



- ▶ Auf HLA-Molekülen an der Zelloberfläche präsentierte (Neo-)Epitope aus **tumorassoziierten und tumorspezifischen Antigenen** erlauben dem Immunsystem, maligne Zellen zu erkennen und zu eliminieren.
- ▶ **Massenspektrometrie-basierte Immunoepitidomik** ist derzeit die einzige Möglichkeit, tatsächlich präsentierte (Neo-)Epitope direkt zu identifizieren.
- ▶ Die mittels Immunoepitidomik identifizierten (Neo-)Epitope ermöglichen die rationale Entwicklung neuer, **Epitop-zentrischer Immuntherapien**.

Aus der translationalen Forschung:

Wie detektiert und validiert man (Neo-)Epitope?

Mit der klinischen Einführung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICB) gegen PD-1, PD-L1 und CTLA-4 hat sich die Immuntherapie neben Operation, Chemotherapie und Bestrahlung als vierte Säule der Krebstherapie etabliert. Die Grundlage aller Immuntherapien ist die Fähigkeit des Immunsystems, zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ zu unterscheiden. Diese Unterscheidung wird für T-Zellen durch Peptide ermöglicht, die von humanen Leukozytenantigenen (HLAs) auf der Oberfläche aller Körperzellen präsentiert werden. Obwohl durch ICB reaktivierte T-Zellen „körperfremde“ Peptide erkennen^{1,2}, reicht die endogene T-Zell-Reaktion in einer Vielzahl der klinischen Fälle nicht aus, um den Krebs vollständig zu kontrollieren. Epitop-zentrische Immuntherapien wie therapeutische Krebsimpfstoffe oder T-Zell-Rezeptor-transgene Zelltherapien können dazu beitragen, vorhandene T-Zell-Antworten zu verstärken oder neue T-Zell-Antworten auszulösen. Für die Entwicklung möglichst effektiver Epitop-zentrischer Immuntherapien ist es entscheidend, tumorspezifische „körperfremde“ Peptide, sogenannte Neoepitope, zu identifizieren. Die massenspektrometrische Analyse von HLA-präsentierten Peptiden, auch als Immunoepitidomik bezeichnet, ist dabei derzeit die einzige Methode, um (Neo-) Epitope direkt zu identifizieren.

Grundlage: HLA-Präsentation von Antigenen

HLA:Peptid-Komplexe ermöglichen es den T-Zellen des Immunsystems sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Proteinexpression kontinuierlich zu überwachen. HLA-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind Heterodimere, bestehend aus einer polymorphen α -Kette sowie β -2-Mikroglobulin. Strukturell bildet die α -Kette die Bindestelle für kurze Peptide (8–15 Aminosäuren) und erlaubt die Präsentation eines breiten Peptidspektrums intrazellulärer Herkunft, welches von CD8⁺ T-Zellen überwacht wird und so die Identifizierung und Eliminierung maligner Zellen ermöglicht. HLA-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und sind ebenfalls polymorphe Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Sie präsentieren hauptsächlich Peptide extrazellulärer Herkunft mit einer Länge von bis zu 25 Aminosäuren an CD4⁺ T-Zellen. Die Gesamtheit aller von HLA-Molekülen präsentierten Peptide wird als Immunoepitidom bezeichnet. Ein Großteil dieser Peptide stammt vom normalen Proteom der Zelle ab und ist somit „körpereigen“. Gegen diese Peptide besteht immunologische Toleranz. In Tumoren stammt nur ein sehr geringer Teil der präsentierten Peptide von ver-



Priv.-Doz. in DD, Dr. Angelika B. Riemer



Dr. Jonas P. Becker

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung für Immuntherapie und -prävention, Deutschland & Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Arbeitsgruppe Molekulares Impfstoff-Design, DZIF-Standort Heidelberg, Deutschland

änderten Proteinen und kann somit als „körperfremd“ bzw. als Neoepitop klassifiziert werden. Die für Immuntherapien relevanten (Neo-)Epitope können entweder von tumorassoziierten oder tumorspezifischen Antigenen abstammen.

Tumorassoziierte Antigene (TAAs) sind in gesundem adultem Gewebe nur schwach oder gar nicht exprimiert. TAAs umfassen Entwicklungsantigene, welche normalerweise nur während der Embryonalentwicklung exprimiert werden (z.B. Carcinoembryonales Antigen, CEA), Cancer-Testis-Antigene, die in der Regel nur in Reproduktionsorganen exprimiert werden (z.B. Proteine aus der MAGE-Familie oder NY-ESO-1), überexprimierte Antigene (z.B. HER2 bei Brustkrebs oder CD19 bei B-Zell-Malignomen) sowie aberrant posttranslational modifizierte

Antigene (z.B. MUC-1)³. Immunantworten gegen TAAs sind jedoch oft durch zentrale Toleranzmechanismen eingeschränkt und es mangelt ihnen an vollständiger Spezifität für die erkrankten Zielzellen.

Tumorspezifische Antigene (TSAs) hingegen werden ausschließlich auf malignen Zellen präsentiert und unterliegen nicht den zentralen Toleranzmechanismen des Immunsystems. Im klassischen Sinn entstehen TSAs aufgrund von Veränderungen des Genoms, wie z.B. dem Austausch einzelner Basenpaare („single nucleotide variants“, SNVs), der Insertion oder Deletion von Basenpaaren sowie Genfusionen⁴ oder auch der Expression viraler Onkoproteine wie beispielsweise derer des humanen Papillomvirus (HPV)⁵. Aktuelle Studien des Immunopeptidoms beschäftigen sich darüber hinaus mit zusätzlichen Quellen von Tumorantigenen, wie z.B. alternativen RNA-Spleißvorgängen und RNA-Editierung sowie alternativen Startstellen und Ableserastern während der Translation⁶⁻⁹. Es ist jedoch unklar, ob diese „nicht-kanonischen“ Tumorantigene tatsächlich tumorspezifisch sind.

Methodik: Direkte Epitop-Identifizierung mit Immunopeptidomik

Die Identifizierung von tumorassoziierten und tumorspezifischen Antigenen erfolgt bislang überwiegend auf der Basis von Sequenzierdaten, z.B. aus Genom- und Transkriptomsequenzierungen oder ribosomalem Profiling. Anschließend werden Epitop-Kandidaten durch *in silico*-Vorhersagen zum Bindeverhalten der generierten Peptide an die entsprechenden HLA-Moleküle priorisiert. Teilweise wird die Immunogenität der ausgewählten Peptide zusätzlich mit Hilfe von *in vitro*-Assays überprüft. Solche Ansätze haben jedoch eine hohe Fehlerrate, da keine der gewonnenen Informationen eine Aussage darüber zulässt, ob die selektierten Peptide tatsächlich auf der Oberfläche des Tumors präsentiert werden und damit ein valides Therapieziel darstellen.

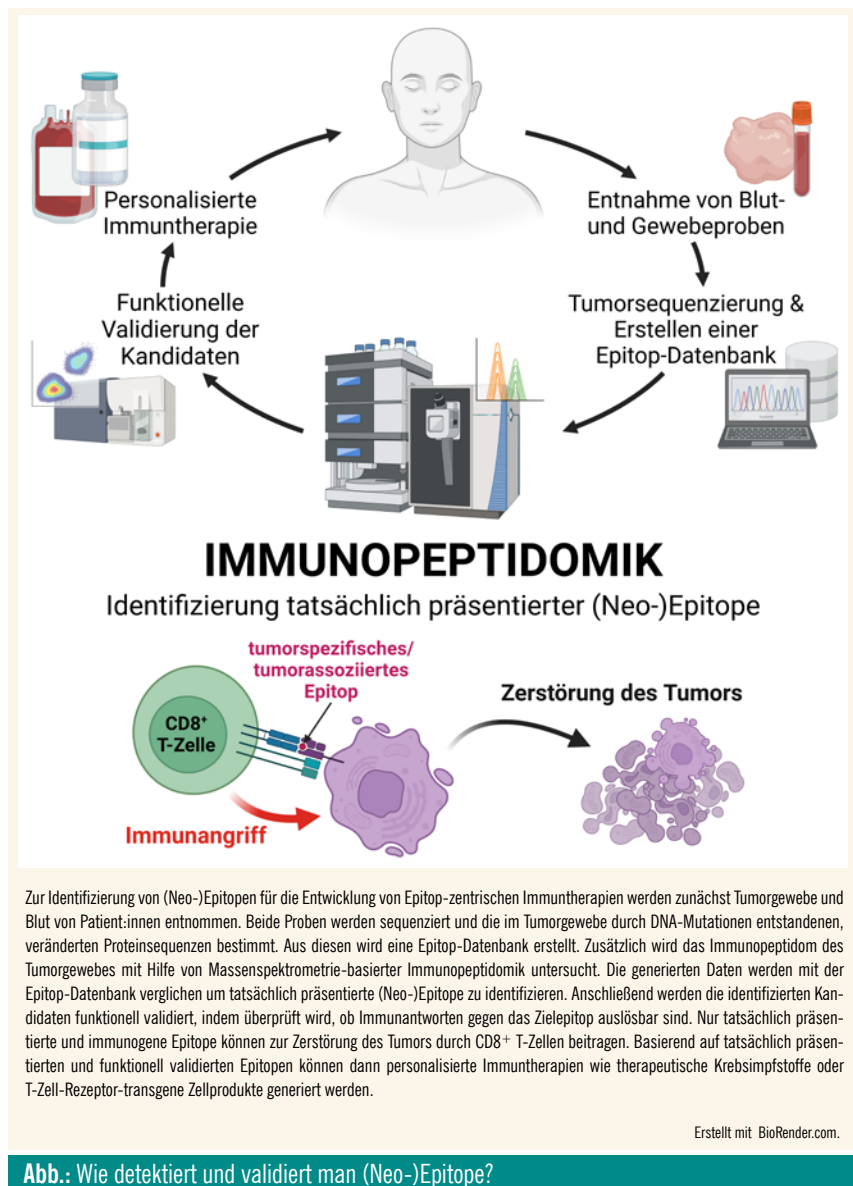
Dank der Fortschritte in der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der modernen Massenspektrometrie (MS) ist es nun möglich, diese Ungewissheit zu überwinden, das gesamte Immunopeptidom zu erforschen und die Präsentation von (Neo-)Epitopen unmittelbar nachzuweisen. Das Gebiet der Immunopeptidomik entstand in den frühen 1990er Jahren, als von HLA-Molekülen präsentierte Peptide erstmals mittels Edman-Abbaus und MS sequenziert und charakterisiert wurden¹⁰⁻¹². Durch die Einführung hochempfindlicher MS-Instrumente und neuer Ansätze bei der Datenanalyse sowie der Erkenntnis, dass durch ICB reaktivierte T-Zellen tumorspezifische Neoepitope erkennen^{1,2}, hat das Feld in jüngerer Vergangenheit erhöhte Aufmerksamkeit erlangt. Im Gegensatz zum jüngsten technologischen Fortschritt hat sich das Prinzip der Probenvorbereitung nicht wesentlich verändert. Die Probe, beispielsweise tiefgefrorenes Tumormaterial oder kultivierte Zellen, wird dabei zunächst mit einem milden Detergens lysiert, um die Integrität der HLA:Peptid-Komplexe zu schützen. Im nächsten Schritt werden die HLA:Peptid-Komplexe mittels Immunaффinitätschromatographie mit Hilfe eines anti-HLA-Antikörpers isoliert. Anschließend werden die Peptide von den deutlich größeren HLA-Molekülen durch Ultrafiltration oder Festphasenextraktion getrennt, bevor sie massenspektrometrisch analysiert werden¹³.

Für diese Analyse wird in den meisten Fällen die sogenannte datenabhängige Akquisition („data-dependent acquisition“, DDA) verwendet. Hierbei werden Peptide abhängig von der Stärke ihres MS-Signals isoliert und anschließend fragmentiert. Basierend auf der Fragmentierungsinformation können dann Rückschlüsse auf die Peptidsequenz gezogen werden. Ein Nachteil dieser Methodik ist, dass für niedrig abundante Peptide, wie z.B. Neoepitope, oft keine Fragmentierungsdaten generiert werden und diese somit nicht identifizierbar sind. Alternativ kann die Analyse mit zielgerichteten („targeted“) Methoden, wie z.B.

S/MRM („selective/multiple reaction monitoring“) oder PRM („parallel reaction monitoring“), erfolgen. Niedrig abundante Peptide können hierbei zuverlässiger und mit höherer Sensitivität detektiert werden, sofern das Peptid von Interesse und dessen exakte Masse bekannt sind. Allerdings erlauben zielgerichtete Methoden lediglich die Untersuchung einer begrenzten Anzahl an Peptiden und ermöglichen somit keine umfassende Untersuchung des gesamten Immunopeptidoms. Darüber hinaus werden zunehmend mehr Immunopeptidom-Datensätze mit datenunabhängiger Akquisition („data-independent acquisition“, DIA) generiert. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der alle Peptide aus einem definierten Massenbereich, unabhängig von ihrer Abundanz, isoliert und fragmentiert werden. Dieser Prozess wird über den gesamten Massenbereich wiederholt und generiert so eine digitale Karte aus hochkomplexen Fragmentierungsmustern aller messbaren Peptide. Zur Identifizierung werden die generierten Rohdaten entweder mit Datenbanken, die zusätzlich zu den Sequenzen des humanen Proteoms auch Neoantigensequenzen enthalten (DDA), oder mit sequenzannotierten Bibliotheken von Fragmentierungsmustern (DIA) verglichen. Bei zielgerichteten/„targeted“ Methoden werden die generierten Fragmentierungsmuster mit denen eines synthetischen Referenzpeptids verglichen. Diese Methodik gilt als Goldstandard für die Identifizierung von Peptiden und wird häufig auch zur Validierung der durch DDA und DIA generierten Detektionen verwendet. Für die klinische Anwendung von epitopbasierten Immuntherapien ist neben der HLA-Präsentation des Zielepitops auf der Tumorzelle der Nachweis der Immunogenität, also der Auslösbarkeit von T-Zell-Reaktivität gegen das Zielepitop, die wichtigste Voraussetzung. Dieser kann z.B. funktional über die Detektion von Zytokinsekretion in ELISAs oder ELISpot-Assays erfolgen oder durch die direkte Detektion der entsprechenden T-Zellen mit Hilfe von HLA:Peptid-Tetramer-Färbungen¹⁴⁻¹⁶. ▶

Immunoepitidomik in der klinischen Anwendung

Einige klinische Studien, welche Immunoepitidomik zur Epitopidentifizierung verwenden, wurden bereits oder werden derzeit durchgeführt. Drei Studien, welche den sogenannten „Tübinger Ansatz“ verfolgen, fokussierten sich hierbei auf tumorassoziierte Antigene. In der IMA901-Studie führten Vakzinierungen von 96 HLA-A*02-positiven Nierenzellkarzinom-Patient:innen mit je zehn tumorassoziierten Epitopen zu Antitumor-T-Zellantworten und einer erhöhten Überlebensrate in Phase-I- und Phase-II-Studien (NCT00523159)¹⁷. In einer offenen, randomisierten und multizentrischen Phase-III-Studie (NCT01265901) mit 339 Patient:innen, welche das Vakzin in Kombination mit Sunitinib testete, konnte jedoch kein Vorteil im Vergleich zur Standardmonotherapie erkannt werden¹⁸. Die GAPVAC-Studie (NCT02149225) testete zwei Vakzinformulierungen bei insgesamt 15 Patient:innen mit Glioblastom¹⁹. Alle Patient:innen erhielten einen Impfstoff mit sieben tumorassoziierten Epitopen basierend auf ihrem HLA-Allotyp und der Immunoepitidom- und Transkriptomanalyse ihres jeweiligen Tumors. 11 Patient:innen erhielten zusätzlich eine Vakzinierung, welche zwei *in silico* vorhergesagte, tumorspezifische Epitope enthält. Für beide Ansätze konnten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellimmunantworten gegen die geimpften Epitope nachgewiesen werden. Eine weitere Studie (NCT04688385) zur Impfung mit tumorassoziierten Epitopen für Patient:innen mit chronisch lymphatischer Leukämie befindet sich aktuell in der Rekrutierungsphase²⁰. Während Therapieansätze, welche sich gegen tumorassoziierte Antigene richten, besonders attraktiv sind, da sie potenziell auf ein breiteres Spektrum von Patient:innen angewendet werden können („Warenhaus“-Prinzip), bergen sie auch immer die Gefahr von schweren Nebenwirkungen durch fehlende absolute Tumorspezifität. Dies hat z.B. im Fall einer Studie mit transgenen T-Zellrezeptoren gegen tumorassoziierte



MAGE-A3-Epitope zu schwerer Neurotoxizität geführt²¹. Für Therapieansätze, welche sich gegen tumorspezifische Ziele richten, ist diese Gefahr hingegen wesentlich geringer. Drei Studien, welche das Potential von vollständig personalisierten Therapieansätzen ergründen, befinden sich aktuell in der Rekrutierungsphase. Davon verwenden zwei Studien autologe dendritische Zellen, welche mit Peptiden von tumorspezifischen Antigenen beladen werden, als Vakzinierungsplattform für Patient:innen mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NCT05195619) oder Pankreaskarzinom (NCT04627246)²². Die dritte Studie (NCT04643574) testet den adoptiven Transfer von Neoantigen-spezifisch angereicherten, autologen

T-Zellen bei Patient:innen mit fortgeschrittenen, soliden Tumoren²³. Bemerkenswert bei diesen Studien ist die außergewöhnlich kurze Zeit von nur zwei Wochen zwischen Eingang des Tumormaterials und der Identifizierung der Neoepitope. Die Identifizierung von tumorspezifischen Zielen ist typischerweise mit einem deutlich höheren zeitlichen und monetären Aufwand pro Patient verbunden. Eine Ausnahme bilden HPV-assoziierte Krebserkrankungen, für die aufgrund der tumorspezifischen Expression viraler Onkoproteine Therapien nach dem „Warenhaus“-Prinzip entwickelt werden können. So konnte z.B. in einer Phase-I-Studie (NCT02858310) mit einem transgenen T-Zellprodukt gegen ein zuvor per Immunoepitidomik

validiertes virales Epitop⁵ robuste Tumormorregression bei sechs von zwölf Patient:innen gezeigt werden²⁴.

Ausblick

Das Gebiet der Immunoepitomidik konnte in der letzten Dekade erhebliche Fortschritte erzielen und erlaubt heutzutage

nicht nur die Erforschung grundlegender Prozesse der Antigenprozessierung und -präsentation, sondern ermöglicht auch die Identifizierung von Zielstrukturen für die rationale Entwicklung personalisierter Immuntherapieansätze. Durch neue Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie, insbesondere im Hinblick auf die Sensitivität der Messgeräte, sowie

neue, KI-gestützte Ansätze bei der bioinformatischen Datenanalyse und die Tatsache, dass der unmittelbare Nachweis tatsächlicher Epitop-Präsentation weiterhin der Immunoepitomidik vorbehalten ist, ist zu erwarten, dass diese für die Entwicklung Epitop-spezifischer Immuntherapien zunehmend an Bedeutung gewinnen wird. ■

1 Gubin MM et al., *Nature* 2014; 515 (7528): 577-81

2 van Rooij N et al., *J Clin Oncol* 2013; 31 (32): e439-e42

3 Haen SP et al., *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17 (10): 595-610

4 Tureci O et al., *Clin Cancer Res* 2016; 22 (8): 1885-96

5 Riemer AB et al., *J Biol Chem* 2010; 285 (38): 29608-22

6 Zhang M et al., *Nat Commun* 2018; 9 (1): 3919

7 Bartok O et al., *Nature* 2020; 590 (7845): 332-7

8 Goyal A et al., *Nat Commun* 2023; 14 (1): 6731

9 Chong C et al., *Nat Commun* 2020; 11 (1): 1293

10 Falk K et al., *Nature* 1991; 351 (6324): 290-6

11 Rötzschke O et al., *Nature* 1990; 348 (6298): 252-4

12 Hunt DF et al., *Science* 1992; 255 (5049): 1261-3

13 Kuznetsov A et al., *Molecules* 2020; 25 (22): 5409

14 Lee PP, *Methods Mol Biol* 2004; 75: 513-31

15 Slota M et al., *Expert Rev Vaccines* 2011; 10 (3): 299-306

16 Meyer M et al., *Front Immunol* 2024; 14: 1294565

17 Walter S et al., *Nat Med* 2012; 18 (8): 1254-61

18 Rini BI et al., *Lancet Oncol* 2016; 17 (11): 1599-1611

19 Hiif N et al., *Nature* 2019; 565 (7738): 240-5

20 Nelde A et al., *Front Immunol* 2021; 12: 705974

21 Morgan RA et al., *J Immunother* 2013; 36 (2): 133-51

22 Bassani-Sternberg M et al., *Front Immunol* 2019; 10: 1832

23 Arnaud M et al., *Nat Biotechnol* 2021; 40: 656-60

24 Nagarsheth NB et al., *Nat Med* 2021; 27 (3): 419-25