

Arbeitsgruppe Tumorimmunologie

1. Beteiligte Wissenschaftler

Prof. Dr. Ulrich Keilholz

Dr. Antonia Busse (wissenschaftliche Mitarbeiterin Teilprojekt I-III und VII)

Susanne Döring (wissenschaftliche Mitarbeiterin, Teilprojekt IV)

Dr. Maren Knödler (wissenschaftliche Mitarbeiterin Teilprojekt I und II)

Dr. Anne Letsch (wissenschaftliche Mitarbeiterin Teilprojekt I –V, VIII und IX)

Dr. Il-Kang Na (wissenschaftliche Mitarbeiterin Teilprojekt VI)

Dr. Sebastian Ochsenreither (wissenschaftlicher Mitarbeiter Teilprojekt I-III)

Ansprechpartner

Dr. Anne Letsch

Charité Campus Benjamin Franklin

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie
und Onkologie

Hindenburgdamm 30

12200 Berlin

Tel.: 030/8445-4576 / 4714

Fax: 030/8445-4552

anne.letsch@charite.de

Genutzte Räume

Raum 202

2. Darstellung des Spektrums aller Forschungsthemen der Forschergruppe:

Der Schwerpunkt liegt auf dem Gebiet der Tumorimmunologie und der Entwicklung von Tumorstoffen in klinischen Studien und translationalen Forschungsprogrammen mit dem Ziel des Einsatzes für Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung, minimaler Resttumor und adjuvant.

Durchführung mehrerer klinischer Studien mit Vakzinierungen mit unterschiedlichen Tumorpeptiden in Kombination mit den Adjuvantien GM-CSF und dem Helferprotein KLH bei Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren und Leukämie.

- Detailliertes immunologisches Monitoring dieser Studien:
 - T-Zell-Monitoring mit funktioneller und phänotypischer Charakterisierung im peripheren Blut, Knochenmark und falls möglich im Tumorkompartiment
 - Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires Vakzine-induzierter T-Zellen
 - Analyse regulatorischer Zellelemente
 - Analyse Vakzine-induzierter Antikörper-Antworten
 - Detaillierte Analysen der Tumor-/ Leukämiezellen und Identifizierung potentieller Resistenzmechanismen
- Analyse spontaner Tumor-/ Leukämie-spezifischer T-Zell-Antworten
- Identifizierung neuer Tumor- und Leukämie-assoziiierter Antigene
- Charakterisierung von Tumor-/Leukämie- und Virus-spezifischen T-Zellantworten in verschiedenen Kompartimenten (z.B. peripheres Blut vs. Knochenmark, peripheres Blut vs. Tumor)
- Analyse von Immunproteasomen im Kontext von T-Zell-Immuntherapien

3. Darstellung der Forschungsprojekte, die in den Räumen der RCIS bearbeitet werden:

I. **Randomisierte Multizenter-Vakzinierungsstudie mit WT-1-Peptid, KLH und GM-CSF zur Remissionserhaltung bei Patienten mit AML**

Fragestellung /Hintergrund:

In einer bisherigen durch die Carreras-Stiftung geförderten klinischen Phase II-Studie konnten wir zeigen, dass eine Vakzinierung mit dem HLA-A2-bindenden WT1-Peptid bei Patienten mit AML sicher durchgeführt werden kann, trotz Präsenz der Leukämie bei den meisten Patienten eine T-Zell-Antwort induziert, und klinisch relevante Aktivität hat. Dies ist die Voraussetzung für den nächsten Schritt, die Vakzine in kontrollierter Form in der adjuvanten Behandlung bei Hochrisikopatienten zu testen und zu prüfen, ob die Rezidivrate bei Patienten mit AML durch Vakzinierung mit WT1 signifikant gesenkt werden kann. Primäres Studienziel ist innerhalb des 1. Jahres nach Chemotherapie die Rezidivrate von 50% in der Kontrollgruppe auf unter 30% in der Vakzinegruppe zu senken. Sekundäre Studienziele sind Toxizität der Behandlung, Zeit zur Progression, Gesamtüberleben, Bestimmung der Rate der Patienten mit T-Zell-Antwort, Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Immunantwort und Rezidivrate und Bedeutung erhöhter WT1-mRNA-Konzentration als prognostischer Marker. An dieser Studie werden sich 8 Zentren beteiligen und die Rekrutierung von insgesamt 122 Patienten ist in 1 1/2 Jahren geplant. Aufgrund von regulatorischen und organisatorischen Schwierigkeiten hat sich die Initiierung der Studie leider weiter verzögert und ist nun für 2012 avisiert.

II. **EU-Projekt: Vakzinierungsstudie mit WT-1-Peptid, KLH und GM-CSF bei Patienten mit soliden Tumoren:**

Fragestellung /Hintergrund:

WT1-basierte Vakzinierungen haben überraschende klinische und immunologische Effektivität bei Patienten mit AML gezeigt. WT-1 ist auch in einer Vielzahl von Karzinomen überexprimiert und spielt dort, ähnlich wie bei der AML, als Transkriptionsfaktor eine essentielle Rolle für die Proliferation von Tumorzellen. Ziele dieser Phase-IIa-Studie bei HLA-A2 positiven Patienten mit soliden Tumoren sind die Analyse der Immunologischen Effektivität, der Toxizität und der Klinischen Antwort.

Key results/Perspektiven:

Die Rekrutierung der Studie ist nach insgesamt 17 Patienten mit WT1-überexprimierenden Tumoren im Herbst 2010 beendet. Dabei zeigten sich vielversprechende klinische Resultate, bei geringer Toxizität. Die Immunologische Auswertung steht noch aus. Insgesamt rechtfertigen die Ergebnisse im Sinne eines „Proof of Principle“ weiterführende kontrollierte Therapiestudien bei einzelnen Entitäten solider Tumoren. In Planung ist derzeit eine Studie bei Patienten mit malignem Pleuramesotheliom.

III. **Identifizierung der Prävalenz möglicher Immun-Resistenzmechanismen akuter Leukämien sowie potentieller T-Zell-Defekte im Kontext von Vakzinestrategien mit dem Wilms Tumorgen-1 (WT1).**

Fragestellung /Hintergrund:

Ergebnisse einer aktuellen klinischen Phase I/II-Studie mit einem WT1.A2.1-Peptid bei Patienten mit rezidivierter AML zeigen eine hohe Immunogenität mit der Induktion spezifischer T-Zellen bei 70% der Patienten und Hinweise für klinische Effizienz. Bislang fehlen jedoch systematische Untersuchungen zu der Frage, mit welcher Effizienz Leukämieblasten von WT1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL) zerstört werden und welche Charakteristika der Blasten diese Effizienz beeinflussen. Zudem ist wenig über die potentielle Suppression der WT1-spezifischen T-Zellen durch die Leukämie bekannt. Zudem sollen Vakzine-induzierte WT1-spezifische T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Besondere Berücksichtigung sollen dabei immun-regulatorische Moleküle sowie das Vorliegen regulatorischer Zellelemente und deren potentiell unterschiedliche Ausprägung im PB und KM finden.

Key results/Perspektiven:

Die Auswertungen der umfangreichen Analysen sind abgeschlossen, so dass in Kürze ein Manuskript zu den relevanten Resistenzmechanismen vorliegen sollte.

IV. Entwicklung einer WT1-Vakzine bei Patienten mit HCCFragestellung /Hintergrund:

Einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) sowohl in der therapeutischen, als auch potentiell in der prophylaktischen Situation, stellt die Immuntherapie dar. Ein mögliches Target-Antigen dafür ist WT1, der als Transkriptionsfaktor im fetalen Lebergewebe exprimiert ist, allerdings nicht im Lebergewebe von Erwachsenen. Bei chronischen Lebererkrankungen ist WT1 re-exprimiert und mit der Progression dieser Erkrankungen assoziiert. Gleichzeitig ist bei WT1-Expression die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Hepato-Karzinogenese höher und beim HCC ist eine erhöhte WT1-Expression mit größerer Verdopplungszeit des HCC und der Höhe des T-Stadiums assoziiert. Angesichts der möglichen funktionellen Relevanz von WT1 für die Progression von chronischen Lebererkrankungen und des HCC soll in diesem Projekt die Eignung von WT1 als Zielstruktur für immuntherapeutische Ansätze, insbesondere unter Berücksichtigung potentiell limitierender immunsuppressiver Mechanismen beim HCC geprüft werden.

Key results/Perspektiven:

Im ersten Schritt konnten spontane WT1-spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit HCC und zu einem kleineren Anteil auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis und Leberzirrhose nachgewiesen werden. Diese Daten unterstützen die Immunogenität von WT1 beim HCC und dessen potentiell Nutzbarkeit als Antigen für immuntherapeutische Ansätze beim HCC.

V. Korrelation zwischen Eisenstatus und Immunstatus bei Patienten mit Myelodysplastischem SyndromFragestellung /Hintergrund:

Eisenüberladung ist ein häufiges Problem bei Patienten mit MDS. Zahlreiche Untersuchungen legen nahe, dass der Eisenstoffwechsel und insbesondere eine Eisenüberladung signifikante immunmodulatorische Effekte aufweist und eine wichtige Rolle für eine insuffiziente Infektabwehr spielt. Die Immunmodulation scheint dabei neben der zellulären und der humoralen Immunabwehr auch das Monozyten/Makrophagen-System und das Komplementsystem zu betreffen. Bei Patienten nach allogener Stammzell-Transplantation konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohem Serum-Ferritin vor der Transplantation ein signifikant höheres Risiko hatten an einer Infektion zu versterben oder ein Organversagen zu entwickeln. Bei Patienten mit MDS fehlen bisher systematische Analysen bezüglich des Immunstatus in Korrelation zum Krankheits- und/oder Therapieassoziiertem Eisenstatus und einer damit potentiell einhergehenden Infektneigung. Weiterhin fehlen Analysen bezüglich des Einflusses einer Eisenchelation auf den Immunstatus von Patienten mit MDS. Ziel dieser Untersuchung ist daher die Evaluation einer möglichen Korrelation zwischen Eisenüberladung und Immundefizienz bei Patienten mit MDS, sowie die Evaluation potentieller immunmodulatorischer Effekte einer Eisenchelation bei Patienten mit MDS.

VI. In vivo Bildgebung zeitlich-örtlicher, spezifischer T-Zellaktivierung und T-Zellmigration zur Evaluation und Entwicklung verbesserter Tumortherapien.Fragestellung /Hintergrund:

Die Effizienz der Antigen-spezifischen T-Zelltherapie ist durch ein Fehlen an Langzeiteffekten und eine insuffiziente Infiltration der transferierten T-Zellen in den Tumor limitiert. Wir entwickelten eine Methode, die eine Click-beetle Luziferase zur Erfassung der NFAT Aktivierung mit einer konstitutiven Luziferase kombiniert, um über nicht-invasive Bildgebung gleichzeitig die Migration und Aktivierung von T-Zellen in vivo darzustellen. An Hand eines Tiermodel mit H-Y T-Zellrezeptor (TCR) transgenen (tg) T-Zellen soll mittels in vivo Bildgebung über Biolumineszenz die Erfassung von Migrations- und Aktivierungsmuster im Verlauf ermöglicht werden. Durch das Modell soll die Kinetik von Infiltration und Funktionalität tumor-spezifischer T-Zellen in unterschiedlichen Therapiekombinationen evaluieren, und neue Therapieansätze in ihrer Effektivität getestet werden.

VII. Prozessierung WT1-assoziierte Klasse-I Epitope und Einfluss inflammatorischer Zytokine auf deren Antigenität und Präsentation.

Das Projekt soll in Kooperation mit dem Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel durchgeführt und ist derzeit in Planung

VIII. Immunomodulatory effects of 5-azacytidine in Acute myeloid leukemia

Das Projekt ist derzeit in Planung

IX. Weitere Projekte als Kooperationspartner:

- I. Adoptive WT1-gerichtete T-Zell Therapie der AML, Frau Prof. Scheibenbogen (Med. Immunologie, Charité CCM), Kooperationspartner: Letsch, Uharek (Häm/Onk, CBF), Reinke (Nephrologie, CVK) gefördert durch José Carreras Leukämie-Stiftung,
- II. Stem cell-like memory T cells in bone marrow, Frau Prof. Scheibenbogen (Med. Immunologie, Charité CCM), Kooperationspartner: Letsch, (Häm/Onk, CBF), Reinke (Nephrologie, CVK), Skurk (Kardiologie, CBF) gefördert durch BCRT, Berlin

4. Förderung der Arbeiten durch:

- I. Deutsche José-Carreras-Leukämie-Stiftung
- II. EU-Projekt „Cancer Immunology and Immunotherapy“
Drittmittelantrag für potentielle Folgestudie in Vorbereitung
- III. Rahel-Hirsch-Habilitations-Stipendium der Charité, Stipendium der Sonnenfeld-Stiftung (D. Stather)
- IV. Drittmittelantrag für potentielle Folgestudie in Vorbereitung
- V. Novartis Pharma GmbH
- VI. DFG, ECRC
- VII. Drittmittelförderung beantragt
- VIII. Drittmittelförderung beantragt

5. Kooperationen:

1. AG Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen, Med. Immunologie, Charité CCM
2. AG Prof. van der Bruggen, Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel
3. AG Prof. Greenberg, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA
4. Prof. Dr. Rajan Somasundaram, PD Dr. Katja Klugewitz, Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, CBF
5. Dr. Daniel Seehofer, Dr. Andreas Pascher, Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin
6. AG. PD Dr. Andreas Thiel, DRFZ
7. AG Dr. Jens Geginat, DRFZ
8. AG PD. Dr. Ralf Ignatius, Institut für Tropenmedizin, Berlin
9. Prof. Stevanovic, und Prof. Rammensee, Tübingen
10. Prof. Haruo Sugiyama, Universität von Osaka, Japan

Publikationen (Auswahl)

	Impact Faktor (ISI)
<u>Ochsenreither S</u> , Fusi A, Geikowski A, Stather D, <u>Busse A</u> , Stroux A, <u>Letsch A</u> , <u>Keilholz U</u> . Wilms' tumor protein 1 (WT1) peptide vaccination in AML patients: predominant TCR CDR3 β sequence associated with remission in one patient is detectable in other vaccinated patients. Cancer Immunol Immunother. 2011 Sep	4,7
<u>Ochsenreither S</u> , Fusi A, <u>Busse A</u> , Bauer S, Scheibenbogen C, Stather D, Thiel E, <u>Keilholz U</u> , <u>Letsch A</u> . "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow." J Immunother. 2011 Jan;34(1):85-91	3,8
Busse A, <u>Letsch A</u> , Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, <u>Keilholz U</u> (2010) Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. J Transl Med. 21;8:5	3,4
Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, <u>Letsch A</u> , Haase D, Thiel E, Scheibenbogen C, <u>Keilholz U</u> (2010) Long term presence of a single predominant tyrosinase-specific T-cell clone associated with disease control in a patient with metastatic melanoma. Int J Cancer. 126:2497-502.	4,7
<u>Keilholz U*</u> , <u>Letsch A*</u> , Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, Hofmann WK, Uharek L, Thiel E, Scheibenbogen C (2009) A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. Blood. 113:6541-8	10,5
Na IK, Busse A, Scheibenbogen C, Ghadjar P, Coupland SE, <u>Letsch A</u> , Loddenkemper C, Stroux A, Bauer S, Thiel E, <u>Keilholz U</u> (2008). Identification of truncated chemokine receptor 7 in human colorectal cancer unable to localize to the cell surface and unreactive to external ligands. Int J Cancer 123:1565-72	4,6
Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Salès F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, <u>Keilholz U</u> ; for the EORTC Melanoma Group (2008). Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. Lancet 12;372:117-126	28,6
<u>Letsch A</u> , <u>Keilholz U</u> , Fluck M, Nagorsen D, Asemissen AM, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C (2005). Peptide vaccination after repeated resection of metastases can induce a prolonged relapse-free interval in melanoma patients. Int J Cancer Jan 114:936-941	4,4