoral Response Induced by GM-CSF Based Cancer Vaccines"
- 09/1997-09/2003 PhD thesis in the lab of Associate Professor Glenn Dranoff Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School Boston, MA  
Title: "Identification of the Novel Inhibitor of Apoptosis Protein ML-IAP And Characterisation of its Role as a Melanoma Rejection Antigen"

## Publications

- 1 Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, Soiffer RJ, Jung K, Kuroda MJ, Letvin NL, Greenfield EA, Mihm M, Kutok JL, Dranoff G. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 18;100(6):3398-403.
- 2 Hodi FS, Schmollinger JC, Soiffer RJ, Salgia R, Lynch T, Ritz J, Alyea EP, Yang J, Neuberger D, Mihm M, Dranoff G. ATP6S1 elicits potent humoral responses associated with immune-mediated tumor destruction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):6919-24.
- 3 Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberger D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Dranoff G, et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13141-6.

### **Awards**

1998-1999 HSP III-Fellowship of the German Academic Exchange Service (“Deutscher Akademischer Austauschdienst”).

### **Teaching Experience**

1995-1997 Teaching assistant (“Tutor”) at the Institute of Biochemistry, Free University Berlin. Supervision of MSc students in lab courses.

### **Memberships in Professional Societies**

German Society for Biochemistry and Molecular Biology (“Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie - GBM”)

### **Extracurricular Activities**

Occasional work as a freelance writer for the Naturejobs section in “Nature” with articles covering topics from funding schemes for European researchers to translational research.

Student columnist for the Harvard Medical School’s “Focus” and “WebWeekly”.

#### 8.4 Lebenslauf (*Curriculum Vitae* in German)

Jan C. Schmollinger

September 2003

Dana-Farber Cancer Institute  
 Dept. of Medical Oncology – D510  
 44 Binney Street  
 Boston, MA 02115

Telefon: (001-617) 632-5054  
 Telefax: (001-617) 632-5167  
 E-Mail: jan\_schmollinger@dfci.harvard.edu

#### Lebenslauf

- |                        |   |
|------------------------|---|
| 12.02.1972             | Geburt als erster von zwei Söhnen von Rita und Dr. Horst Schmollinger in Berlin-Schöneberg.   |
| 1978-1984              | Besuch der Markus-Grundschule in Berlin-Steglitz.   |
| 1984-1991              | Besuch des Hermann-Ehlers-Gymnasiums in Berlin-Steglitz.  |
| Juni 1991              | Abitur mit der Durchschnittsnote 1,2.   |
| Okt. 1991 – Apr. 1997  | Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin.   |
| Januar 1995            | Vordiplom in Biochemie mit der Note "gut".  |
| Apr. 1995 - März 1997  | Tutor am Institut für Biochemie der FU Berlin.  |
| Sept. 1995 - Dez. 1995 | Praktikumsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Professor Stuart Schlossman am Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School in Boston (USA). |



- Sept. 1996 - April 1997      Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Glenn Dranoff am Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School. Titel der mit "sehr gut" bewerteten Arbeit ist "Characterisation of the Humoral Response Induced by GM-CSF-Based Cancer Vaccines". Gutachter: Prof. Burghardt Wittig (FU Berlin) und Prof. Glenn Dranoff (Harvard Medical School)
- 15.04.1997                      Biochemie-Diplom an der FU Berlin mit der Gesamtnote "sehr gut".
- Sept. 1997 – Sept. 2003      Dissertation im Labor von Professor Dranoff. Titel der Arbeit ist "Identification of the Novel Inhibitor of Apoptosis Protein ML-IAP and Characterisation of its Role as a Tumour Rejection Antigen". Gutachter: Prof. Ferdiand Hucho (FU Berlin) und Prof. Glenn Dranoff (Harvard Medical School)
- April 1998 – März 1999      HSP III-Doktorandenstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

### Veröffentlichungen

1. Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, Maecker B, Schultze JL, Hodi FS, Soiffer RJ, Jung K, Kuroda MJ, Letvin NL, Greenfield EA, Mihm M, Kutok JL, Dranoff G. The Inhibitor of Apoptosis Protein ML-IAP is a Target for Immune Mediated Tumor Destruction. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Mar 7;100(6):2298-3403.
2. Hodi FS, Schmollinger JC, Soiffer RJ, Salgia R, Lynch T, Ritz J, Alyea EP, Yang J, Neuberg D, Mihm M, Dranoff G. ATP6S1 elicits potent humoral responses associated with immune-mediated tumor destruction. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 May 14;99(10):6919-24.
3. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Cliff S, Dranoff G. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Oct 27;95(22):13141-6.

### **Tätigkeitsschwerpunkt**

Identifizierung von mit Tumoren assoziierten Antigenen und deren Charakterisierung.

### **Mitgliedschaft in wissenschaftlichen Organisationen**

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e. V. (GBM)

### **Sonstige Tätigkeiten**

Gelegentliche journalistische Tätigkeit, unter anderem als studentischer Kolumnist für "Focus" und "WebWeekly" der Harvard Medical School und als freier Mitarbeiter für den Naturejobs-Teil von "Nature".