

## Die Immunologischen Aspekte der Therapie des Malignen Melanoms mit selektiven BRAF-Inhibitoren

Dr. med. Bastian Schilling

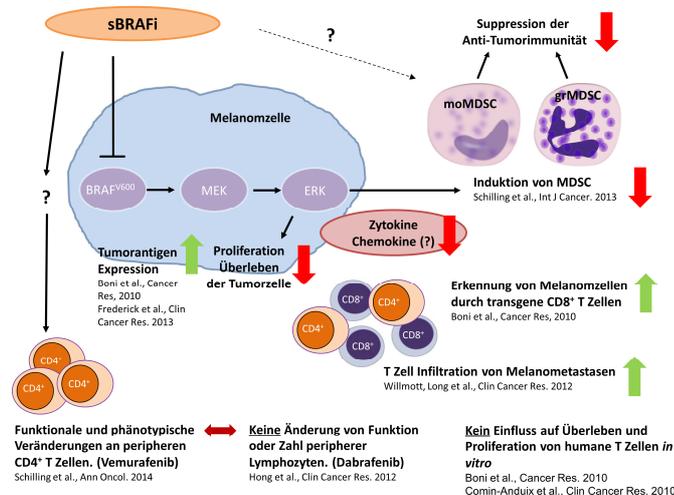
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Essen, Westdeutsches Tumorzentrum, Universität Duisburg-Essen

Das Maligne Melanom ist der Hauttumor mit dem höchsten Metastasierungsrisiko und somit der höchsten Mortalität. Die 5-Jahres Überlebensrate bei Fernmetastasen liegt aktuell bei 15,2% (1). Auch wenn das Überleben der betroffenen Patienten sich in den letzten Jahren dank verbesserter Supportivtherapie und neuen Therapeutika verlängert hat, ist das metastasierte Melanom weiterhin nur selten heilbar.

Die systemische Behandlung des fortgeschrittenen Malignen Melanoms stützt sich zurzeit vor allem auf Immun- und zielgerichtete Therapeutika (2). Zielgerichtete Substanzen hemmen dabei hauptsächlich den MAPK-Signalweg, in dem sich im Malignen Melanom oft aktivierende Mutationen finden. Die häufigste Mutation betrifft dabei das Codon 600 (BRAF<sup>V600</sup>). Findet sich eine solche Mutation, stehen zwei in Deutschland als Monotherapie zugelassene selektive BRAF-Inhibitoren (sBRAFi) zur Verfügung: Vemurafenib und Dabrafenib. Mit Ansprechraten über 70% führen diese Medikamente oft zu beeindruckenden Tumorregression. Das Ansprechen ist zeitlich jedoch im Durchschnitt auf 6 Monate begrenzt. Immuntherapeutika wie Ipilimumab, ein anti-CTLA4-Antikörper, haben hingegen niedrigere Ansprechraten, können jedoch für Jahre eine Tumorkontrolle in einer kleinen Patientengruppe erreichen. Es ist daher postuliert worden, sBRAFi mit Immuntherapien zu kombinieren um die Nachteile der Einzelsubstanzen zu überwinden (3). Dazu ist es jedoch erforderlich, die Wirkungen von sBRAFi auf das humane Immunsystem zu kennen.

Lymphozyten, vor allem T Zellen, sind die wesentlichen Effektorzellen der anti-Tumorimmunität im Malignen Melanom. Den Lymphozyten stehen jedoch myeloide Zellen als ein immunsuppressiver Faktor in Tumorpatienten gegenüber. Dabei sind myeloid-derived suppressor cells (MDSC) eine wesentliche Population, die sich durch einen heterogenen Phänotypen auszeichnen und über verschiedene Mechanismen die anti-Tumorimmunität unterdrücken. In einer letztes Jahr von uns publizierten Arbeit, die von der Deutschen Gesellschaft für Immun- und Targeted Therapie e.V. (DGFIT) mit dem Clinical Science Award 2013 prämiert wurde, wurden MDSC in Melanompatienten näher definiert und der Effekt des sBRAFi Vemurafenib auf diese Zellen erstmals untersucht (4). Zunächst konnten zwei phänotypisch distinkte MDSC-Subpopulationen in Melanompatienten definiert werden: Bereits bekannte monozytäre MDSC (moMDSC) als CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>dim</sup>CD66b<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Arginase1<sup>-</sup>CD16<sup>-/low</sup> und eine bisher nicht in Melanompatienten beschriebene Subpopulation von granulozytären MDSC (grMDSC) als CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Arginase1<sup>+</sup>CD16<sup>-/low</sup>. Beide Subpopulationen unterdrücken *ex vivo* autologe T Zellen unabhängig voneinander. Die Analyse von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) eines größeren Melanompatientenkollektiv erbrachte dann, dass ausschließlich Patienten mit vorhandenen Fernmetastasen eine Akkumulation beider Subpopulationen im Vergleich zu gesunden Spendern und Patienten in früheren Tumorstadien zeigen. Interessanterweise findet sich keine erhöhte MDSC-Frequenz in Patienten, die zuvor Fernmetastasen hatten aber zum Zeitpunkt der Blutentnahme tumorfrei waren, so dass beide Subpopulationen mit der Erkrankung assoziiert sind. Da sBRAFi bei den meisten Patienten zu einer Tumorregression führen, wurden dann PBMC von Patienten vor und unter

Vemurafenib-Therapie untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass bei Tumorregression die Frequenz von moMDSC und grMDSC sinkt. Bei Progress der Erkrankung kam es dann zum erneuten Ansteigen der MDSC-Frequenzen. In weiterführenden *in vitro* Studien konnten wir dann zeigen, dass Melanomzellen, die mit Vemurafenib behandelt wurden, die Fähigkeit zur Induktion von moMDSC verlieren. Vemurafenib selbst hatte keinen Einfluss auf die MDSC-Induktion, so dass analog zu den Ergebnissen an Patientenproben eine indirekte Reduktion der Induktion über Tumorzellhemmung anzunehmen ist. Die durch Vemurafenib häufig zu erreichende, massive Reduktion der Tumorlast und die damit verbundene verringerte MDSC-Frequenz könnte jedoch ein vielversprechendes Zeitfenster für den Beginn einer Immuntherapie sein.



Für den Erfolg einer solchen Kombination von sBRAFi und Immuntherapien sind Lymphozyten als Effektorzellen der anti-Tumorimmunität von entscheidender Bedeutung. In ersten Arbeiten zu den immunologischen Aspekten der sBRAFi-Therapie zeigte sich, dass diese die Funktionalität von humanen Lymphozyten *in vitro* nicht negativ beeinflussen und die Erkennung von mit sBRAFi behandelten Melanomzelllinien erhöhen (5, 6). *In situ* konnte dann gezeigt werden, dass die Therapie mit sBRAFi die Infiltration von Melanometastasen durch T Zellen steigert und die Antigenexpression durch die Tumorzellen erhöht (7, 8). Zur Anzahl und Funktionalität von Lymphozyten unter sBRAFi Therapie gibt es jedoch nur wenige Daten aus Patienten, die Dabrafenib erhalten haben. Hong et. al. konnten in ihrer Untersuchung keinen Einfluss auf die Anzahl und Funktionalität von peripheren Lymphozyten *ex vivo* zeigen (9). In einer vergleichenden Studie konnte von uns in Kooperation mit zahlreichen deutschsprachigen Hauttumorzentren nun jedoch gezeigt werden, dass Dabrafenib und Vemurafenib sich in ihrem Einfluss auf periphere Lymphozyten in Melanompatienten deutlich unterscheiden (10). Es konnte gezeigt werden, dass Vemurafenib aber nicht Dabrafenib die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten signifikant senkt. Dabei fand sich ein selektiver Verlust von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die sich zusätzlich in ihrer Zusammensetzung veränderten. Unter Therapie mit Vemurafenib findet sich eine signifikante Reduktion des Anteils von central memory Zellen während der Anteil naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen ansteigt. Auch fand sich ein Einfluss von Vemurafenib auf die Funktion dieser Zellen: CD4<sup>+</sup> T Zellen, die aus Proben isoliert wurden, die unter Therapie mit Vemurafenib gewonnen wurden, produzierten nach Stimulation signifikant geringere Mengen IFN- $\gamma$  und IL-9 als solche, die aus vor Therapiebeginn gewonnenen Proben

isoliert wurden. Sowohl IFN- $\gamma$  und IL-9 sind jedoch Zytokine, die für die anti-Tumorimmunität durch T Zellen wichtig sind. Es ist also zu fordern, dass sBRAFi individuell auf ihre immunmodulatorischen Effekte untersucht werden sollten, insbesondere dann, wenn Kombinationen mit Immuntherapien geplant sind.

In unseren Arbeiten konnten wir neue Daten zu den immunologischen Aspekten der Therapie mit sBRAFi gewinnen, die wie in Abbildung 1 gezeigt bereits vorhandene Erkenntnisse ergänzen. In einer von der DGFIT mit dem Clinical Science Award 2013 ausgezeichneten Arbeit konnten wir den Effekt von Vemurafenib auf humane MDSC erstmals beschreiben. In einem weiterführenden Projekt gelang es zudem, die erste komparative Studie zweier sBRAFi durchzuführen und wesentliche Unterschiede in den immunmodulatorischen Eigenschaften von Vemurafenib und Dabrafenib aufzuzeigen. Wir sind überzeugt, dass unsere translationalen Erkenntnisse für das Gelingen zukünftiger, neuer Kombinationen von zielgerichteten- und Immuntherapien für das fortgeschrittene Maligne Melanom von klinischer Relevanz sind.

## Literatur

1. Siegel, R., C. DeSantis, K. Virgo, K. Stein, A. Mariotto, T. Smith, D. Cooper, T. Gansler, C. Lerro, S. Fedewa, C. Lin, C. Leach, R. S. Cannady, H. Cho, S. Scoppa, M. Hachey, R. Kirch, A. Jemal, and E. Ward. 2012. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 62: 220-241.
2. Schadendorf, D., and A. Hauschild. 2014. Melanoma in 2013: Melanoma-the run of success continues. *Nature reviews. Clinical oncology* 11: 75-76.
3. Ribas, A., and J. D. Wolchok. 2013. Combining cancer immunotherapy and targeted therapy. *Curr Opin Immunol* 25: 291-296.
4. Schilling, B., A. Sucker, K. Griewank, F. Zhao, B. Weide, A. Gorgens, B. Giebel, D. Schadendorf, and A. Paschen. 2013. Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *Int J Cancer* 133: 1653-1663.
5. Comin-Anduix, B., T. Chodon, H. Sazegar, D. Matsunaga, S. Mock, J. Jalil, H. Escuin-Ordinas, B. Chmielowski, R. C. Koya, and A. Ribas. 2010. The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. *Clin Cancer Res* 16: 6040-6048.
6. Boni, A., A. P. Cogdill, P. Dang, D. Udayakumar, C. N. Njauw, C. M. Sloss, C. R. Ferrone, K. T. Flaherty, D. P. Lawrence, D. E. Fisher, H. Tsao, and J. A. Wargo. 2010. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res* 70: 5213-5219.
7. Frederick, D. T., A. Piris, A. P. Cogdill, Z. A. Cooper, C. Lezcano, C. R. Ferrone, D. Mitra, A. Boni, L. P. Newton, C. Liu, W. Peng, R. J. Sullivan, D. P. Lawrence, F. S. Hodi, W. W. Overwijk, G. Lizee, G. F. Murphy, P. Hwu, K. T. Flaherty, D. E. Fisher, and J. A. Wargo. 2013. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 19: 1225-1231.
8. Wilmott, J. S., G. V. Long, J. R. Howle, L. E. Haydu, R. N. Sharma, J. F. Thompson, R. F. Kefford, P. Hersey, and R. A. Scolyer. 2012. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 18: 1386-1394.
9. Hong, D. S., L. Vence, G. Falchook, L. G. Radvanyi, C. Liu, V. Goodman, J. J. Legos, S. Blackman, A. Scarmadio, R. Kurzrock, G. Lizee, and P. Hwu. 2012. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted

inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. *Clin Cancer Res* 18: 2326-2335.

10. Schilling, B., W. Sondermann, F. Zhao, K. G. Griewank, E. Livingstone, A. Sucker, H. Zelba, B. Weide, U. Trefzer, T. Wilhelm, C. Loquai, C. Berking, J. Hassel, K. C. Kahler, J. Utikal, P. Al Ghazal, R. Gutzmer, S. M. Goldinger, L. Zimmer, A. Paschen, U. Hillen, D. Schadendorf, and DeCog. 2014. Differential influence of vemurafenib and dabrafenib on patients' lymphocytes despite similar clinical efficacy in melanoma. *Ann Oncol* 25: 747-753.