

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm  
B I O L O G I E

**Förderkennzeichen:**

01GU0804

**Forschungsvorhaben:**

Verbundprojekt: Immuntherapie primärer maligner Lebertumoren

**Teilprojekt 2**

HLA-Ligandomanalyse und GMP-Produktion

**Zuwendungsempfänger:**

Eberhard Karls Universität Tübingen  
Interfakultäres Institut für Zellbiologie  
Abteilung Immunologie  
Auf der Morgenstelle 15  
72076 Tübingen

**Projektleitung:**

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

**Laufzeit:**

01.08.2009 bis 31.07.2012

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01GU0804 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegen bei den Autoren".

## **Schlussbericht zum Teilprojekt 2 des Projektes:**

### **IndividualLiver – Immuntherapie primärer maligner Lebertumoren (BMBF-Projekt: FKZ 01GU0804)**

**Autoren: Prof. Dr. Stefan Stevanović, Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee**

#### **I.1. Aufgabenstellung:**

Dieses Teilprojekt war mit der HLA-Ligandenidentifikation und GMP-Produktion von Impfpeptiden betraut. Es sollten sowohl MHC-Klasse I als auch MHC-Klasse II Liganden isoliert, identifiziert und verifiziert werden. Dies bezieht sich sowohl auf tumorassoziierte als auch auf tumorspezifische oder mutierte MHC-Liganden. Ebenfalls sollten patientenspezifische Impfcocktails formuliert und unter GMP-Bedingungen hergestellt werden.

#### **I.2. Voraussetzungen:**

Die Voraussetzungen für die HLA-Ligandenextraktion sind erfüllt. Die Extraktion wird nach einem etablierten Protokoll durchgeführt. Analyse und Auswertung der Proben erfolgt ebenfalls nach bereits bestehenden Vorgehensweisen. Die Voraussetzungen für die GMP-Produktion der Peptid-Impfcocktails sind vorhanden. Ein GMP-Zertifikat nach § 64 AMG wurde im März 2012 erhalten, eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG wurde im Juni 2012 beantragt.

#### **I.3. Planung und Ablauf:**

Jeweils Tumor- und Normalgewebe von Leberkrebspatienten wird von TP3 erhalten. Die HLA-Liganden werden standardisiert nach einem etablierten Protokoll aus den Patientenproben isoliert und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Die Analyse im Massenspektrometer der HLA-Liganden und anschließende computergestützte automatisierte Auswertung der Daten erfolgt unter Zuhilfenahme der erhobenen NGS-Daten von TP1. Nach verschiedenen Validierungsschritten der möglichen Impfpeptide wird ein Impfcocktail zusammengestellt und unter GMP-Bedingungen hergestellt.

#### **I.4. Wissenschaftlicher/technischer Stand:**

Die Isolation der HLA-Liganden wird durch eine Immunoaffinitätschromatografie erreicht. Dabei werden HLA-spezifische Antikörper benutzt welche in der Lage sind HLA samt gebundenem Liganden zu binden. Nach Elution der Liganden werden diese für die LC-MS-Messungen vorbereitet. Die Messung selbst besteht aus einer RP-nanoUHPLC (Dionex Ultimate 3000) Auftrennung der Peptide und die anschließende direkt gekoppelte Analyse der Liganden in einem Tandem-Massenspektrometer (Thermo LTQ Orbitrap XL). Auf Grundlage der von TP1 erhobenen DNA und RNA NGS-Daten wird eine Patienten individuelle Datenbank für den Abgleich mit den MS-Daten erzeugt. Diese Datenbank enthält unter anderem die Aminosäuresequenzen, die aus den detektierten genomischen Mutationen resultieren. Die auf diese Weise identifizierten Peptidsequenzen werden umfangreich validiert. Daraufhin wird eine Auswahl für einen Impfcocktail zusammengestellt und unter GMP-Bedingungen hergestellt.

### **I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:**

#### **Teilprojekt 1:**

Prof. Olaf Riess, Abt. Medizinische Genetik, Universität Tübingen (Genomanalyse)

#### **Teilprojekt 2:**

Prof. Hans-Georg Rammensee, Abt. Immunologie, Universität Tübingen (Peptidomanalyse)

#### **Teilprojekt 3:**

Prof. Falko Fend, Abt. Pathologie, Universität Tübingen (Biomarker)

Prof. Alfred Königsrainer, Klinik für Chirurgie, Universität Tübingen (Gewebe, später Studienzentrum)

### **II.1. Ergebnisse:**

Während des Projektzeitraums wurden die Proben (je Tumor- und Normalgewebe) von sieben Patienten erfolgreich untersucht. Insgesamt wurden elf Probenpaare von TP3 zur HLA-Ligandenextraktion bereitgestellt. Einige dieser Proben lieferten jedoch keine auswertbaren Ergebnisse, da der Anteil von gesundem oder nekrotischem Gewebe in den Tumorproben zu hoch war oder die Probenmasse zu gering. Für sechs der sieben Probenpaare waren die erzielten Peptididentifikationen (PSMs) äußerst zufriedenstellend. Dies ist unter anderem dem enormen technischen Fortschritt im letzten Jahr in unserer Arbeitsgruppe zu verdanken. Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl an Peptididentifikationen in den verschiedenen Proben.

Patient	PSMs Normalgewebe	PSMs Tumorgewebe	PSMs Gesamt
HCC0008	6729	5210	11939
HCC0009	19240	3822	23062
HCC0013	6468	8163	14631
HCC0014	29	31	60
HCC0017	1450	3133	4583
HCC0020	3751	284	4035
HCC0021	13144	31203	44347

Die Suche nach Peptidliganden, die exklusiv auf Tumorgewebe identifiziert wurden, verlief erfolgreich. Durch den Vergleich des Tumor- mit dem Normalgewebe konnten weit über 5000 Liganden ausschließlich auf malignem Gewebe nachgewiesen werden.

Die von TP1 ermittelten Mutationen in DNA und RNA wurden algorithmisch in Aminosäuresequenzen übersetzt und daraus eine patientenspezifische Datenbank für die Suche nach mutierten HLA-Liganden erstellt. Diese Datenbanken bilden die Grundlage für eine automatisierte Durchsuchung der aufgenommenen LC-MS-Messungen nach Massenspektren, welche von Peptiden herrühren, die durch exonische Mutationen entstanden sind. Auf diese Weise identifizierte TSA-Kandidaten müssen aufwendig verifiziert werden, da man ausschließen muss, dass es sich bei dem gefundenen Spektrum um ein von einem wildtypischen- oder SNP-Peptid stammendes Spektrum handelt. Bisher konnte noch kein Peptidkandidat (tumorspezifisch mutiertes Peptid) erfolgreich bestätigt werden. Die auf diese Weise identifizierten SNP-Peptide zeigen jedoch die prinzipielle Machbarkeit der Identifikation von Neo-Epitopen mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens.

## **II.2. Positionen:**

Die Mittel in TP02 wurden für Personalmittel (Aufarbeitung der Gewebeproben, massenspektroskopische Untersuchungen, Peptidsynthese, etc) und für entsprechende Sachmittel projektspezifisch verwendet.

## **II.3. Notwendigkeit:**

Die Suche nach Tumor-assoziierten-Peptidliganden, als auch nach patienten- und tumorspezifischen mutierten HLA-Peptiden ist Voraussetzung für die Identifikation von Impfpeptiden, die bei peptidbasierten immuntherapeutischen Ansätzen verwendet werden können (individualisierte Immunisierung gegen Krebsantigene). Dies können HLA-Liganden sein, die sowohl von MHC-Klasse I als auch von MHC-Klasse II präsentiert werden. Es wurden zahlreiche tumorassoziierte Antigene identifiziert. Um Peptidliganden zu finden, die von exonischen Mutationen herrühren, müssen die NGS-Daten von TP1 durch bioinformatische Vorgehensweisen bearbeitet werden. Auf diese Weise wird eine Datenbank erstellt, mit der es möglich ist, die massenspektroskopisch aufgenommenen Fragmentspektren zu durchsuchen. Ein ausgedehnter Validierungsprozess geht einer Auswahl von möglichen Impfpeptiden und GMP-Produktion selbiger voraus.

## **II.4. Nutzen:**

Die gewonnenen Ergebnisse als auch die erworbene Erfahrung sollen in Zukunft dazu verwendet werden weitere Patienten zu untersuchen und die Wirksamkeit dieses Ansatzes in klinischen Studien zu beweisen. Ein EU-Projekt mit dem Pseudonym „HEPAVAC“ ist in Beantragung (siehe Bericht TP3). Es sind mehrere Arten, mit verschiedenen Graden an Individualisierung, von HLA-Peptid basierten Impfcocktails angedacht, von Impfpeptiden die lediglich den HLA-Typus des Patienten beachten bis hin zu einer patientenindividualisierten Impfung mit Peptiden, die aus Mutationen in der Patienten-DNA stammen.

Eine ähnliche Strategie wird bei Glioblastompatienten in einem laufendem EU-Projekt „GAPVAC“, an dem wir als Partner beteiligt sind, durchgeführt.

**II.5. Fortschritt:**

Bei dem hier beschriebenen Vorhaben der peptidbasierten personalisierten Immuntherapie am Menschen handelt es sich um absolute Pionierarbeit. Es ist kein Fortschritt anderer Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet bekannt. Entsprechende Forschung anderer Arbeitsgruppen wird bestenfalls am Mausmodell betrieben.

**II.6. Veröffentlichungen:**

Keine (Manuskript in Vorbereitung)