

Zusammenfassung

Alexandra Leah Castell Morley

Dr. med.

Predictive factors in HER2-positive early breast cancer:

Endogenous HER2-specific immune response as an early predictive marker for pathologic complete response and disease-free survival

Fach/Einrichtung: Frauenheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Frederik Marmé

In dieser Dissertation wurden endogene HER2-spezifische Immunantworten als frühe prädiktive Marker für Therapieansprechen von neoadjuvanter anti-HER2 gerichteten Therapie bei HER2-positivem Mammakarzinom untersucht. Dieses Projekt verfolgte zwei Hauptziele. Das erste Ziel bestand darin eine mögliche Korrelation zwischen einer endogenen HER2-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort und einer pathologisch kompletten Remission als auch krankheitsfreiem Überleben festzustellen. Im zweiten Ziel galt es eine mögliche Korrelation zwischen endogenen anti-HER2 gerichteten Immunantworten und tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der initialen Biopsie zu ermitteln. Des Weiteren war eine zusätzliche Zielsetzung die frühestmögliche Feststellung einer solchen endogenen HER2-spezifischen Immunantwort unter neoadjuvanter anti-HER2 gerichteten Therapie von besonderem Interesse.

Über einen Zeitraum von ca. 3 Jahren wurden 87 Patientinnen mit primärem HER2-positivem Mammakarzinom im Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen in Heidelberg prospektiv eingeschlossen. Blutproben wurden vor und während neoadjuvanter anti-HER2-Therapie und postoperativ gesammelt. Von diesen 87 Patientinnen erfüllten 68 die Einschlusskriterien für die Analyse von anti-HER2 humoralen und zellulären Immunantworten, wovon 5 Patientinnen für die statistische Analyse ausgeschlossen werden mussten. Alle Patientinnen erhielten eine Taxan-basierte Chemotherapie in Kombination mit HER2-spezifischer Therapie. 58 von 63 Patientinnen erhielten beide anti-HER2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab und die verbleibenden 5 Patientinnen erhielten ausschließlich Trastuzumab begleitend zur Chemotherapie. Die pathologisch komplette Remissionsrate war hoch mit 68.3% (n=43 von 63). Dabei stellte sich bei den HER2+/Hormonrezeptor-negativen Patientinnen die höchste pathologisch komplette Remissionsrate von 83% (n=19 von 23) heraus versus 60% (n=24 von 40) bei HER2+/Hormonrezeptor-positiven Patientinnen. Daten bezüglich tumorinfiltrierender Lymphozyten bei Erstdiagnose standen für 30 von 63

Patientinnen (47.6%) zur Verfügung, da ein erheblicher Teil von ihnen ihre initiale Biopsie extern erhielt. Es gab keine Todesfälle über den gesamten Beobachtungszeitraum von März 2014 - November 2017.

Zur Feststellung von HER2-spezifischen endogenen Antikörperantworten gegen die extra- und intrazelluläre Domäne, wurden drei verschiedene enzyme-linked immunosorbent assays durchgeführt. Hinsichtlich der extrazellulären Domäne wurden 2 gesonderte Assays durchgeführt: eines zur Erfassung der Gesamt-IgG-Antikörper und ein Zweites zur gezielten Ermittlung von Ig λ -Antikörpern. Da alle Patientinnen gegen HER2 gerichtete therapeutische Antikörper als Therapie erhielten, wurden 3 verschiedene Strategien verfolgt, um speziell die endogenen anti-HER2-Antikörper zu detektieren und eine Erkennung der beiden anti-HER2-Antikörper zu umgehen: 1) Anwendung eines blockierenden Antikörpers gegen Trastuzumab, 2) Nachweis von Ig λ -Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von HER2, da Trastuzumab und Pertuzumab Kappa-Leichtketten-Antikörper sind und 3) Nachweis von Antikörpern gegen die intrazelluläre Domäne, da sowohl Trastuzumab als auch Pertuzumab an die extrazelluläre Domäne binden. Für die letzte Strategie wurde die intrazelluläre Domäne von *ERBB2* in den Säugetier-Expressionsvektor pSecTag2B mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag kloniert und in BOSC 23-Zellen exprimiert. Hierbei wurden Glutathion-S-Transferase-capture enzyme-linked immunosorbent assays mit Beschichtung der Platten mit Glutathion-Casein angewandt. Letztere ermöglichte eine indirekte Aufreinigung der intrazellulären Domäne von HER2 aus dem Proteinlysat. Dieses Assay diente der Bestimmung von HER2-bestimmten IgG Antikörpertitern gegen die intrazelluläre Domäne. 28 Seren von gesunden alterskorrelierten Spendern dienten dabei der Festlegung des cut-offs. Positiv- und Negativkontrollen wurden zusammen mit den Patientenseren untersucht. 20.6% (n=13 von 63) wiesen vorbestehende anti-HER2-Antikörper auf, bei 35% (n=20 von 63) wurden anti-HER2-Antikörper unter Therapie (während neoadjuvanter Chemotherapie und/oder postoperativ) festgestellt und 17.5% (n=11 von 63) zeigten sowohl vorbestehende als auch unter Therapie bestehende anti-HER2-Antikörper. Insgesamt präsentierten 38% (n=24) anti-HER2-Antikörper zu einem der in diesem Projekt untersuchten Zeitpunkte, während 7.9% (n=5) anti-HER2-Antikörper zu allen in diesem Projekt untersuchten Zeitpunkten (vorbestehend und unter Therapie) präsentierten. 42% (n=18) der Patientinnen mit pathologisch kompletter Remission wiesen anti-HER2-Antikörper zu einem der untersuchten Zeitpunkte auf im Vergleich zu lediglich 30% (n=6) bei den Patientinnen ohne erreichte pathologisch komplette Remission. Die pathologisch komplette Remissionsrate aus diesem Projekt steht im Einklang mit Daten aus klinischen Studien mit dualer anti-HER2 Blockade und die Rate der anti-HER2-Antikörper ist mit den in unabhängigen Datensätzen veröffentlichten Daten vergleichbar. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation von anti-HER2-Antikörpern mit pathologisch kompletter Remission, krankheitsfreiem Überleben oder tumorinfiltrierenden Lymphozyten.

Enzyme-linked immunospot assays und anschließend Durchflusszytometrieanalysen wurden zur Detektion von gegen HER2 gerichteten zellulären Immunantworten als Interferon-gamma-sezernierenden T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden periphere mononukleare Blutzellen von den gesammelten EDTA Blutproben isoliert. Dendritische

und T-Zellen wurden dann von diesen isolierten Blutzellen extrahiert, kultiviert und aufgereinigt. Von den 8 Patientinnen, dessen Proben zur Analyse von Interferon-gamma-sezernierenden T-Zellen via Enzyme-linked immunospot assays untersucht wurden, führte lediglich 1 Analyse zu erfolgreichen Positivkontrollergebnissen. Eine zusätzliche Herausforderung stellte sich mit unzureichenden Mengen an dendritischen Zellen, T-Zellen oder beider Zellarten nach Isolation heraus. Daher wurden Durchflusszytometrieanalysen stattdessen angewandt. Dafür wurde der gleiche Reifungsprozess zur Gewinnung von reifen dendritischen Zellen und T-Zellen verwendet, gefolgt von einem intrazellulären Färbungsprozess mit Fluoreszenzfarbstoffen. Doch auch hier war die geringe Ausbeute an reifen dendritischen Zellen, T-Zellen oder beider Zellarten problematisch. Die angewandten Protokolle wurden umfassend überprüft und optimiert ohne erkennbare Ursache, die der Methodik, Probengewinnung oder der Proben selbst inne lag.

Zusammenfassend scheint das Potenzial von endogenen anti-HER2 humoralen Immunantworten als klinisch nützlicher prädiktiver Marker zur Anpassung der Therapie (Eskalation oder Deeskalation) begrenzt zu sein.

während die Analyse von endogenen anti-HER2 zellulären Immunantworten aufgrund der methodischen Problematik nicht systematisch durchgeführt werden konnte. Somit wurde die Zielsetzung dieses Projekts nicht vollständig erreicht. Gegebenenfalls wäre ein anderer Ansatz für zukünftige Recherchen von prädiktiven Markern für Therapieansprechen von neoadjuvanter Therapie zielführend, wie in jüngsten Studien zu sehen ist.

Dennoch betont die hohe pathologisch komplette Remissionsrate und hohe Rate an krankheitsfreiem Überleben in diesem Projekt das Potenzial von deeskalierenden Therapiemaßnahmen und stützt auf diese Weise die hier zugrundeliegende Hypothese: Die Notwendigkeit frühe prädiktive Marker für Therapieansprechen von neoadjuvanter anti-HER2 gerichteten Therapie bei HER2-positivem Mammakarzinom zu ermitteln.