

L. Bunse^{1,2,6}, T. Kessler^{3,4}, W. Wick^{3,4}, M. Platten^{1,2,5}.

¹Neurologische Klinik, MCTN, Universitätsklinikum Mannheim und Medizinische Fakultät

Mannheim der Universität Heidelberg, Mannheim, ²DKTK Klinische Kooperationseinheit

Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie, DKFZ, Heidelberg, ³Neurologische Klinik,

Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, ⁴DKTK Klinische Kooperationseinheit

Neuroonkologie, DKFZ, Heidelberg, ⁵Helmholtz Institute for Translational Oncology (Hi-TRON),

Mainz, ⁶Korrespondenz an lukas.bunse@umm.de

26. Juni 2020

Glioblastom: Immuntherapie bei hoher Mutationslast und klinische Relevanz von Methylierungsubtypen

Glioblastome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren bei Erwachsenen. Ein relevanter Anteil dieser Tumoren ist primär oder posttherapeutisch in unterschiedlichem Ausmaß hypermutiert. Der Begriff Hypermutation ist nach heutigem Kenntnisstand nicht eindeutig definiert. In einer entitätsübergreifenden Analyse wurden > 10 Mutationen pro Megabase (Mb) als Grenzwert für eine Hypermutation festgelegt (1). Die Hypermutation in Glioblastomen stellt einen möglichen prädiktiven Marker für Immuntherapien dar. Die entitätsübergreifende Zulassung bestimmter Immuncheckpoint-Inhibitoren (CIs) für hypermutierte solide Tumoren durch die FDA schließt prinzipiell auch Glioblastome ein. Phase-I/II-Studien zur Bewertung der Effektivität einer Immuncheckpoint-Inhibition bei hypermutierten Glioblastomen werden derzeit durchgeführt. Gleichzeitig befinden sich Konzepte einer Immuntherapie für spezifische diagnostische Methylierungsgruppen in einer experimentellen und frühen klinischen Phase. Die Standardtherapie beim Glioblastom besteht - trotz enormer Fortschritte im Bereich der molekularen Klassifikation und vielgestaltiger präklinischer differentieller Einblicke in die Pathogenese - weiterhin aus einer Resektion gefolgt von einer Radiochemotherapie (RCT) mit dem Alkylans Temozolomid. Im Folgenden diskutieren wir die Ursachen und klinischen Implikationen einer hohen Mutationslast bei Glioblastomen und deren Methylierungsubtypen mit dem Potenzial, die Standardtherapie dieser spezifischen Subentität in Deutschland zu verändern.

Zu diesem Artikel ist auch ein CME-Test verfügbar.

[Hier kommen Sie direkt zur Teilnahme](#)

(verfügbar bis zum 28.06.2021)

Bereits im Mai 2017 erhielt der humanisierte monoklonale Antikörper gegen den Immuncheckpoint programmed cell death protein 1 (PD-1) Pembrolizumab in den USA eine entitätsübergreifende Zulassung für alle metastasierten und nicht-resektablen soliden Tumoren, somit auch Glioblastome, mit dem molekularen Biomarker Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) sowie maligne Tumoren mit funktionell beeinträchtigten DNA-mismatch-Reparaturproteinen MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 und PMS2 (dMMR). Zeitgleich wurden für Glioblastom-Patienten diverse Studien mit Antikörpern gegen weitere Immuncheckpoints initiiert und teilweise abgeschlossen. Eine uneingeschränkte Translation der positiven Studienergebnisse bei extrakraniellen soliden Tumoren auf Glioblastome konnte primär aufgrund der tiefen Immunsuppression und der vorhandenen Blut-Hirn-Schranke nicht erwartet werden. Bei mitunter ernüchternder Datenlage bei unselektionierten Patientenkollektiven (2) sind derzeit 3 Studien in der Rekrutierungsphase, die explizit Gliom-Patienten mit einem hypermutierten Phänotyp einschließen (NCT04145115, NCT03718767, NCT04145115). Die unspezifische Checkpoint-Inhibition ist nur eine der zu explorierenden immuntherapeutischen Modalitäten für Glioblastome. Personalisierte mutationsspezifische Konzepte, insbesondere Peptid-basierte Vakzinierungen (3) auch in Kombination mit CIs befinden sich in intensiver klinischer Testung (NCT03893903, NCT03750071). Zelluläre Konzepte wie die Nutzung von chimeric antigen receptor (CAR)-transgenen T-Zellen (CAR-T-Zellen) (NCT03283631, NCT04003649) oder von T-Zell-Rezeptor (TZR)-transgenen T-Zellen gegen mutierte tumorspezifische molekulare Läsionen (4, 5) befinden sich in der präklinischen und klinischen Translationsphase. In den nächsten Jahren werden diese personalisierten und tumorspezifischen Plattformen auf hypermutierte Glioblastome ausgeweitet werden, um der Vielzahl an molekularen Läsionen möglichst effektiv gerecht zu werden.

Warum Immuntherapie bei Glioblastomen mit hoher Mutationslast?

Immuntherapien sind insbesondere bei hypermutierten Glioblastomen vielversprechend. Diese Schlussfolgerung resultiert aus der Annahme, dass mit der Anzahl von tumorspezifischen somatischen Mutationen auch die Anzahl von Neoepitopen linear zunimmt. Neoepitope sind tumorspezifische Peptide, die durch – häufig punktuelle – spezifische Veränderungen im Genom der Tumorzellen, die zu einer einzigartigen Veränderung der Aminosäuresequenz der Tumorproteine führen, entstehen, wenn die veränderten Tumorproteine im Proteasom prozessiert werden. Diese veränderten Peptide werden, sofern sie auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) präsentiert werden, als Neoepitope bezeichnet. Entwicklungsbiologisch werden T-Zellen, die körpereigene Epitope erkennen, bereits als positiv selektionierte Thymozyten im Rahmen der folgenden negativen Selektion im Thymus apoptotisch abgebaut. Dieser „zentralen Toleranz“ unterliegen neoepitopspezifische T-Zellen jedoch nicht. Folglich haben neoepitopspezifische T-Zellen in hypermutierten Glioblastomen wesentlich mehr molekulare Angriffspunkte als in vergleichbaren Glioblastomen ohne hohe Mutationslast. Konzeptionell ist diese Annahme nicht spezifisch für Glioblastome, sie ist für alle Tumoren heranzuziehen. In einer Schlüsselpublikation zu hypermutierten kolorektalen Karzinomen (CRC) wurde von Le et al. (6) nach Anwendung von Pembrolizumab ein progressionsfreies Überleben (PFS) von 78% gegenüber 11% bei Patienten mit nicht hypermutiertem CRC beschrieben. Diese klinische Erkenntnis konnte mit anderen CIs in vielen weiteren Tumorentitäten (7-10) ebenfalls gewonnen werden und führte letztlich zu der zu Beginn bereits erwähnten umfassenden Zulassung von Pembrolizumab im anglo-amerikanischen Raum. Häufig sind gerade

hypermutierte Glioblastome resistent gegenüber einer Chemotherapie. Auf die molekularen Mechanismen dieser Resistenz wird im folgenden Abschnitt detaillierter eingegangen; diese Beobachtung zeigt aber bereits hier auf, dass Immuntherapien a priori als sinnvolle Therapiealternative bei Glioblastomen mit hoher Mutationslast geprüft werden sollten (11).

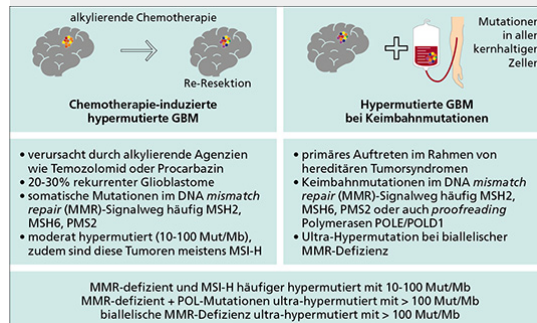
Molekulare Diagnostik bei Glioblastomen mit hoher Mutationslast

Die technischen Möglichkeiten, eine hohe Mutationslast bei Glioblastomen zu identifizieren, sind mannigfaltig. Maßgeblich für die Auswahl der diagnostischen Tests sind i) die lokal etablierten Technologieplattformen, ii) die Therapiekonsequenz und iii) die Analysekosten. Die Frage nach einer möglichen Eignung für eine unspezifische Immuntherapie wie z.B. die Anwendung eines CI im Rahmen eines freien Heilversuchs lässt sich näherungsweise durch eine gezielte Genpanel-Sequenzierung beantworten. Grundlage hierbei ist die Tatsache, dass mutierte genomische Areale summa summarum stochastisch über das Genom verteilt sind, und damit mit ausreichender Sensitivität auch in prädefinierten Genpanel-Sequenzierungen identifiziert werden können. Beispielhaft sei hier der Grenzwert von 20 Mutationen in einem 341-Genpanel beschrieben, der bei CRC zwischen einer Hypermutation und einem nicht-hypermultierten Tumor unterscheiden konnte (12). Genpanel-Sequenzierungen sind aufgrund der notwendigen Sequenzierungstiefe kostengünstiger als RNA-Sequenzierungen (RNA-seq) oder Whole-exome-Sequenzierungen (WES). Für eine mögliche personalisierte Immuntherapie, die beispielsweise in Form von tumorspezifischen Muropeptidvakzinierungen diversen individuellen molekularen Läsionen Rechnung tragen kann, ist die ganzheitliche Analyse der proteinkodierenden genomischen Areale erforderlich. Hierbei sind RNA-seq und WES den Genpanel-Sequenzierungen überlegen. Trotz jüngerer Berichte von tumorspezifischen molekularen Läsionen in nicht proteinkodierenden genomischen Abschnitten (13) hat dieses Konzept noch keine translationale Relevanz aufzeigen können, daher besteht aus klinisch-immunologischer Sicht derzeit keine Indikation für eine Whole-genome-Sequenzierung (WGS).

Molekulare Entstehungsmechanismen

Mechanistisch kann eine Hypermutation sekundär durch eine Chemotherapie induziert sein oder sie tritt bereits primär im Rahmen von Keimbahnmutationen bei hereditären Krebsyndromen auf (Abb. 1). Alkylanzien wie Temozolomid oder Procarbazin sind durch O⁶-Methylguanin-Addukte selbst mutagen. Die primär intakten DNA-mismatch-Reparaturproteine bedingen bei Defizienz der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) (meist wegen vorhandener MGMT-Promotorhypermethylierung) die Reparatur oder den Tumorzelltod. Sobald die DNA-Mismatch-Reparaturproteine selbst mutieren, kommt es zu einer Resistenz gegenüber Alkylanzien und bei nachfolgenden DNA-Replikationen zu einer G:C>A:T Transition im gesamten Genom. Die Akquisition eines intrinsischen hypermutierten Phänotyps ist somit auch unmittelbar mit der Resistenzentwicklung gegenüber alkylirender Chemotherapie assoziiert. Zusätzlich zu diesem Phänomen ereignet sich gegebenenfalls zeitgleich eine klonale Selektion zugunsten von MMR-defizienten Tumorzellsubklonen, die eine entsprechende Therapie überleben (14).

Keimbahn-assoziierte Hypermuation in Glioblastomen. *MSI-H*=mikrosatelliteninstabile Glioblastome (GBM), *POL*=Polymerasen, *Mut/Mb*=Mutationen pro Megabase, *MSH2*=MutS homolog 2, *MSH6*=MutS homolog 6, *PMS2*=PMS1 Homolog 2



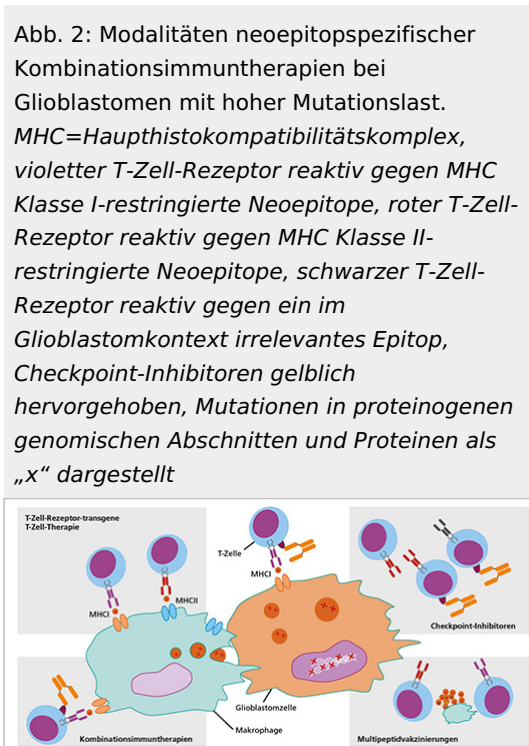
Als relevante Keimbahnmutationen im Rahmen von hereditären Krebsyndromen treten in Glioblastomen v.a. Mutationen in den MMR-relevanten Genen MutS Homolog 2 (MSH2), MSH6 und Postmeiotic Segregation Increased 1 Homolog 2 (PMS2) auf. Diagnostisch können diese Gene ohne Sequenzierungen auch isoliert mittels sog. MMR-Immunhistochemie-Panels untersucht werden. Isolierte Mutationen in diesen Genen resultieren häufig in einem moderaten Hypermuationsphänotyp (10-100 Mutationen (Mut)/Mb), zudem sind diese Tumoren meistens mikrosatelliteninstabil (MSI-H). Liegen hingegen auch Mutationen in den Exonuklease-Domänen der Proofreading-Polymerasen POLD1 oder POLE vor, resultiert fast immer ein Ultrahypermuationsphänotyp (> 100 Mut/Mb). POLE beispielsweise kodiert für die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ , die bei der Replikation der Tumorzelle den leading strand der DNA synthetisiert und kontrolliert. In Einzelfallberichten und explorativen Studien wurden bei Glioblastom-Patienten mit Ultramutationsphänotyp bei POLE-Keimbahnmutation (15) oder biallelischen PMS2-Keimbahnmutationen (16) beachtliche therapeutische Erfolge mit CIs beschrieben.

Zur Identifikation eines durch Temozolomid induzierten sekundären Hypermuationsphänotyps inklusive der Erhebung der patientenindividuellen Neoepitope (WES und RNA-seq) ist eine Resektion des Tumorrezidivs erforderlich. Aktuelle Studien legen allerdings nahe, dass ein sekundärer hypermutierter Phänotyp, der durch eine alkylierende Vortherapie ausgelöst wurde, nicht im gleichen Ausmaß zu einer Erhöhung der Immunogenität und somit dem Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibition führt wie ein primär durch Mutationen in MMR-Genen bedingter hypermutierter Phänotyp (17). In Kongruenz hierzu war in entitätsübergreifenden Studien die fehlende positive Korrelation eines hypermutierten Phänotyps mit dem Therapieansprechen auf einen CI nahezu ein Alleinstellungsmerkmal der Gliome (18).

Neoepitopspezifische Immuntherapie

Mit der Anzahl von tumorspezifischen somatischen Mutationen nimmt linear auch die Anzahl möglicher Neoepitope zu. Die Checkpoint-Inhibition wirkt unspezifisch und entfesselt in extrakraniellen soliden Tumoren v.a. in das Tumorgewebe infiltrierte und durch das lokale

Mikromilieu supprimierte T-Zellen, somit auch die neoepitopspezifischen Zellen. Die Blut-Hirn-Schranke ist im Kontext von Glioblastomen, wenn überhaupt, jedoch nur eingeschränkt für die rekombinanten Antikörper permeabel. Somit ist hier der Wirkmechanismus hauptsächlich auf die Entfesselung peripherer T-Zellen zurückzuführen. Nicht auszuschließen ist die vereinzelte Transmigration von T-Zellen, die den CI gebunden haben, in das Hirnparenchym und den Tumorkern. Die Anzahl an entfesselten neo-epitopspezifischen T-Zellen ist in diesem Konzept aber als extrem selten anzunehmen. Hierbei können neoepitopspezifische Immuntherapien in Kombination mit CIs insbesondere bei hypermutierten Glioblastomen Abhilfe schaffen (Abb. 2).



Anwendung bei Glioblastomen mit hoher Mutationslast

Zwei multizentrische bzw. multinationale Glioblastomkonsortien haben kürzlich 2 Phase-I-Studien zur Durchführbarkeit und Verträglichkeit von personalisierten neoepitopspezifischen Multipeptidvakzinen durchgeführt (3, 19). Diese Studien haben gezeigt, dass selbst bei nicht hypermutierten Glioblastomen mit einer Anzahl von 30-50 nicht-synonymen Mutationen die Generierung und Applikation von personalisierten neoepitopspezifischen Multipeptidvakzinierungen möglich sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die durch die Vakzine aktiviert wurden, im peripheren Blut polyfunktional blieben und teilweise in das Tumormikromilieu infiltrierte. Als logische Konsequenz dieser Erkenntnisse werden derzeit 2 Phase-I-Studien zur Peptidvakzinierung in Kombination mit CIs durchgeführt (NCT03893903, NCT03750071). Aufgrund der erhöhten Abundanz von Neoepitopen sollten diese kombinierten personalisierten Immuntherapien insbesondere in hypermutierten oder ultra-hypermutierten Glioblastomen klinische Anwendung finden.

Neben peptidbasierten neoepitopspezifischen Immuntherapien befinden sich zelluläre TZR-transgene personalisierte Plattformen in der Entwicklung. Vorteilhaft bei der TZR-transgenen

Immuntherapie ist die Umgehung der endogenen, bei Krebspatienten häufig reprimierten Induzierbarkeit einer T-Zell-Antwort. Neben regulatorischen Herausforderungen bei der Herstellung von zellulären Produkten gilt es derzeit, die Plattformen durch technologischen Fortschritt so weiterzuentwickeln, dass sie in das zeitlich limitierte Therapiefenster von Glioblastom-Patienten implementiert werden können.

Klinische Relevanz und immuntherapeutische Implikation der Methylierungssubgruppen

Glioblastome können anhand der DNA-Methylierung in 8 verschiedene Methylierungssubgruppen, RTK I, RTK II, RTK III, MES, MYCN, MID, G34 und K27, unterteilt werden (20). Ausgenommen sind hierbei die IDH1-mutierten höhergradigen Gliome, die früher als sekundäre Glioblastome den Glioblastomen zugeteilt wurden. Zudem existiert eine epigenetische intratumorale Heterogenität (21), sodass es therapieassoziiert in limitiertem Ausmaß zu Subgruppenverschiebungen kommen kann. Beispielhaft sei hier die Transition von einer proneuralen (RTK I) zu einer mesenchymalen (MES) Subgruppe (PMT) erwähnt.

Patienten mit einem Glioblastom der G34-Subklasse zeigen ein verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu den anderen Subgruppen. Namensgebend ist eine pathognomonische Punktmutation im Histon-Gen H3F3A an der resultierenden Aminosäureposition 34, welche zu der charakteristischen Methylierung dieser Subgruppe führt (22).

Für die K27-Subgruppe mit charakteristischer Punktmutation im Histon-Gen H3F3A an der resultierenden Aminosäureposition 27, z.B. K27M, wurden bereits tumorspezifische Peptidvakzinierungen gegen H3.3.K27M bei diesen besonders aggressiven Mittelliniengliomen in einer Phase-I-Studie getestet (NCT02960230). Zudem scheinen K27-Subklassen-Glioblastome mit einer erhöhten Abundanz des zellmembranständigen Gangliosids GD2 assoziiert zu sein. Präklinisch vielversprechende GD2-zielgerichtete CAR-T-Zell-Therapien finden sich derzeit im Rahmen einer Phase-I-Studie in klinischer Translation (NCT04196413).

Die MES-Subgruppe ist charakterisiert durch eine hohe intratumorale Abundanz von Stromazellen wie Endothelzellen, Perizyten, Mikroglia und Makrophagen. Womöglich ist die Infiltration dieser Stromazellen mit der oben erwähnten PMT assoziiert. MES-Glioblastome zeichnen sich zudem durch eine hohe intratumorale Abundanz von tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus, weswegen sie auch häufig als immunologisch aktivere Subgruppe interpretiert werden. Beispielhaft ist hierbei die erhöhte tumorassoziierte Expression von IL-13-Rezeptor $\alpha 2$ (IL13R $\alpha 2$). CAR-T-Zell-Therapien gegen IL13R $\alpha 2$ wurden präklinisch optimiert und in Einzelfallberichten beschrieben (23, 24). CAR-T-Zell-Therapien gegen IL13R $\alpha 2$ befinden sich derzeit als Monotherapie und in Kombinationstherapie mit dem CI -Nivolumab in klinischer Phase-I-Testung (NCT04003649, NCT02208362).

Für die Therapieentscheidung bei Patienten mit Glioblastomen aller Methylierungssubgruppen wird derzeit lediglich der MGMT-Promotormethylierungsstatus zur Entscheidung über eine Temozolomid-Therapie in der Klinik insbesondere bei älteren Patienten und zur Auswahl von Studienkollektiven eingesetzt. Die Diversifikation der immuntherapeutischen Modalitäten und die Anzahl an Phase-I-Studien lassen jedoch vermuten, dass die Methylierungssubgruppen künftig als prädiktiver Klassifikator verwendet werden könnten.

Die wissenschaftlichen Fragestellungen werden aktuell im Sonderforschungsbereich 1389 anhand von Modellen und klinischem Studienmaterial bearbeitet.

Zu diesem Artikel ist auch ein CME-Test verfügbar.

[Hier kommen Sie direkt zur Teilnahme](#)

(verfügbar bis zum 28.06.2021)

Interessenkonflikte: L. Bunse, W. Wick und M. Platten sind Inhaber dreier Patente zur IDH1.R132H- und H3.3.K27M-Vakzinierung. T. Kessler hat keinen Interessenkonflikt.



Dr. med. Lukas Bunse

Neurologische Klinik
Universitätsmedizin Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim

Tel.: 0621/3832885

E-Mail: lukas.bunse@umm.de



Prof. Dr. med. Michael Platten

Neurologische Klinik
Universitätsmedizin Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim

Tel.: 0621/3832885

E-Mail: michael.platten@umm.de



Dr. med. Tobias Kessler

Neurologische Klinik
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Tel.: 06221/565075

E-Mail: tobias.kessler@med.uni-heidelberg.de



Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Neurologische Klinik
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Tel.: 06221/567075

E-Mail: wolfgang.wick@med.uni-heidelberg.de

ABSTRACT

L. Bunse^{1,2,6}, T. Kessler^{3,4}, W. Wick^{3,4}, M. Platten^{1,2,5}. ¹Neurologische Klinik, MCTN, Universitätsklinikum Mannheim und Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, Mannheim, ²DTK Klinische Kooperationsseinheit Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie, DKFZ, Heidelberg, ³Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, ⁴DTK Klinische Kooperationsseinheit Neuroonkologie, DKFZ, Heidelberg, ⁵Helmholtz Institute for Translational Oncology (Hi-TRON), Mainz, ⁶Korrespondenz an lukas.bunse@umm.de.

Glioblastomas are the most common primary brain tumors in adults. A relevant proportion of these tumors show a high primary or secondary mutational burden to various extent. Secondary hypermutation frequently occurs after chemotherapy with alkylating agents. To date, the term “hypermutation” is not clearly defined. A recent pan-cancer study suggests 10 mutations per megabases as threshold for hypermutation (1). In glioblastoma, hypermutation may serve as a relevant predictive marker for future immunotherapeutic approaches. Depending on the immunotherapeutic strategy, there are several meaningful ways to diagnose hypermutated glioblastoma. At the same time, concepts for methylation-subclass specific immunotherapeutic

interventions are emerging in the framework of early clinical phase studies.

Keywords: *Glioblastoma, hypermutation, predictive marker, methylation-subclass, immunotherapeutic approaches*