

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

T-Zell-Aktivierung als Therapiestrategie
bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Habilitationsschrift

vorgelegt von Dr. med. Felix S. Lichtenegger
2023

Inhalt

1. Einführung	- 3 -
2. Immunkontext der AML	- 6 -
2.1 Hintergrund	- 6 -
2.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge.....	- 6 -
2.2.1 Charakterisierung des Immunsystems von AML-Patienten in verschiedenen Erkrankungs- und Therapiestadien	- 6 -
2.2.2 Expression koinhibitorischer Moleküle als potentieller Mechanismus einer Immunevasion.....	- 9 -
2.3 Diskussion und Ausblick	- 11 -
3. Generierung von AML-spezifischen Immunantworten durch Vakzinierung mit Dendritischen Zellen	- 13 -
3.1 Hintergrund	- 13 -
3.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge.....	- 15 -
3.2.1 Entwicklung eines TLR7/8-basierten Protokolls zur Herstellung von Dendritischen Zellen mit verbesserter Immunogenität	- 15 -
3.2.2 Klinische Prüfung von TLR7/8-maturierten Dendritischen Zellen zur Postremissionstherapie für AML- Patienten	- 18 -
3.2.3 Optimierung von Vakzinierungsstrategien in der AML durch Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren.....	- 23 -
3.2.4 Evaluation von Dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut als alternative Vakzinierungsstrategie.....	- 25 -
3.3 Diskussion und Ausblick	- 27 -
4. T-Zell-Aktivierung durch Immunstimulatorische RNA als Therapieprinzip in der AML	- 30 -
4.1 Hintergrund	- 30 -
4.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge.....	- 31 -
4.2.1 Evaluation DNA-basierter Nanopartikel für den intrazellulären Transport kurzer RNA-Moleküle	- 31 -
4.2.2 In vivo Testung systemischer RIG-I Aktivierung durch 5'-Triphosphat-RNA in einem AML Modell.....	- 32 -
4.3 Diskussion und Ausblick	- 33 -
5. Einsatz von T-Zell-Rekrutierenden Antikörpern zur T-Zell-Aktivierung bei AML-Patienten	- 35 -
5.1 Hintergrund	- 35 -
5.2 Eigene wissenschaftliche Beiträge.....	- 36 -
5.2.1 T-Zell-Aktivierung in der AML durch Einsatz des CD33/CD3 bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpers AMG 330.....	- 36 -
5.2.2 T-Zell-Aktivierung in der AML durch Einsatz eines bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpers gegen CD3 und ein WT1-Peptid im Kontext von HLA-A*02.....	- 38 -
5.3 Diskussion und Ausblick	- 39 -
6. Aktuelle Entwicklung und Zukünftige Perspektiven	- 41 -
7. Danksagung	- 43 -
8. Abkürzungsverzeichnis	- 44 -
9. Literaturverzeichnis	- 47 -
10. Verzeichnis der eigenen Arbeiten	- 56 -

1. EINFÜHRUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen. Verursacht wird diese durch vielfältige genetische Veränderungen einschließlich chromosomaler Aberrationen, molekularer Mutationen, Modifikationen in nicht-kodierender RNA und epigenetischer Veränderungen. [13,64] Mit jährlich etwa 4,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern stellt die AML die häufigste Form einer akuten Leukämie beim Erwachsenen dar mit wachsender Inzidenz, insbesondere bei älteren Patienten: Im Alter von ≥ 65 Jahren steigt die Inzidenz auf 20,1 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. [62]

Unbehandelt führt die AML meist rasch, aber spätestens innerhalb von einem Jahr zum Tod. [79] Ihr klinisches Erscheinungsbild ist bestimmt durch zunehmende hämatopoetische Insuffizienz infolge der Infiltration des Knochenmarks durch die leukämischen Blasten. Die Behandlungsstrategien bei AML-Patienten werden stratifiziert anhand von genetischen Markern, Alter und Begleiterkrankungen. [23] Bis zu 30% der Patienten qualifizieren nicht für eine intensive Chemotherapie und werden daher palliativ behandelt. Die übrigen Patienten erhalten zunächst eine intensive Induktionstherapie mit dem Ziel, eine Remission (Reduktion der Leukämiezellzahl unter die Nachweisgrenze) zu erreichen und die normale Funktion des Knochenmarks wiederherzustellen. Die Erfolgsrate dabei ist generell hoch, jedoch erleidet die Mehrheit der Patienten in der Folge ein Rezidiv (Wiederauftreten der Erkrankung). Um dies zu vermeiden, sind verschiedene Post-Remissions-Strategien zur Eliminierung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) entwickelt worden. [11] Bei der derzeit effektivsten Post-Remissions-Therapie handelt es sich um eine allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT). [40] Allerdings ist nicht für jeden Patienten ein geeigneter Spender zu finden, und die Transplantation geht mit zahlreichen Nebenwirkungen einher, daher ist sie nur bei einem Teil der Patienten möglich.

Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, neue effektive Therapiekonzepte zu entwickeln, sowohl für die Primärtherapie als auch für die Postremission und im Rezidiv. Jahrzehntelange Bestrebungen, die gängigen Chemotherapie-Regime zu verbessern, haben nur geringe Fortschritte erbracht, erwähnenswert ist die Zulassung von CPX-351, einer liposomalen Formulierung der klassischerweise verwendeten Substanzen Cytarabin und Daunorubicin. [50] Hingegen kamen in den letzten Jahren sechs neue zielgerichtete molekulare Therapien zur Zu-

lassung, welche die Leitlinien zur Therapie der AML bereits wesentlich verändert haben: Midostaurin, Gilteritinib, Enasidenib, Ivosidenib, Glasdegib und Venetoclax. [8,41] Weitere Inhibitoren sind in klinischer Entwicklung. [71]

Ein wesentliches Feld zur Erforschung neuer Therapieansätze ist zudem die Tumor-Immuntherapie. Fortschritte in der Immuntherapie haben die Behandlungskonzepte in der Hämato-Onkologie im letzten Jahrzehnt sehr wesentlich verändert. In der soliden Onkologie werden immuntherapeutische Wirkstoffe, insbesondere Checkpoint-Inhibitoren (CPI), inzwischen häufig schon in der Erstlinie verwendet. In der Hämatologie wurden die Fortschritte in der Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze bisher überwiegend bei malignen B-Zell-Erkrankungen einschließlich der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erzielt. In der AML hingegen haben Therapiestrategien zur Modifikation des Immunsystems die klinische Anwendung erst in den letzten Jahren erreicht. [52,54,56] Verschiedene immuntherapeutische Mechanismen, die im Rahmen experimenteller AML-Therapien Anwendung finden, sind in Abbildung 1 dargestellt.

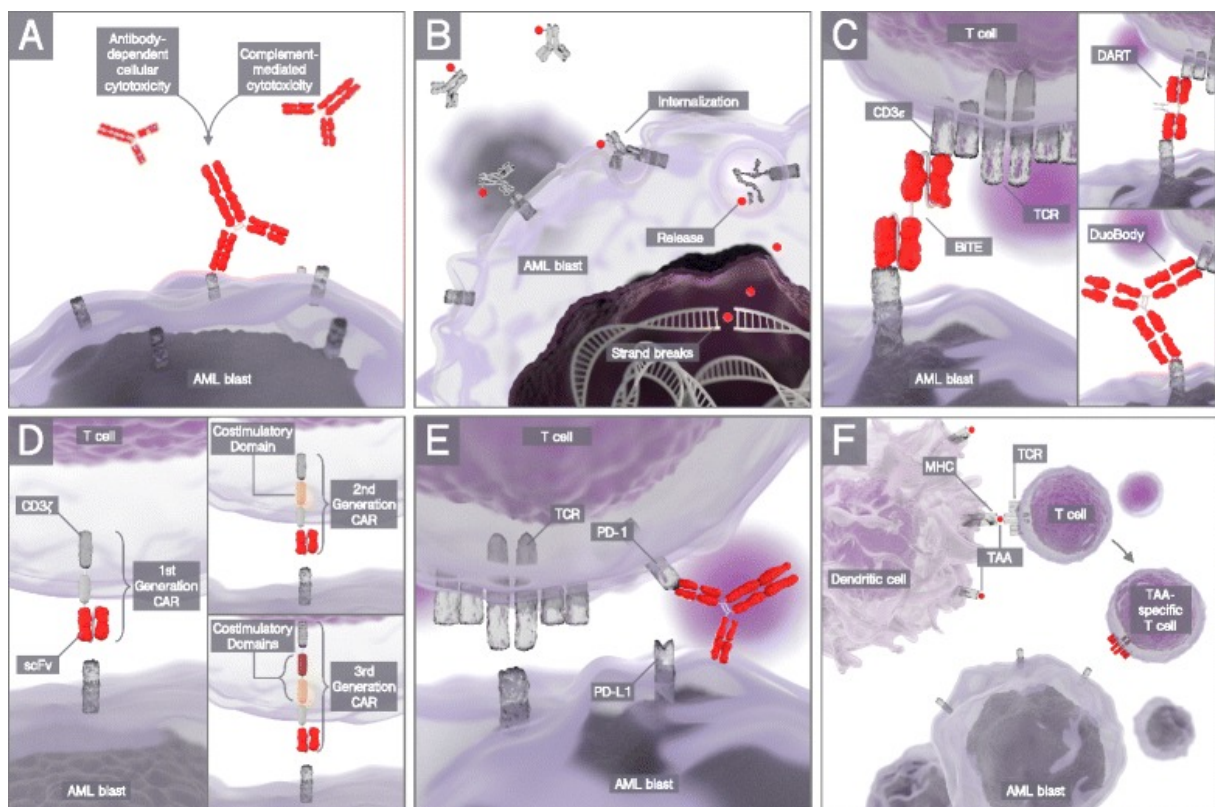


Abbildung 1: Mechanismen der Tumor-Immuntherapie im Kontext der AML. (A) Konventionelle Antikörper gegen AML-Oberflächenantigene; (B) Antikörper-Wirkstoff-Konjugate; (C) T-Zell-rekrutierende Antikörper-Konstrukte; (D) Chimäre Antigen-Rezeptor (CAR) T-Zellen; (E) Checkpoint-Inhibitoren; (F) Dendritische Zellen zur Vakzinierung. Abbildung aus [56].

Zu erwähnen ist, dass mit Gemtuzumab ozogamicin ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat 2017 die Zulassung für die Behandlung von Erwachsenen mit neu diagnostizierter CD33⁺ AML erhalten hat und damit als eine neuartige immuntherapeutische Option zur Verfügung steht. [3]

Im Rahmen dieser Arbeit werde ich hingegen insbesondere näher auf diejenigen Mechanismen eingehen, welche auf einer Aktivierung autologer T-Zellen basieren, nämlich T-Zell-rekrutierende Antikörper-Konstrukte, CPI und Vakzinierungskonzepte (Abbildung 1C, E und F). Ziel dieses Habilitationsprojektes war dabei stets, Erkenntnisse aus präklinischen Versuchen in klinische Studien zu translatieren, um neue Therapiestrategien für Patienten mit AML zu entwickeln.

2. IMMUNKONTEXT DER AML

2.1 HINTERGRUND

Grundsätzlich verfügt das menschliche Immunsystem über verschiedene Mechanismen, nicht körpereigene und auch entartete Zellen zu erkennen. Charakteristisch für die AML, wie auch für andere maligne Erkrankungen, ist jedoch die sogenannte Immunevasion: Durch bestimmte Merkmale der Leukämiezellen sowie den Einfluss des Tumormilieus auf die Immunzellen der Patienten werden die malignen Zellen vom Immunsystem nicht oder nicht vollständig beseitigt. [5] Zudem ist die AML eine Erkrankung mit einer geringen Mutationslast, damit zusammenhängend wenigen Neoepitopen und daher auch wenig ausgeprägten endogenen Immunantworten. Eine Monotherapie mit CPI, wie sie sich in den letzten Jahren für mehrere onkologische Erkrankungen (unter anderem Malignes Melanom, Bronchialkarzinom und Urothel-Karzinom) sowie den Morbus Hodgkin etabliert hat, setzt hingegen eine endogene Immunantwort gegen den Tumor voraus und ist bei der AML daher wenig aussichtsreich. [9] Eine bessere Charakterisierung des Immunsystems von AML-Patienten sowie eine Identifizierung potentieller Mechanismen der Immunevasion ist hilfreich für die Entwicklung zielgenauer immuntherapeutischer Strategien (als Monotherapien oder in Kombination) in der AML.

2.2 EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

2.2.1 *Charakterisierung des Immunsystems von AML-Patienten in verschiedenen Erkrankungs- und Therapiestadien*

Eigene Publikationen:

- Lichtenegger FS et al.: Impaired NK cells and increased T regulatory cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML. *Leuk Res.* 2014; 38(8):964-9.
- Schnorfeil FM, Lichtenegger FS et al.: T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol.* 2015 Jul 30; 8:93.

Eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz T-Zell-aktivierender Therapiestrategien sind Patienten-eigene T-Zellen in ausreichender Anzahl und mit hinreichender Funktion. Während verschiedene Defekte in der Funktion Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) bei AML-Patienten vielfach beschrieben sind [24,59], war über den T-Zell-Status vor einigen Jahren noch wenig bekannt. Eine differenzierte Betrachtungsweise der T-Zell-Funktion in verschiedenen

Krankheits- und Therapiephasen einer AML ist notwendig für einen zielgerichteten Einsatz T-Zell-aktivierender Therapien.

Zunächst untersuchten wir den Immunstatus von AML-Patienten in kompletter Remission (*complete remission*, CR) und im Verlauf einer zytotoxischen Erhaltungstherapie, welche zu diesem Zeitpunkt an unserem Zentrum standardmäßig als Postremissionstherapie durchgeführt wurde, falls ein Patient nicht für eine allo-SZT qualifizierte. [12] Es zeigte sich, dass Patienten in CR eine reduzierte Zahl an NK-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) aufwiesen. [53] Zudem konnten wir bestätigen, dass die NK-Zell-Aktivierung eingeschränkt ist. Die Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen zur Proliferation unterschied sich bei den untersuchten AML-Patienten jedoch nicht von einer Vergleichsgruppe gesunder Probanden (*healthy donors*, HD; siehe Abbildung 2). Im Verlauf der zytotoxischen Therapie nahm das proliferative Potential der CD4⁺ T-Zellen hingegen ab, bevor es sich an Tag 24 wieder erholte. Dies unterschied sich nicht wesentlich zwischen den verschiedenen Kombinationstherapien. Insbesondere nahm die T-Zell-Aktivität auch bei dem Cyclophosphamid-haltigen Therapieblock (Cytarabin subkutan 100 mg/m² alle 12 Stunden Tag 1-5 + Cyclophosphamid 1 g/m² intravenös Tag 3) ab. Eine immunmodulatorische Wirkung im Sinne einer Verstärkung von Immunantworten, wie für niedrig dosiertes Cyclophosphamid beschrieben [33], konnten wir in diesem Kontext nicht beobachten. Wir konstatierten daher, dass jegliche Therapie, deren Mechanismus auf funktionsfähigen autologen T-Zellen beruht, nicht von einer zytotoxischen Erhaltungstherapie begleitet werden sollte.

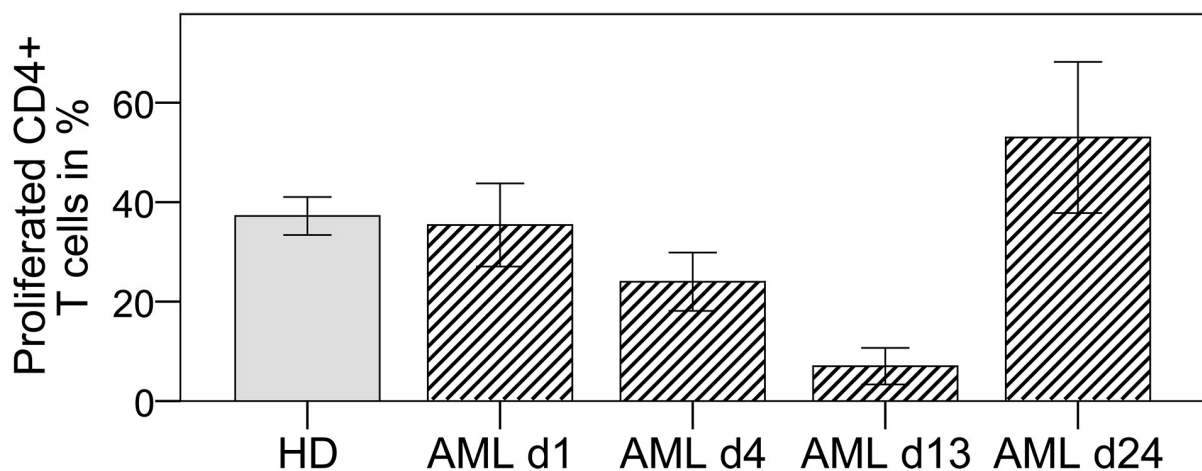


Abbildung 2: Die Proliferation der T-Helfer-Zellen von AML-Patienten in kompletter Remission ist identisch mit der gesunder Probanden (HD), nimmt aber im Laufe einer zytotoxischen Erhaltungstherapie ab. Abbildung aus [53].

Verschiedene Veränderungen in Phänotyp und Funktion von T-Zellen wurden für mehrere hämatologische Erkrankungen beschrieben, einschließlich adulter T-Zell-Leukämie/Lymphom

[46,74], chronischer myeloischer Leukämie (CML) [16,61] und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) [28,63,69]. Diese Beobachtungen wurden im Kontext der T-Zell-Erschöpfung interpretiert, die bei langanhaltender Aktivierung im Rahmen von chronischen viralen Infekten beschrieben ist. Diese ist definiert durch erhöhte Expression verschiedener inhibitorischer Rezeptoren (CD244, PD-1, CD160, TIM-3, LAG-3) auf T-Zellen in Kombination mit verringerter Effektor-Funktion (geringere Proliferation, verminderte Zytokin-Produktion, eingeschränkte Zytotoxizität) und schließlich Apoptose der T-Zellen. [88] Wir gingen daher der Hypothese nach, ob ähnliche Veränderungen auch bei AML-Patienten in verschiedenen Erkrankungsstadien gesehen werden.

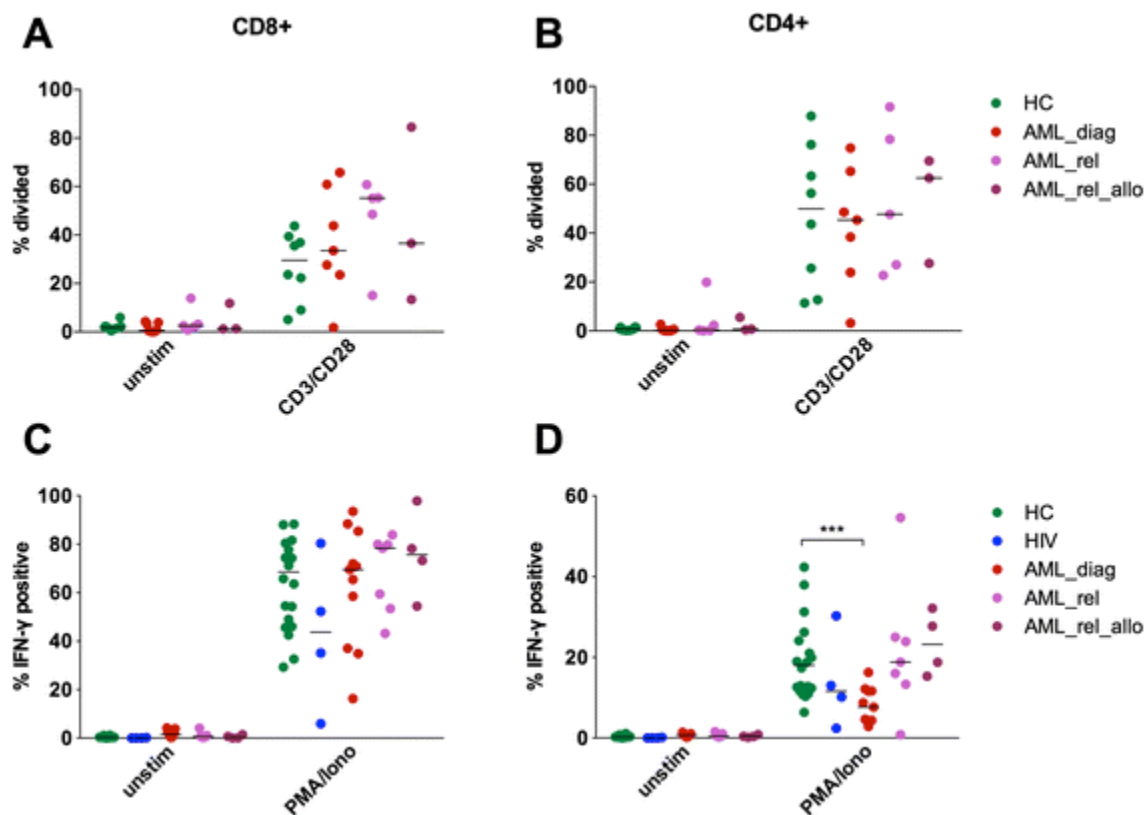


Abbildung 3: T-Zellen von AML-Patienten sind funktionell intakt. Proliferation (A, B) und IFN- γ Produktion (C, D) mit oder ohne unspezifischen Stimulus wurden für CD8 T-Zellen (A, C) und CD4 T-Zellen (B, D) aus dem peripheren Blut von AML-Patienten in verschiedenen Erkrankungsstadien (AML_diag = bei Erstdiagnose, AML_rel = im Rezidiv nach intensiver Chemotherapie, AML_rel_allo = im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation) verglichen mit gesunden Probanden (HC) und HIV-Patienten (HIV). Abbildung aus [72].

Wir untersuchten peripheres Blut und Knochenmark von AML-Patienten bei Erstdiagnose, im Rezidiv nach intensiver Chemotherapie und im Rezidiv nach allo-SZT im Vergleich zu gesunden Probanden und HIV-Patienten, bei welchen eine T-Zell-Erschöpfung beschrieben ist. [72] Es zeigte sich, dass T-Zellen von AML-Patienten im Rezidiv nach allo-SZT, nicht aber bei

Erstdiagnose, eine erhöhte Expression von PD-1 (*programmed cell death protein 1*) aufweisen. Funktionelle Defekte, sowohl bezüglich Proliferation als auch bezüglich Zytokin-Sekretion, wiesen die T-Zellen von AML-Patienten jedoch weder bei Erstdiagnose noch im Rezidiv auf, mit der einzigen Ausnahme einer verminderten IFN- γ Sekretion bei AML-Patienten in Erstdiagnose (siehe Abbildung 3). Diese wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz T-Zell-aktivierender Therapiestrategien für die AML ist daher erfüllt.

2.2.2 *Expression koinhibitorischer Moleküle als potentieller Mechanismus einer Immunevasion*

Eigene Publikationen:

- Lichtenegger FS et al.: RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Dec; 64(12):1505-15.
- Haubner S et al.: Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia.* 2019 Jan; 33(1):64-74.

Aus Untersuchungen insbesondere von AML-Patienten mit einem Rezidiv nach allo-SZT ist bekannt, dass AML-Zellen mittels verschiedener Mechanismen die Kontrolle durch das Immunsystem unterlaufen. [7] Hierzu gehört auch die Expression koinhibitorischer Moleküle. Zu diesen Untersuchungen haben wir beigetragen, indem wir die Expression zahlreicher koinhibitorischer Moleküle auf der Oberfläche der AML-Zellen in einer Vielzahl von Proben bei Erstdiagnose und im Rezidiv charakterisierten. Als von besonderem Interesse erwies sich in dieser Analyse das noch recht wenig untersuchte Molekül HVEM (*herpesvirus entry mediator*). [55] Wir konnten sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zeigen, dass AML-Zellen dieses Molekül exprimieren und dass diese Expression invers korreliert mit FLT3 (*fms-like tyrosine kinase 3*) ITD (*internal tandem duplication*) Mutationen sowie Mutationen in NPM1 (*nucleophosmin*), hingegen positiv korreliert mit bi-allelischen Mutationen in CEBPA (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*). Eine erhöhte HVEM-Expression war zudem assoziiert mit einem längeren Rezidiv-freien Überleben bei Patienten in der intermediären Risikogruppe nach der Klassifikation der *European LeukemiaNet* (ELN) sowie bei Patienten nach allo-SZT (siehe Abbildung 4).

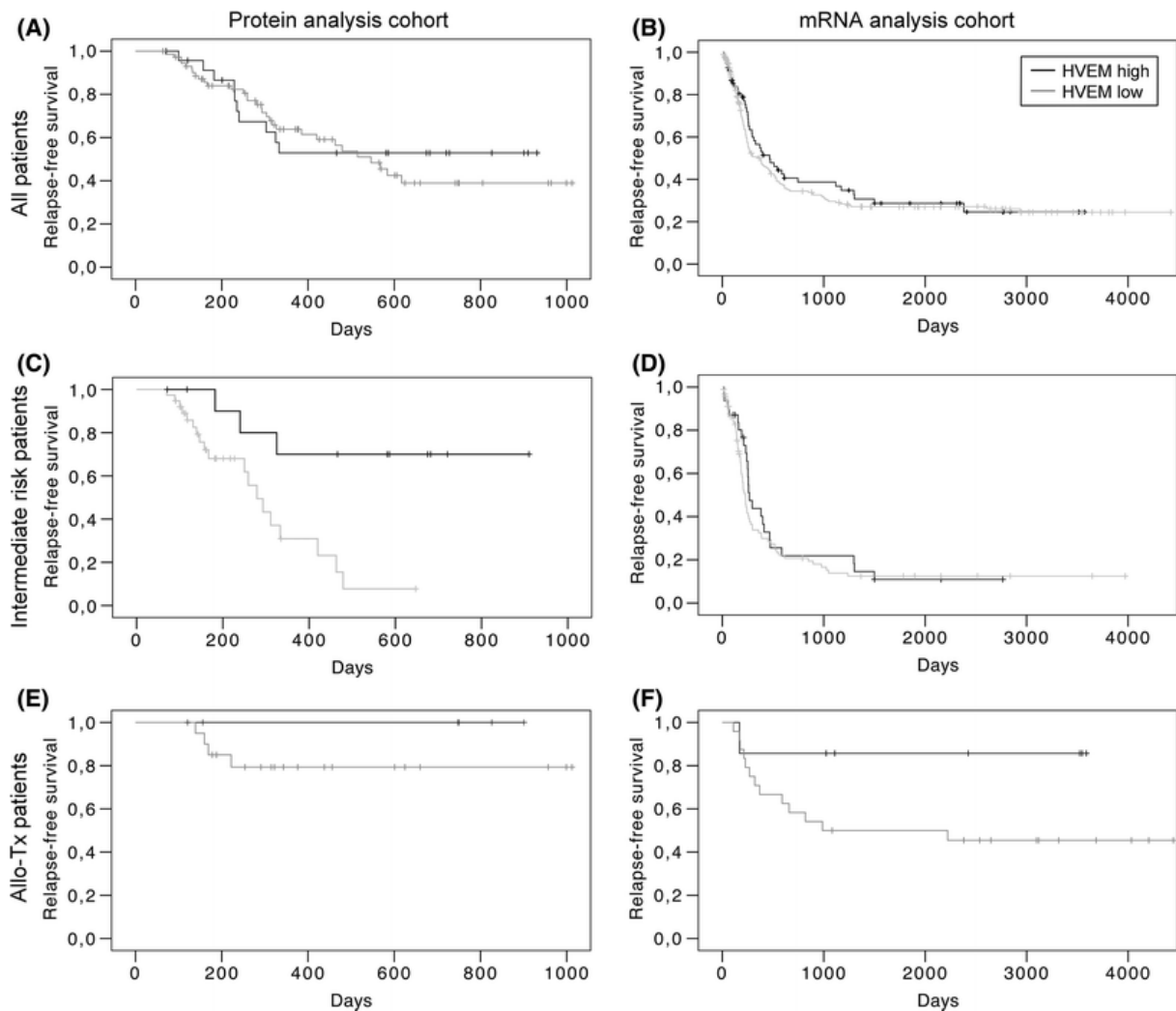


Abbildung 4: Eine erhöhte Expression von HVEM auf AML-Zellen ist in manchen Subgruppen assoziiert mit einem längeren Rezidiv-freien Überleben. Patienten in CR nach intensiver Chemotherapie wurden entsprechend ihrer HVEM-Expression in eine hohe (oberes Quartil) und eine niedrige (drei untere Quartile) Gruppe eingeteilt. Das Rezidiv-freie Überleben wurde zwischen beiden Gruppen verglichen für alle evaluierbaren Patienten (A, B), für alle Patienten in der intermediären Risikogruppe nach der ELN-Klassifikation (C, D) und für alle Patienten mit allo-SZT in 1. CR (E, F), jeweils sowohl in der Kohorte für die Analyse der Protein-Expression (A, C, E) als auch in der Kohorte für die Analyse der mRNA-Expression (B, D, F). Abbildung aus [55].

Auch weitere koinhibitorische Moleküle werden auf AML-Zellen exprimiert. Für TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) und CD244 zeigten wir dies im Rahmen einer größeren Untersuchung zur Koexpression leukämischer Stammzell-Marker zur kombinierten zielgerichteten Therapie. [30] Insbesondere CD244 wird dabei auch von leukämischen Stammzellen (LSZ) und im Rezidiv exprimiert (siehe Abbildung 5). Das Expressionsprofil von

AML-Blasten bezüglich PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) publizierten wir in einem anderen Kontext (siehe 5.2.1). [48]

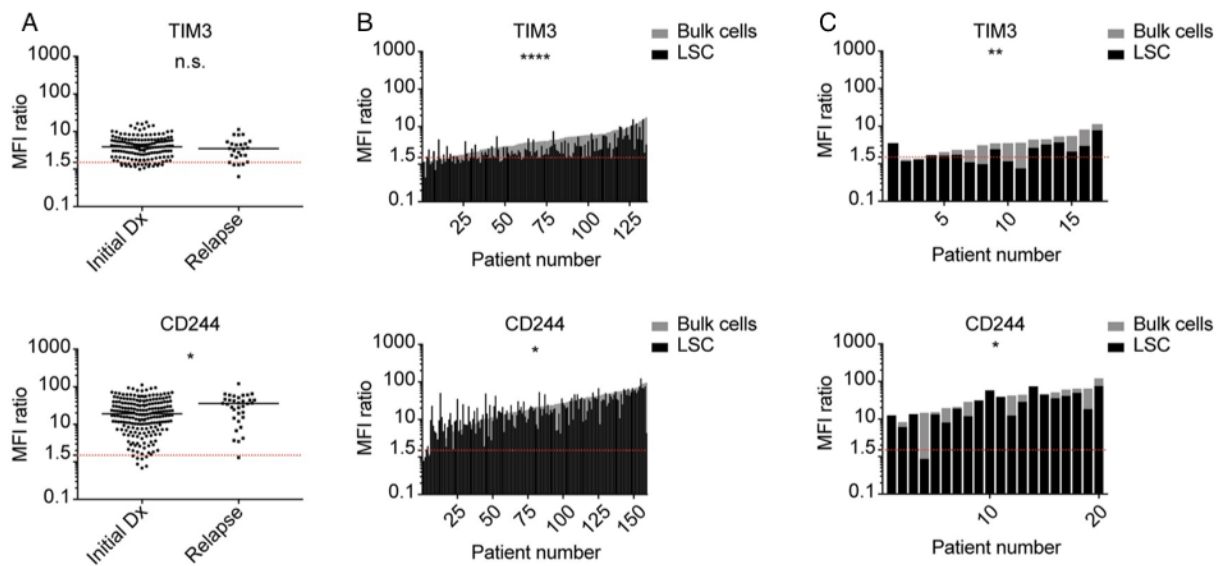


Abbildung 5: Die inhibitorischen Moleküle TIM-3 und CD244 werden auf AML-Zellen exprimiert. Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wurde auf primären AML-Proben bei Erstdiagnose (A, B) und im Rezidiv (A, C) durchflusszytometrisch gemessen. Insbesondere CD244 wurde auch auf leukämischen Stammzellen (hier englisch LSC) identifiziert. Abbildung aus [30].

2.3 DISKUSSION UND AUSBLICK

Art und Ausmaß einer Immunantwort ist sowohl durch die Effektor- als auch durch die Target-Zellen bedingt. In den hier vorgestellten Arbeiten konnten wir neue Kenntnisse bezüglich beider Seiten bei der T-Zell-Antwort auf primäre AML-Zellen beitragen. Einerseits konnten wir zeigen, dass autologe T-Zellen in den verschiedenen Krankheitsstadien sowohl quantitativ als auch qualitativ in der Lage sind, eine Immunantwort zu generieren, eine Kombination von T-Zell-aktivierenden Therapien mit einer zytotoxischen Erhaltungstherapie (oder anderen zytotoxischen Postremissionstherapien) aufgrund ausgeprägter Auswirkungen auf die Zahl und Funktion der T-Zellen jedoch wenig aussichtsreich erscheint (siehe 2.2.1). Andererseits trugen wir einige Erkenntnisse bezüglich der Expression inhibitorischer Moleküle auf primären AML-Zellen in Erstdiagnose und im Rezidiv und damit einen wichtigen Mechanismus der Immunevasion in der AML zusammen (siehe 2.2.2).

Die weitgehend erhaltene T-Zell-Funktion sowohl bei Erstdiagnose der AML als auch im Rezidiv wurde einige Jahre später durch eine weitere detaillierte Studie bestätigt. [89] Insbesondere wurde hier in immunhistochemischen Untersuchungen auch kein Hinweis auf eine T-Zell-Exklusion im Knochenmark gefunden. Andere Studien untersuchten im Detail einige funktionelle Unterschiede zwischen T-Zellen bei AML-Patienten und gesunden Spendern und insbesondere eine Reversibilität dieser Veränderungen unter intensiver Induktions-Chemotherapie oder einer Therapie mit CPI. [44,49] Nach aktuellem Wissensstand sind Zahl und Lokalisation der T-Zellen bei Erstdiagnose einer AML also normwertig; die T-Zell-Funktion ist etwas eingeschränkt, vor allem in der Rezidiv-Situation, dies ist jedoch reversibel, und der Einsatz T-Zell-aktivierender Therapien in der AML erscheint in dieser Hinsicht sehr plausibel.

In Bestätigung und Ergänzung unserer Arbeiten wurde die Expression von Immunrezeptoren auf primären AML-Zellen in weiteren Untersuchungen charakterisiert. [2,89] Diese Oberflächen-Moleküle durch CPI neuerer Generation zu blockieren, ist ein möglicher Ansatz, um die Immunevasion der AML-Zellen zu verhindern. Mehrere weitere Mechanismen der Immunevasion sind für die AML, insbesondere im Rezidiv nach allo-SZT, beschrieben, stellen jedoch nicht den Fokus dieser Arbeit dar. [7,83]

3. GENERIERUNG VON AML-SPEZIFISCHEN IMMUNANTWORTEN DURCH VAKZINIERUNG MIT DENDRITISCHEN ZELLEN

3.1 HINTERGRUND

Vakzinierungen sind eine bedeutsame immuntherapeutische Strategie, um (unter anderem) eine T-Zell-Antwort gegen bestimmte Antigene zu induzieren oder zu verstärken. In Bezug auf die AML gilt dies insbesondere für T-Zell-Antworten gegen intrazelluläre Leukämie-assoziierte Antigene (LAA). Immunisierungen mit LAA-Peptiden wurden mit mäßigem Erfolg in mehreren kleineren klinischen Studien untersucht. [22,52] Dendritische Zellen (DZ) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) sind ideal geeignet, um starke und dauerhafte Immunantworten zu induzieren. [87] In der Mehrzahl der DZ-basierten klinischen Vakzinierungsstudien wurden *ex vivo* aus Monozyten generierte DZ verwendet. Hierfür braucht es zwei Schritte: Zunächst werden die Monozyten mit IL-4 und GM-CSF kultiviert, um Monozyten zu unreifen DZ zu differenzieren. Klassischerweise wurden hierfür Kulturzeiten von 5-6 Tagen verwendet, jedoch konnte gezeigt werden, dass auch kürzere Kulturzeiten bis hinab zu 24 Stunden ausreichen. [19] Für die nächsten 24-48 Stunden werden die DZ durch Zugabe verschiedener Zytokine und anderer Substanzen zur Ausreifung (Maturierung) gebracht. Art und Konzentration dieser Substanzen sind entscheidend für die Charakteristika der resultierenden DZ. Zahlreiche verschiedene Maturierungs-Cocktails wurden für die Generierung von DZ verwendet [77], Goldstandard war dabei lange Zeit die Kombination aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂. [38] Dieses Protokoll wurde darauf optimiert, die Expression von Oberflächenmarkern als Zeichen der Ausreifung zu erhöhen sowie die Migration und einige immunstimulatorische Eigenschaften von DZ zu verbessern. Mit geringen Variationen wurde es für die meisten klinischen Studien verwendet, in denen *ex vivo* generierte DZ eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse von zwei etwas größeren Studien zum Einsatz von *ex vivo* generierten DZ in der Postremissionstherapie der AML werden hier kurz vorgestellt, eine detaillierte Übersicht haben wir kürzlich publiziert. [85] Vakzinierungen mit DZ nach Elektroporation mit mRNA für hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) führten zu Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten in 11/19 Patienten; das Rezidiv-freie Überleben (*relapse-free survival*, RFS) nach einer mittleren Beobachtungszeit von 52 Monaten war 58%. [43] Im Rahmen einer Phase II Studie mit DZ nach Beladung mit Wilms Tumor 1 (WT1) mRNA wurden anti-leukämische Antworten in 13/30 Patienten detektiert, eine molekulare Remission wurde in 9/30 Patienten erzielt, und das RFS sowie das Gesamt-Überleben (*overall survival*, OS) nach 5 Jahren waren

30.8% bzw. 50.0%. [1] In beiden Studien wurde die klassische Kombination von proinflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen für die DZ-Maturierung verwendet.

Primäre Blut-DZ (BDZ) stellen eine vielversprechende Alternative zu den Monozyten-generierten DZ dar, mit dem Vorteil, dass sie *in vivo* differenzieren und nur eine kurze *ex vivo* Behandlung benötigen und daher möglicherweise ihre funktionellen Eigenschaften besser erhalten und *in vivo* länger überleben. [76] Mindestens drei verschiedene BDZ-Populationen werden unterschieden: CD141+ myeloische DZ (cDZ1), CD1c+ myeloische DZ (cDZ2), und CD304+ plasmazytoide DZ (pDZ). In den letzten Jahren sind die ersten klinischen Studien unter Verwendung von BDZ durchgeführt worden und konnten die Sicherheit ihrer Verabreichung sowie eine gewisse Effektivität zeigen. Patienten mit fortgeschrittenem Melanom wurden mit pDZ vakziniert nach *ex vivo* Aktivierung mit einer Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Vakzine und Beladung mit Antigen. Die pDZ zeigten einen reifen Phänotyp und sekretierten hohe Mengen an Typ I-Interferonen. [82] Antigen-beladene, aber nicht aktivierte cDZ2 wurden für die Vakzinierung von Patienten mit einem Prostata-Karzinom verwendet, jedoch konnten keine Tumor-spezifischen Immunantworten detektiert werden. [66] In einer Studie an Patienten mit metastasiertem Melanom wurden die cDZ2 mit GM-CSF aktiviert, und 3/14 Patienten zeigten funktionelle Tumor-spezifische T-Zellen. [73] Die Autoren spekulieren, dass ein stärkerer Aktivierungsstimulus zu verbesserten Immunantworten führen könnte.

Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes wurde zunächst präklinisch ein Toll-like-Rezeptor (TLR)7/8-basiertes Protokoll zur Herstellung von DZ mit verbesserter Immunogenität aus autologen Monozyten entwickelt; die resultierenden DZ wurden im Vergleich zu den klassisch maturierten charakterisiert (siehe 3.2.1). Diese DZ prüften wir im Rahmen einer als von Wissenschaftlern initiierten Studie (*Investigator-Initiated Trial*, IIT) konzipierten Phase I Studie für die Postremissionstherapie von AML-Patienten. Die Ergebnisse dieser klinischen Studie und ihrer begleitenden Analysen stellen einen zentralen Bestandteil dieses Habilitationsprojektes dar (siehe 3.2.2). Ansätze zur weiteren Optimierung dieser immuntherapeutischen Strategie schließen die Kombination einer DZ-Vakzinierung mit CPI und den Einsatz von BDZ ein. Dieses Habilitationsprojekt beinhaltet sowohl eine Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass die Blockade von LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*, CD223) in der Kombination mit der Blockade von PD-1 besonders effektiv ist, um die Aktivierung von T-Zellen durch DZ zu verstärken (siehe 3.2.3), als auch eine Arbeit, in der nachgewiesen wurde, dass die Kombination aus einem TLR3- und einem TLR7/8-Liganden für die *ex vivo* Aktivierung zu einem optimalen immunstimulatorischen Profil der BDZ führt (siehe 3.2.4).

3.2 EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

3.2.1 *Entwicklung eines TLR7/8-basierten Protokolls zur Herstellung von Dendritischen Zellen mit verbesserter Immunogenität*

Eigene Publikationen:

- Beck B et al.: Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission. *J Transl Med.* 2011 Sep 13; 9:151-64.
- Lichtenegger FS et al.: CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-Like Receptor-Induced Dendritic Cells. *PLoS One.* 2012; 7(9):e44266.
- Subklewe M et al.: New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63:1093-103.

Wie bereits ausgeführt (siehe 3.1), ist die *ex vivo* Generierung von DZ aus Monozyten zeit- und arbeitsaufwendig, insbesondere bei Durchführung unter Reinraum-Bedingungen für eine klinische Anwendung. Zudem ist das in der großen Mehrzahl der bisherigen klinischen Studien mit DZ verwendete Maturierungs-Protokoll optimiert im Hinblick auf Expression von Oberflächenmarkern als Zeichen der Ausreifung, jedoch nicht auf die maximale Aktivierung von T-Zellen. In Kooperation mit der Gruppe von Frau Prof. Schendel am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München entwickelten wir ein neues Protokoll zur *ex vivo* Generierung von DZ, welches in zweifacher Hinsicht optimiert war zu den zuvor üblichen Protokollen. Zum einen wurde die Kulturzeit reduziert von 7-9 Tagen auf 3-4 Tage, zum anderen wurde das Maturierungs-Protokoll weiterentwickelt im Hinblick auf resultierende T-Zell-Aktivierung insbesondere durch Hinzunahme eines TLR7/8-Agonisten (R848).

Die derart hergestellten DZ, welche wir als TLR-3-DZ bezeichneten, wurden zunächst detailliert charakterisiert in Gegenüberstellung zu den mit dem klassischen Protokoll (*conventional cocktail*, cc) über 7 Tage (cc-7-DZ) oder über 3 Tage (cc-3-DZ) maturierten DZ sowie tolerogenen DZ (IL10-3-DZ). [51] Die Monozyten wurden dabei aus dem peripheren Blut von HD gewonnen. Wir konnten zeigen, dass sich TLR-3-DZ durch eine hohe Expression von kostimulatorischen gegenüber koinhibitorischen Molekülen auszeichnen sowie durch eine starke Sekretion von IL-12p70, einem wichtigen immunstimulatorischen Zytokin. Funktionell übersetzten sich diese Signale bei der Interaktion mit autologen T-Zellen im Vergleich zu den cc-3-DZ oder cc-7-DZ in eine signifikante Vermehrung von stimulatorischen aktivierten T-Zellen ge-

genüber T_{reg} sowie in eine deutliche Erhöhung von IFN- γ , welches von Typ 1 T-Zellen sekretiert wird (siehe Abbildung 6). Des Weiteren bewirkten TLR-3-DZ auch eine signifikante Verstärkung der NK-Zell-Aktivierung. Wir konnten zeigen, dass diese immunstimulatorischen Eigenschaften der TLR-3-DZ insbesondere auf der Expression von CD86 und der Sekretion von IL-12p70 beruhen.

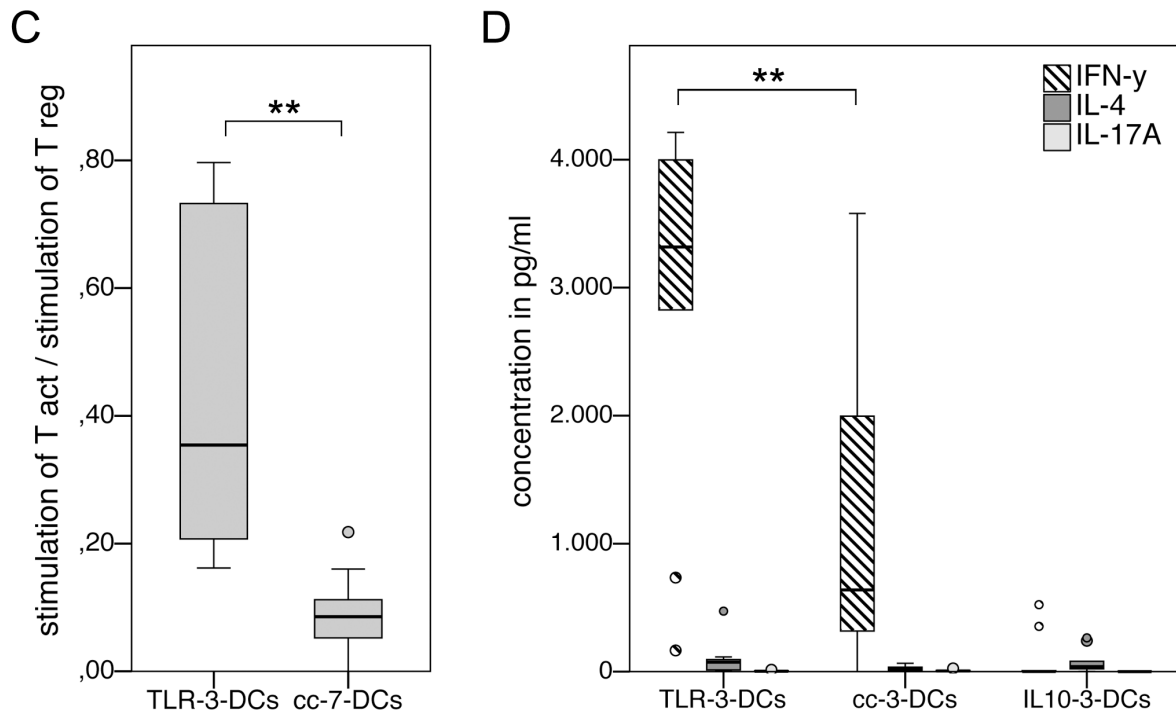


Abbildung 6: TLR-3-DZ induzieren verstärkt aktivierte, IFN- γ sekretierende T-Zellen. TLR-3-DZ, cc-7-DZ, cc-3-DZ und IL10-3-DZ wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern generiert und mit autologen Monozyten-depletierten mononukleären Zellen kultiviert. (C) Innerhalb der aktivierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurde die Ratio aus nicht-regulatorischen (FoxP3⁻CD127⁺) und regulatorischen (FoxP3⁺CD127⁻) T-Zellen gebildet. (D) Der Überstand aus der Kokultur wurde auf Sekretion von IFN- γ , IL-4 und IL-17A analysiert. Abbildung aus [51].

Das so etablierte Protokoll zur Generierung von DZ mit verbesserter Immunogenität wurde im nächsten Schritt übertragen von gesunden Probanden auf intensiv vorbehandelte AML-Patienten in CR. [6] Für vier im Detail etwas verschiedene Maturierungs-Protokolle, von denen eines identisch war zu dem später in der klinischen Studie verwendeten, konnten wir zeigen, dass die immunstimulatorischen Eigenschaften der TLR-3-DZ nicht von der Quelle der Monozyten abhängen (siehe Abbildung 7). Dies war eine wesentliche Voraussetzung zur klinischen Applikation von TLR3-DZ bei AML-Patienten.

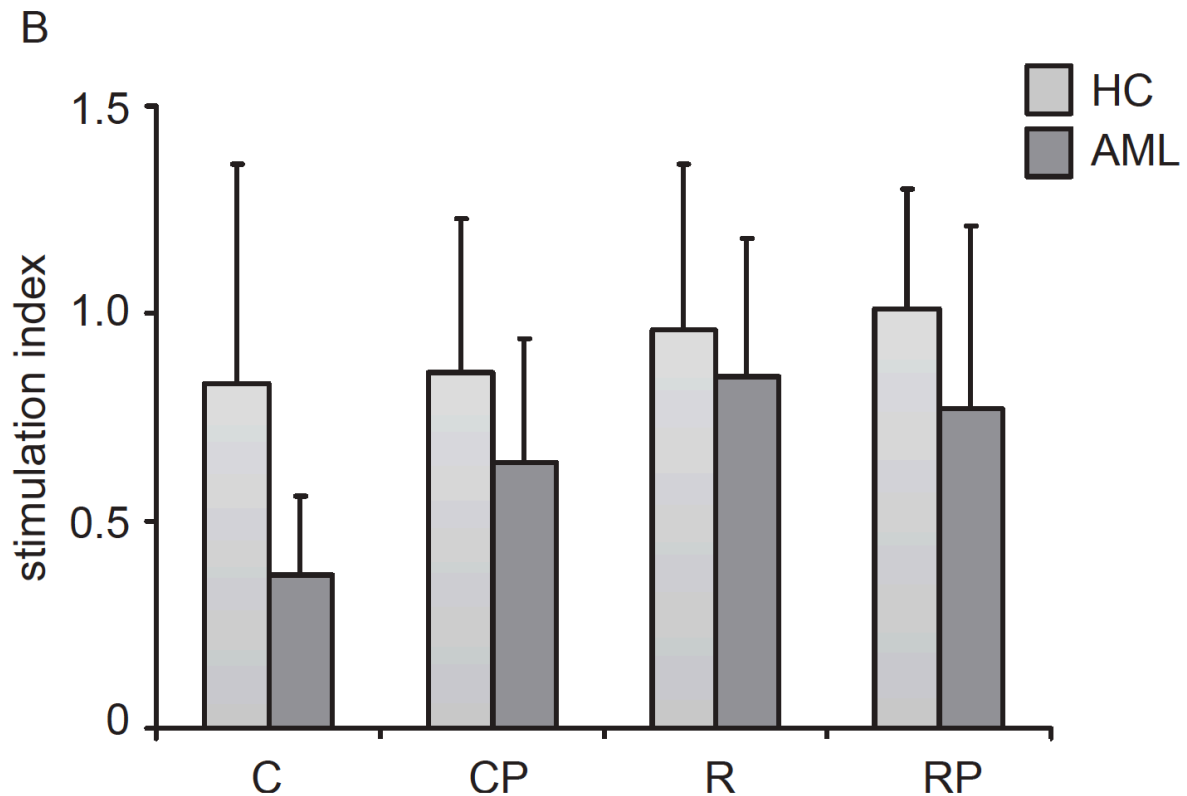


Abbildung 7: Die Aktivierung allogener T-Zellen durch TLR-3-DZ ist unabhängig von der Herkunft der DZ von gesunden Probanden oder AML-Patienten in CR. Im Detail etwas verschiedene Maturierungs-Cocktails (C = CL075 und R = R848 sind TLR7/8-Agonisten, P = poly-IC ist ein TLR-3 Agonist; der in der klinischen Studie verwendete Cocktail ist daher „R“) wurden verwendet, um die immunstimulatorischen Eigenschaften der DZ von gesunden Probanden und AML-Patienten zu vergleichen. Gezeigt ist hier das Ergebnis eines Proliferations-Assays; der Stimulations-Index gibt das Verhältnis proliferierender T-Zellen nach Kokultur mit DZ im Vergleich zu Aktivierung mit Phytohämagglutinin (PHA) an. Abbildung aus [6].

Dieses Protokoll wurde in Konformität mit guter Herstellungspraxis (*good manufacturing practice*, GMP) hochskaliert, um eine ausreichende Menge an DZ für eine Vakzinierung im klinischen Maßstab zu erhalten. Ausgangsprodukt war hierfür ein Leukapheresat. Für die Antigen-Beladung der DZ kamen prinzipiell verschiedene Möglichkeiten in Frage, insbesondere Peptide, Proteine oder RNA definierter Antigene, aber auch Tumorzell-Lysat. Die Entscheidung für Elektroporation von *in vitro*-transkribierter (ivt) RNA zur Beladung der DZ erfolgte, um die Vorteile eines oder mehrerer definierter Antigene mit der Unabhängigkeit vom Gewebe-Typ (humanes Leukozytenantigen, HLA) zu verbinden. [81] Insbesondere konnte durch unsere Kooperationspartner auch gezeigt werden, dass Elektroporation von ivt-RNA zu besserer T-Zell-Aktivierung durch die DZ führt als Elektroporation von totaler Tumor-RNA. [37] Der gesamte Prozess der Herstellung Antigen-beladener TLR-3-DZ ist in Abbildung 8 skizziert.

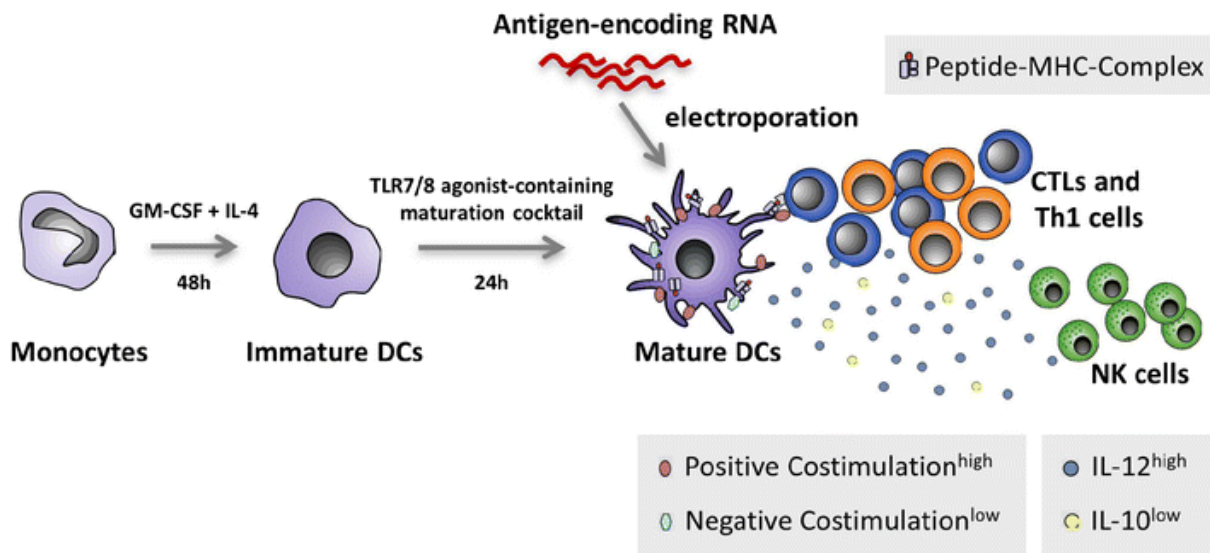


Abbildung 8: Prozess zur Herstellung Antigen-beladener TLR-3-DZ. Monozyten werden durch GM-CSF und IL-4 innerhalb von 48 Stunden zu unreifen DZ differenziert. Die Hinzugabe eines Maturierungs-Cocktails, welcher einen TLR7/8-Liganden beinhaltet, führt innerhalb von 24 Stunden zur Entwicklung reifer DZ, welche sich durch ein positives kostimulatorisches Profil und eine hohe Produktion von IL-12p70 auszeichnen. Nach Elektroporation mit Antigen-kodierender RNA sind diese DZ in der Lage, die T-Helfer-Zell-Antwort in Richtung Typ 1 zu polarisieren, Antigen-spezifische T-Effektor-Zellen zu stimulieren und NK-Zellen zu aktivieren. Abbildung aus [81].

3.2.2 Klinische Prüfung von TLR7/8-maturierten Dendritischen Zellen zur Postremissionstherapie für AML-Patienten

Eigene Publikationen:

- Lichtenegger FS et al.: Toll-like receptor 7/8-matured RNA-transduced dendritic cells as post-remission therapy in acute myeloid leukaemia: results of a phase I trial. Clin Transl Immunology. 2020 Mar 3; 9(3):e1117. doi: 10.1002/cti2.1117. eCollection 2020.

Auf der Grundlage der oben, vor allem in 2.2.1 und 3.2.1, zusammengefassten vorbereitenden Arbeiten führten wir eine Phase I Studie zur Erstanwendung von mit ivt-RNA beladenen TLR-3-DZ beim Menschen durch. AML-Patienten in CR mit hohem Risiko für ein Rezidiv (aufgrund von nicht-günstiger Risikogruppe oder MRD Positivität) konnten eingeschlossen werden, erhielten eine Leukapherese und wurden im Falle einer erfolgreichen DZ-Generierung aus den isolierten Monozyten bis zu 10 Mal innerhalb von 26 Wochen mit drei verschiedenen Chargen (jeweils ein Antigen je DZ-Charge) von je 5×10^7 DZ intradermal vakziniert.

Zur Antigen-Beladung wurde ivt-RNA verwendet, welche für die LAA WT1 und PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*) sowie das virale Protein hCMVpp65 (humanes Cytomegalie-Virus Phosphoprotein 65) kodieren. Die Wahl des Transkriptionsfaktors WT1 und des Tumor/Hoden-Antigens (*cancer testis antigen*) PRAME erfolgte auf der Grundlage einer Reihe von etablierten Kriterien wie der differentiellen Expression auf AML-Zellen und leukämischen Stammzellen versus hämatopoetischen Stammzellen, der Onkogenität, Immunogenität, der nachgewiesenen klinischen Effektivität sowie der Möglichkeit zum MRD-Monitoring. [14,81] Das in der Immunologie sehr etablierte und sehr immunogene virale Protein CMVpp65 wurde hinzugenommen, um eine Positivkontrolle für den Effekt der DZ-Vakzinierung zu haben und eine Adjuvanz-Wirkung durch lokale Inflammation bei starker Immunantwort zu erreichen. Die getrennte Beladung der DZ-Chargen mit jeweils nur einem Antigen erfolgte zur Vermeidung von Antigen-Kompetition, insbesondere zwischen dem sehr dominanten viralen Antigen und den beiden LAA. [42]

Primäres Ziel der Phase I Studie war es, die Machbarkeit der Generierung von DZ aus dem Plasmapheresat von AML-Patienten in Postremission sowie die Sicherheit ihrer intradermalen Applikation zu untersuchen. 13 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, 3 davon wurden nicht vakziniert, entweder wegen Erkrankungs-bezogenen Faktoren (zwei sehr frühe Rezidive noch vor der ersten Vakzinierung) oder wegen Faktoren im Zusammenhang mit der Vakzinproduktion (ein Patient mit hoher IL-10 Sekretion der generierten DZ). Für die anderen 10 Patienten reichten die generierten DZ für die im Protokoll geforderten mindestens 6 Vakzinierungen mit allen drei Antigen-beladenen DZ-Chargen aus. Dies betont zum einen das sehr hohe Rezidiv-Risiko der eingeschlossenen Patienten-Population, zum anderen die hohe Erfolgsrate (>90%) für die Produktion von DZ mit hoher Sekretion von IL-12p70 und niedriger Sekretion von IL-10. Die mediane Zeit zwischen Leukapherese und Start der Vakzinierung betrug dabei 25 Tage, was aufgrund der aufwendigen Logistik im Studiensetting mit Transport des Plasmapheresates in ein kooperierendes GMP-Labor in Oslo als recht zügig zu bewerten ist.

Insgesamt wurden bei den 10 Patienten 105 Vakzinierungen durchgeführt, in mehreren Patienten auch über den im Studienprotokoll festgelegten Zeitrahmen hinaus. Es wurden ausschließlich vorübergehende Nebenwirkungen gesehen, und bis auf ein Fieber Grad 3 waren alle Nebenwirkungen nur Grad 1-2. Häufigste Nebenwirkungen waren Hautreaktionen (Rötung, Verhärtung, Juckreiz), welche in 100% der Patienten an der Vakzinierungsstelle sowie in 50% auch außerhalb der Vakzinierungsstellen auftraten, stets in Grad 1, sowie muskuloskelettale Schmerzen (60%, Grad 1-2). Obwohl DZ mit verbesserten immunstimulatorischen Eigenschaften im

Vergleich zu früheren Vakzinierungsstudien eingesetzt wurden, erwies sich die Verträglichkeit der Therapie daher als ausgesprochen gut.

Als sekundäres Ziel der Studie untersuchten wir Immunantworten auf die erfolgte Vakzinierung. Die lokale Immunantwort wurde 48 Stunden nach der 5. Vakzinierung bestimmt, dabei waren bei allen Patienten und allen Antigenen eine Rötung und Induration zu sehen; bei 9 Patienten konnte auch eine Hautbiopsie von der Vakzinierungsstelle gewonnen werden. In der immunhistochemischen Analyse dieser Biopsien zeigte sich eine dichte Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 9).

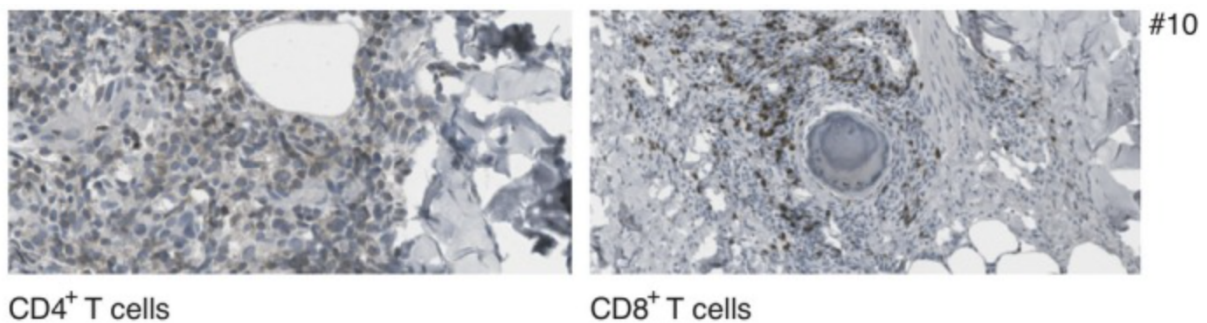


Abbildung 9: Intradermale Vakzinierung mit TLR7/8-maturierten Dendritischen Zellen führt zu lokaler T-Zell-Infiltration. Immunhistochemische Analysen von Hautbiopsien von der Vakzinierungsstelle zeigen dichte Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Abbildung aus [58].

Systemische Immunantworten auf die verwendeten Antigene wurden im peripheren Blut vor der ersten, nach der fünften Vakzinierung und am Studienende mittels ELISpot (*enzyme-linked immune absorbent spot*) und Multimer-Färbung bestimmt (siehe Abbildung 10). Eine verstärkte Immunantwort nach der Vakzinierung wurde mittels ELISpot in 2/10 Patienten für WT1, in 4/10 Patienten für PRAME und in 9/10 Patienten für CMV gesehen; diese Ergebnisse wurden mittels Multimer-Färbung weitgehend bestätigt. Die Antworten auf das CMV-Antigen pp65 waren generell deutlich höher (siehe Abbildung 10c, d, g und h). Dabei wurden sowohl die Expansion präexistierender Immunantworten (siehe Abbildung 10c, g) als auch die Induktion neuer Immunantworten (siehe Abbildung 10d, h) beobachtet. Mittels Multimer-Färbung konnten neben CD8⁺ T-Zellen auch Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10i). Die Immunantworten auf die beiden LAA waren deutlich niedriger, aber dennoch in einigen Patienten deutlich detektierbar (siehe Abbildung 10a, b, e und f). Teilweise kann dieser Unterschied auf methodische Restriktionen zurückgeführt werden, etwa beschränkte Verfügbarkeit von HLA-spezifischen Multimeren und einen zufälligen Mix von Pep-

tiden unterschiedlicher Länge für den ELISpot, daher konnten vermutlich nicht alle LAA-spezifischen T-Zellen detektiert werden. Dennoch spielen die Unterschiede zwischen einem viralen Antigen und einem Autoantigen sicherlich eine Rolle.

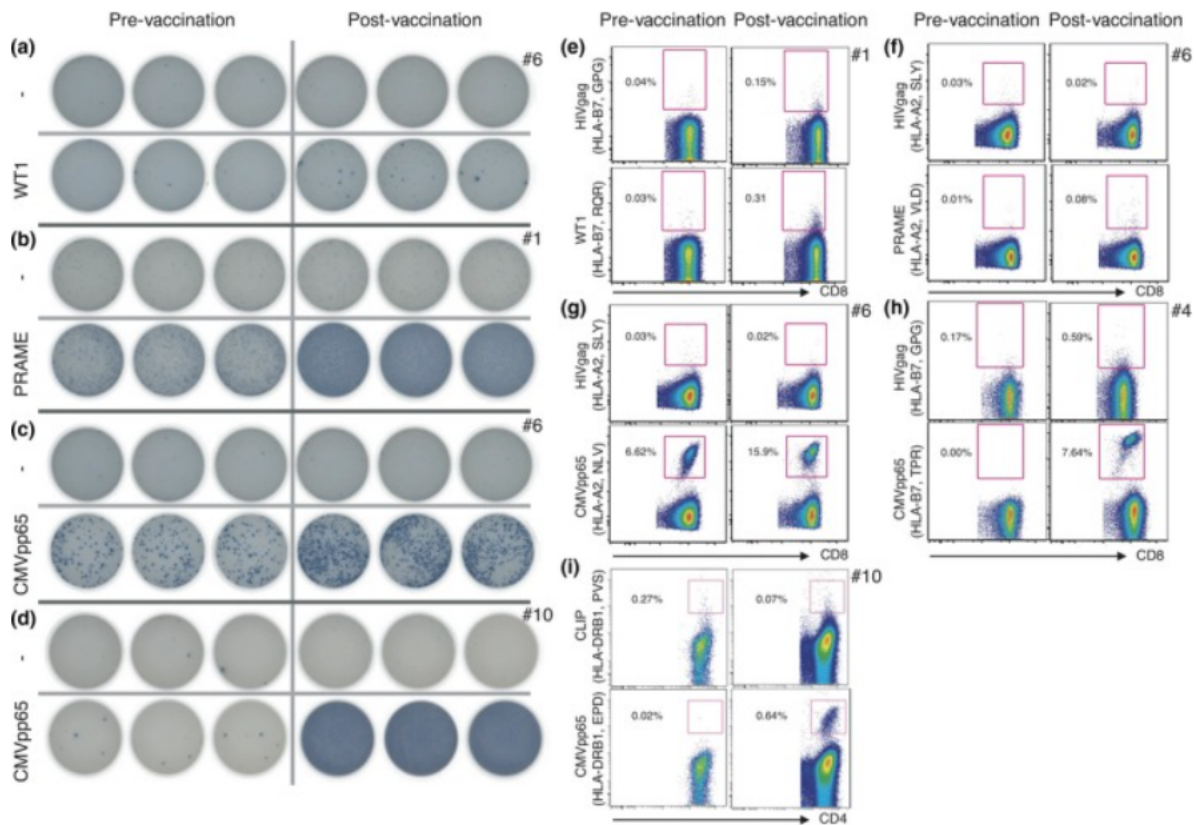


Abbildung 10: Vakzination mit TLR7/8-maturierten Dendritischen Zellen führt zu systemischer Immunantwort auf die verwendeten Antigene. Mononukleäre Zellen wurden vor und nach Vakzination aus dem peripheren Blut isoliert und mittels ELISpot (a-d) und Multimerfärbung (e-i) auf Antigen-spezifische Zellen getestet. Erhöhte Immunantworten konnten sowohl gegen die Leukämie-assoziierten Antigen WT1 (a, e) und PRAME (b, f) als auch gegen CMVpp65 (c, d, g, h, i) nachgewiesen werden. Abbildung aus [58].

Trotz des einarmigen Phase I Designs und der beschränkten Patientenzahl werteten wir explorativ auch klinische Endpunkte aus. Von den 10 vakzinierten Patienten rezidierten 3 bereits im Verlauf der Vakzinationen und 2 weitere nach dem Ende der Behandlung. Die anderen 5 Patienten waren zum Stichtag für die Auswertung der Studie weiterhin in CR. Die zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven für RFS und OS sind in Abbildung 11 wiedergegeben. Diese klinischen Verläufe wurden mit einer passenden Kohorte von 88 Patienten aus dem AML-CG (*Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*) Register verglichen. Hieraus konnte ein Hinweis auf einen vorteilhaften Effekt der Vakzination bezüglich des RFS abgeleitet werden (Median von 1084 vs. 396 Tagen, siehe Abbildung 11b). Dieser Unterschied war besonders auffällig bei

jüngeren Patienten und bei Patienten mit Immunantworten, die durch die Vakzine ausgelöst wurden. Jüngere Patienten (≤ 65 Jahre) hatten ein signifikant besseres OS und RFS als ältere Patienten (> 65 Jahre). In der jüngeren Kohorte rezidierten nur 2 von 7 Patienten, und 6 von 7 waren am Stichtag noch am Leben (siehe Abbildung 11c und d).

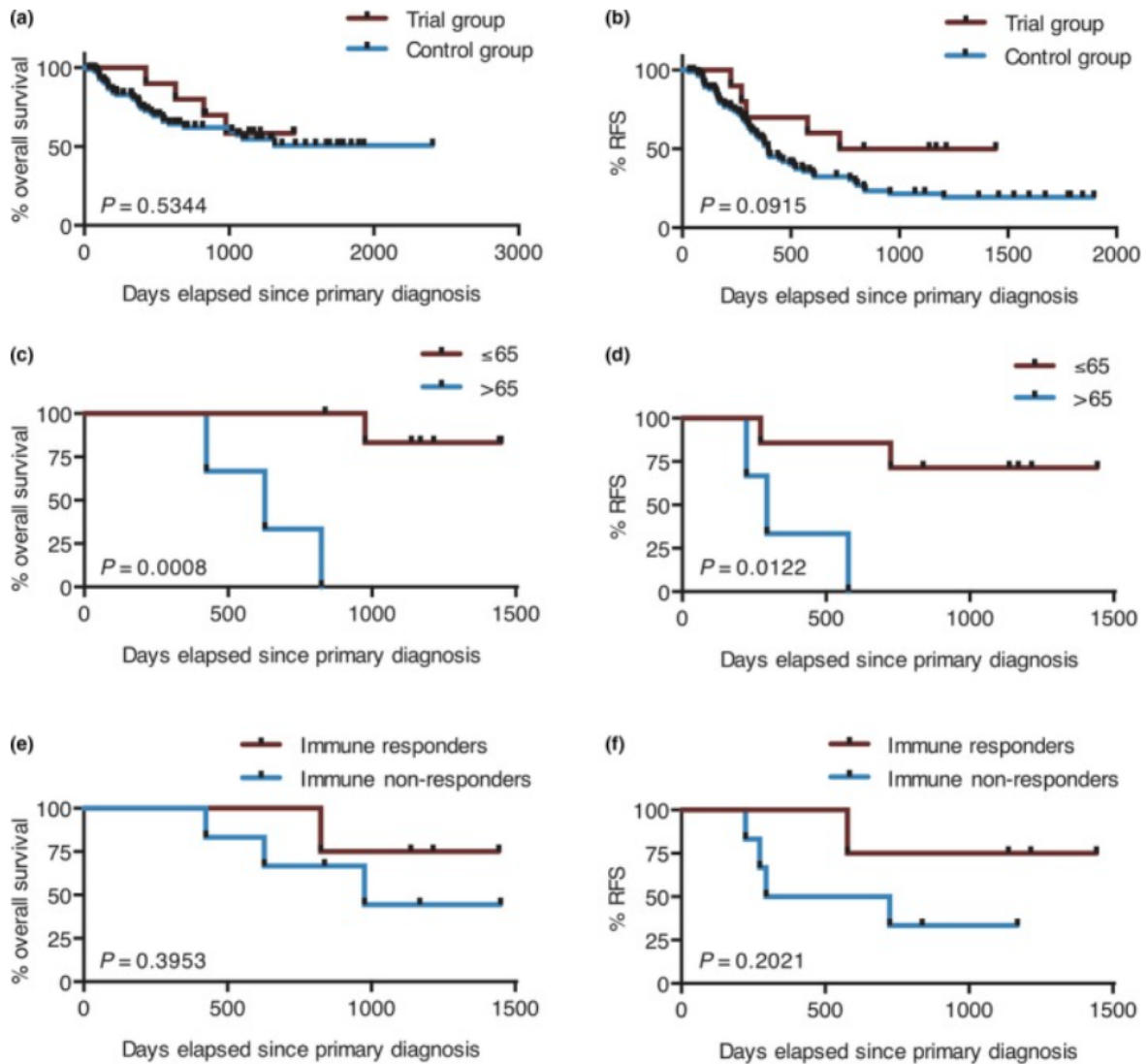


Abbildung 11: Überlebensanalysen ergeben Hinweise auf verbesserte Prognose der vakzinierten Patienten, insbesondere für jüngere Patienten und Patienten, die eine Immunantwort entwickeln.

Gesamtüberleben (OS) (a, c, e) und Rezidiv-freies Überleben (RFS) (b, d, f) der vakzinierten Patienten wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven visualisiert und mittels Log-Rank Test verglichen. (a, b) Innerhalb der Studie vakzinierte Patienten wurden mit einer passenden Kohorte von 88 Patienten aus dem AML-CG Register verglichen. (c, d) Innerhalb der Studienkohorte wurden Patienten ≤ 65 Jahre und > 65 Jahre zum Zeitpunkt der Diagnose verglichen. (e, f) Patienten mit einer Immunantwort, definiert als Zunahme der LAA-spezifischen T-Zellen nach Vakzinierung, wurden mit den Patienten ohne Immunantwort verglichen. Abbildung aus [58].

Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit einer weiteren Publikation, in der ein OS-Vorteil insbesondere in der jüngeren Kohorte gesehen wurde. [1] Dies ist möglicherweise begründet in dem größeren Pool an naiven T-Zellen in jüngeren AML-Patienten, welche für eine Induktion neuer anti-leukämischer Immunantworten erforderlich sind. [72] Zudem korrelierten durch die Vakzinierung verstärkte Immunantworten gegen WT1 und PRAME mit einem verlängerten OS und RFS (siehe Abbildung 11e und f). Insbesondere waren alle drei Patienten aus der jüngeren Kohorte mit einer Leukämie-spezifischen Immunantwort zum Stichtag noch in CR.

Zusammenfassend konnte in dieser Phase I Studie gezeigt werden, dass die Vakzinierung von Hochrisiko AML-Patienten mit ivt-RNA beladenen TLR-3-DZ machbar und sicher ist und zur Induktion von Leukämie-spezifischen Immunantworten führte. Ein explorativer Vergleich legt einen positiven Effekt auf den klinischen Verlauf insbesondere bei jüngeren Patienten und bei Patienten mit einer Immunantwort nahe. Da eine Vakzinierung als Monotherapie klinisch dennoch nicht effektiv genug für eine weitere Entwicklung erscheint, kommen mehrere alternative immuntherapeutische Strategien infrage. Diese schließen die Kombination der DZ-Vakzinierung mit CPI sowie alternativ den klinischen Einsatz von BDZ ein.

3.2.3 Optimierung von Vakzinierungsstrategien in der AML durch Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren

Eigene Publikationen:

- Lichtenegger FS, Rothe M et al.: Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol.* 2018 Feb; 9:385. doi: 10.3389/fimmu.2018.00385

Durch die Gabe von CPI können endogene T-Zell-Antworten gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) erfolgreich reaktiviert werden. Dies führt zu einem signifikant verlängerten OS für zahlreiche Tumor-Entitäten. Für Tumorerkrankungen mit geringen endogenen Immunantworten wie die AML hat diese Therapiemodalität bisher jedoch keinen klaren klinischen Vorteil gezeigt. Außer in der molekularen Synapse zwischen Tumorzellen und T-Zellen spielen koinhibitorische Moleküle jedoch auch in der Interaktion zwischen DZ und T-Zellen eine Rolle.

Wir untersuchten daher in dieser Studie, welchen Einfluss die Blockade der koinhibitorischen Moleküle PD-1, HVEM, CD244, TIM-3 und LAG-3 auf die Proliferation und Zytokin-Sekretion von T-Zellen nach Stimulation mit autologen TLR-3-DZ hat. In diesem Kontext zeigte sich, dass die Blockade von LAG-3 den stärksten Effekt auf die T-Zell-Aktivierung hat im Vergleich zu den anderen Molekülen, insbesondere auch zu PD-1/PD-L1 (siehe Abbildung 12).

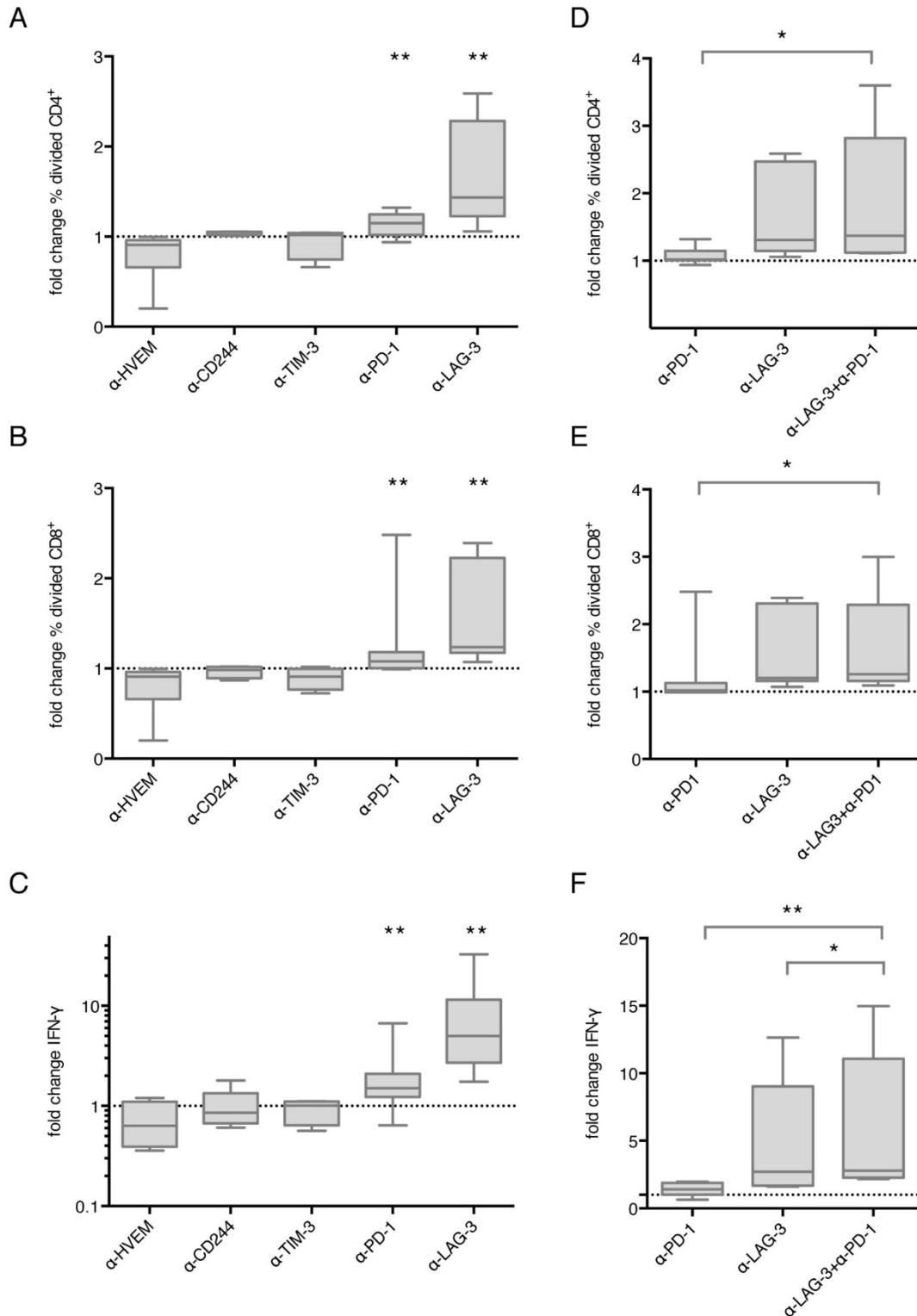


Abbildung 12: Blockade von LAG-3 alleine oder in Kombination mit PD-1 bewirkt den stärksten positiven Effekt auf Proliferation und IFN- γ Sekretion der T-Zellen nach Stimulation mit TLR-3-DZ. CD3⁺ T-Zellen von gesunden Probanden wurden in Gegenwart verschiedener Checkpoint-Inhibitoren mit TLR-3-DZ kokultiviert, welche mit einem Pool viraler und bakterieller Peptide beladen waren. Gezeigt ist die Proliferation von CD4⁺ (A, B) sowie CD8⁺ (C, D) T-Zellen und die IFN- γ Sekretion aller T-Zellen. Abbildung aus [57].

Dieses Ergebnis war konsistent sowohl zwischen verschiedenen Methoden, die T-Zell-Aktivierung zu messen (Proliferation, Sekretion von IFN- γ), als auch zwischen verschiedenen stimulatorischen Antigenen (Pool aus viralen und bakteriellen Peptiden, spezifisches virales Antigen, spezifisches Tumor-Antigen), und wurde sowohl für CD4⁺ als auch für CD8⁺ T-Zellen beobachtet. Nur unter Bedingungen mit schwachem Antigen-Stimulus konnte dieser Effekt durch die duale Blockade von LAG-3 und PD-1 noch verstärkt werden.

Aus dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass das Priming neuer Immunantworten durch die Blockade von LAG-3, ggf. in Kombination mit einer Blockade von PD-1, deutlich verstärkt werden kann. Dies ist als interessante Option zu sehen, um in Zukunft den immunologischen und klinischen Effekt einer DZ-Vakzinierung zu verstärken. Zunächst jedoch führten die Erkenntnisse dieser Arbeit zur Realisierung einer Phase II Studie (IIT) zum Einsatz des LAG-3 Antikörpers Relatlimab in Kombination mit dem PD-1 Antikörper Nivolumab und Azacytidin zur Behandlung von Patienten mit rezidivierender oder refraktärer AML (AARON, EudraCT 2018-002939-21). Der erste Patient konnte am 03.05.2021 in diese Studie eingeschlossen werden.

3.2.4 *Evaluation von Dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut als alternative Vakzinierungsstrategie*

Eigene Publikationen:

- Hänel G et al., Lichtenegger FS, Subklewe M: Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 2021 Nov 25;1-14. doi: 10.1007/s00262-021-03109-w. Online ahead of print.

Wie in 3.1 ausgeführt, könnten BDZ eine mögliche Alternative zu Monozyten-generierten DZ für Vakzinierungs-Strategien darstellen. Ihr wesentlicher Vorteil ist, dass sie durch die *in vivo* Differenzierung und kurze *ex vivo* Behandlung ihre funktionellen Eigenschaften besser erhalten und *in vivo* länger überleben. Frühe klinische Studien bei Melanom- und Prostata-Karzinom-Patienten zeigten vielversprechende Ergebnisse, jedoch wurde diskutiert, dass ein stärkerer als der dort verwendete Aktivierungsstimulus zu verbesserten Immunantworten führen könnte.

Ziel unserer Untersuchungen war, ein Protokoll zu identifizieren, mit dem BDZ optimal *in vitro* aktiviert werden können. Insbesondere evaluierten wir verschiedene Kombinationen von TLR-Liganden.

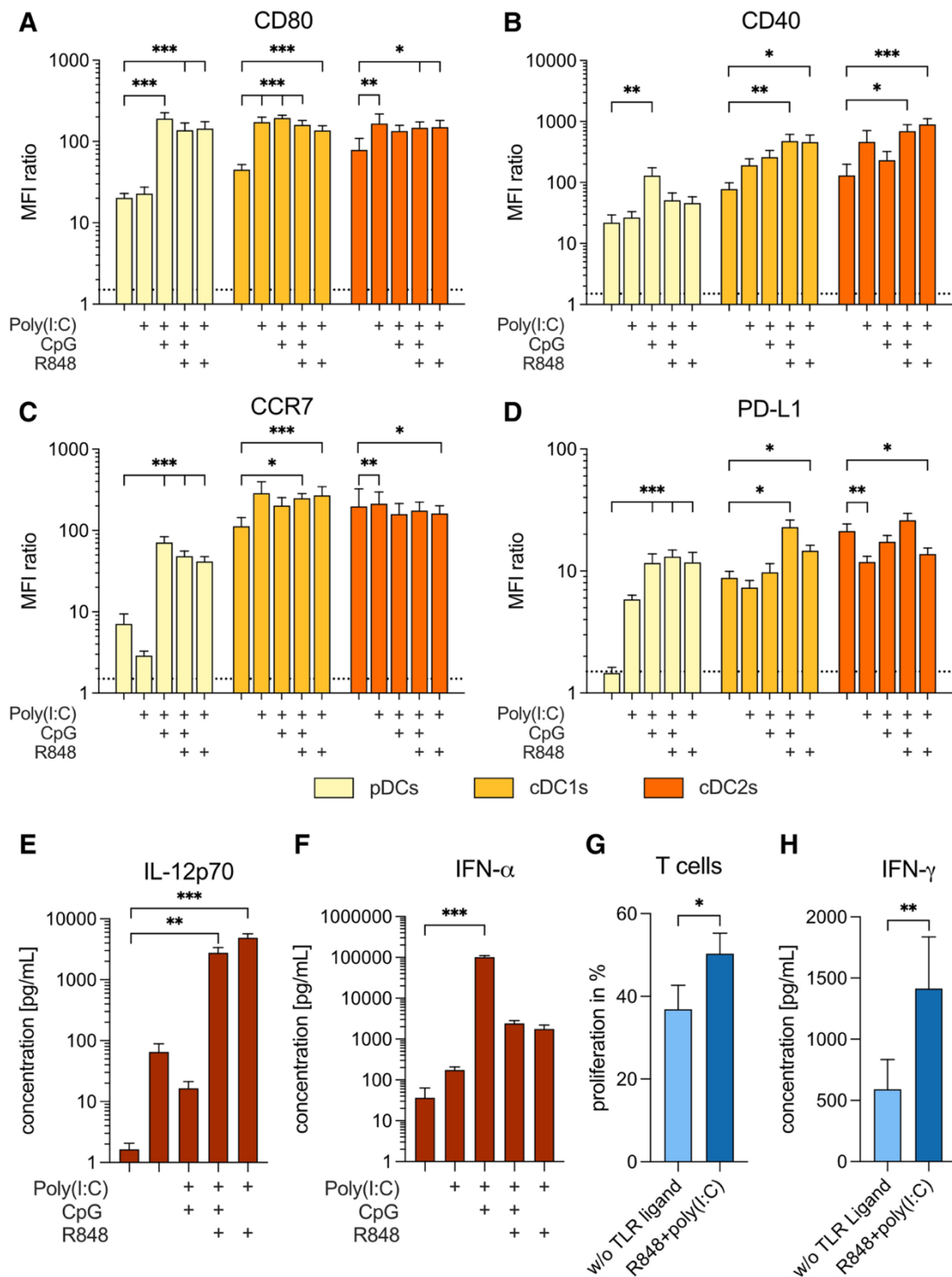


Abbildung 13: Die Stimulation durch Poly(I:C) und R848 führt zur optimalen Aktivierung von Dendritischen Zellen aus peripherem Blut. Verschiedene Kombinationen von TLR-Liganden wurden verglichen in Bezug auf die simultane Aktivierung der drei untersuchten BDZ-Populationen (englisch pDCs, cDC1s, cDC2s). Dargestellt ist die Expression von CD80 (A), CD40 (B), CCR7(C) und PD-L1 (D) auf den BDZ-Populationen sowie die Sekretion von IL-12p70 (E) und IFN- α (F) durch BDZ nach Aktivierung (n=6). Die Proliferation (G) und IFN- γ Sekretion (H) von T-Zellen wurde verglichen nach Kokultivierung mit BDZ mit und ohne Stimulation durch TLR-Liganden (n=14-16). Abbildung aus [31].

Es zeigte sich, dass die Kombination aus dem TLR3-Liganden *polyinosinic:polycytidylic acid* [poly(I:C)] und dem TLR7/8-Liganden R848 die beste der getesteten Kombinationen ist, um ein positiv kostimulatorisches Profil auf allen BDZ-Populationen zu induzieren. Zudem führte dieser Aktivierungsstimulus zu einer hohen Sekretion von IFN- α und IL-12p70 durch die BDZ (siehe Abbildung 13). Wir konnten nachweisen, dass die simultane Aktivierung der drei Populationen zu erhöhten immunstimulatorischen Eigenschaften führt im Vergleich zu getrennter maßgeschneiderter Aktivierung von pDZ und cDZ, am ehesten bedingt durch synergistische Interaktionen zwischen den Populationen. Die Stimulation von BDZ mit diesem Protokoll resultierte in verbesserter Migration, hoher NK-Zell-Aktivierung und starker Antigen-spezifischer T-Zell-Induktion.

Unsere Schlussfolgerung aus dieser Arbeit ist, dass die simultane *in vitro* Aktivierung aller BDZ-Populationen mit einer Kombination aus poly(I:C) und R848 stark immunstimulatorische DZ generiert. Dieses Protokoll ist daher eine vielversprechende Voraussetzung für eine mögliche Testung einer BDZ-Vakzinierung in Monotherapie oder in Kombination mit anderen immuntherapeutischen Strategien.

3.3 DISKUSSION UND AUSBLICK

In den detaillierten präklinischen Arbeiten zur Vorbereitung der Phase I Studie (siehe 3.2.1) konnten wir vielfach zeigen, dass die Verkürzung der *in vitro* Differenzierungszeit und die Hinzunahme von TLR-Liganden (insbesondere TLR7/8) bei der DZ-Aktivierung zur Generierung von DZ mit sehr ausgeprägten immunstimulatorischen Eigenschaften führt. Insbesondere im Hinblick auf die Sekretion von IL-12p70 und in der Folge die Aktivierung von Typ 1 T-Zellen sind diese den DZ, die in der Mehrzahl der klinischen Studien bisher eingesetzt wurden, deutlich überlegen.

Diese Ergebnisse konnten in der Folge nur teilweise in das klinische Setting translatiert werden. Die Generierung von DZ aus dem Plasmapheresat von AML-Patienten in Postremission erwies sich als machbar, und ihre Verabreichung als ausgesprochen verträglich. Gegen das virale Antigen hCMVpp65 wurden in der durchgeführten Phase I Studie (siehe 3.2.2) tatsächlich auch sehr ausgeprägte Immunantworten bei nahezu allen Patienten beobachtet, gegen die LAA WT1 und PRAME hingegen nur schwächere Immunantworten bei einem Teil der Patienten. Ein positiver Effekt auf den klinischen Verlauf kann insbesondere bei jüngeren Patienten und bei Patienten mit einer Immunantwort vermutet werden, aber für eine statistisch gesicherte Aussage war die Studie nicht ausgelegt.

Verschiedene Faktoren mögen dazu beigetragen haben, dass die immunologischen und klinischen Effekte in der Phase I Studie geringer ausgeprägt waren als möglicherweise erwartet. Von großer Bedeutung ist vermutlich die Verwendung von Autoantigenen für die Vakzinierung. Durch Strategien, die auf Neoantigenen beruhen, könnten stärkere Immunantworten ausgelöst werden. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der Charakteristika der in der klinischen Studie verwendeten DZ mit den präklinischen Experimenten ein erheblich niedrigeres Verhältnis von CD86 zu PD-L1 und deutlich geringere Sekretion von IL-12p70. Dies ist möglicherweise auf die Hochskalierung des Herstellungsprozesses zurückzuführen einschließlich der Elutriation des Leukapheresates nach Übernacht-Lagerung im Vergleich zu Plastik-Adhärenz frisch isolierter mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut. Der entsprechende Prozess könnte möglicherweise weiter optimiert werden.

Allerdings sind Kombinationen einer DZ-Vakzinierung mit anderen immuntherapeutischen Strategien aussichtsreicher, um die generierten Immunantworten und den klinischen Benefit weiter zu erhöhen. Medikamente wie DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Histon-Deacetylase-Inhibitoren, deren Mechanismus auf epigenetischer Modifikation beruht, sind geeignete Kombinationspartner, da sie verbessertes Prozessieren und Präsentieren von Antigenen auf malignen Zellen bewirken. [60,75,80,90] Bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) führte die Kombination einer Vakzinierung gegen NY-ESO-1 mit Decitabine zu einer erhöhten Antigen-spezifischen Immunantwort. [29] Im Rahmen eines individuellen Heilversuches nach Ende der in der Phase I Studie festgelegten Behandlung bewirkte die Kombination der DZ-Vakzinierung mit 5-Azacytidin eine bemerkenswerte Verstärkung der lokalen und systemischen Immunantwort. Bei einem Patienten führte dies zu einer vorübergehenden MRD-Konversion. Dieser Ansatz könnte in zukünftigen klinischen Studien weiterverfolgt werden.

CPIs sind ein naheliegender Kombinationspartner für Vakzinierungsstrategien. Frühe klinische Studien erproben bereits die Kombination einer DZ-Vakzinierung mit PD-1 Inhibitoren zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen einschließlich der AML. [86] Sicherheit und Effektivität eines dualen Einsatzes von epigenetischer Modifikation mittels Azacytidin und einer PD-1 Blockade mit Nivolumab wurde kürzlich für AML-Rezidive gezeigt. [20] Die Kombination einer DZ-Vakzinierung mit diesem Schema, eventuell erweitert um eine LAG-3 Blockade (siehe 3.2.3), könnte zu einer komplexen, aber auch sehr effektiven immuntherapeutischen Strategie führen.

In unseren präklinischen Arbeiten zur Aktivierung von BDZ mit TLR-Liganden (siehe 3.2.4) konnten wir zeigen, dass diese Zellen vielversprechende Alternativen zu aus Monozyten generierten DZ für Vakzinierungsstrategien sind. Ihre klinische Erprobung bei AML-Patienten steht generell noch aus, und das Aktivierungsprotokoll mit TLR-Liganden wurde auch noch nicht klinisch getestet.

Neben dem idealen Kombinationspartner wird in Zukunft auch zu untersuchen sein, für welches klinische Setting innerhalb der AML-Therapie eine DZ-Vakzinierung am besten geeignet ist. Eine interessante Idee ist es beispielsweise, die Vakzinierung zur Verstärkung und Aufrechterhaltung einer synthetischen Immunantwort nach dem adoptiven Transfer von TCR-transgenen oder CAR-modifizierten T-Zellen einzusetzen, um einer T-Zell-Erschöpfung entgegen zu wirken und den antileukämischen Effekt zu erhöhen.

4. T-ZELL-AKTIVIERUNG DURCH IMMUNSTIMULATORISCHE RNA ALS THERAPIEPRINZIP IN DER AML

4.1 HINTERGRUND

Eine noch deutlich experimentellere immuntherapeutische Strategie ist die T-Zell-Aktivierung durch immunstimulatorische RNA, welche einen Liganden für RIG-I (*Retinoic acid Inducible Gene I*)-artige Rezeptoren darstellt. RIG-I ist ein Mustererkennungsrezeptor, welcher im Zytoplasma eine typisch virale Struktur erkennt: doppelsträngige RNA-Stücke mit einem 5'-Triphosphat-Ende. Nach Bindung an virale RNA interagiert RIG-I mit MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*) und aktiviert dieses Molekül. Am Ende der Signalkaskade führt dies zu einer Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und IRF (*interferon regulatory factor*) 3/7 und damit zur Ausschüttung von Typ 1 Interferon und proinflammatorischen Zytokinen. [15] Die Zytokin-Ausschüttung in Kombination mit der direkten Erkennung viraler RNA durch Immunzellen resultiert in einer adaptiven Immunantwort gegen Virus-infizierte Zellen. [65]

Durch die Verwendung exogener kurzer 5'-Triphosphat-RNA (ppp-RNA) kann eine virale Infektion imitiert und die Immunantwort damit auch gegen Tumorzellen gerichtet werden. RIG-I Liganden wurden bereits erfolgreich in präklinischen Modellen für mehrere solide Tumoren getestet einschließlich Melanom [65], Pankreaskarzinom [27] und Mammakarzinom [25]. Auch erste klinische Studien zur intratumoralen und intraläsionalen Verwendung eines synthetischen RNA-Oligonukleotids bei Patienten mit fortgeschrittenen oder rezidierten soliden Tumoren werden bereits durchgeführt. [26,35]

Für die Verwendung von RIG-I Liganden als therapeutische Strategie bei hämatologischen Erkrankungen lagen bisher hingegen keine wesentlichen präklinischen Untersuchungen vor. Eine große Herausforderung liegt hier insbesondere darin, den RIG-I Liganden in die malignen Zellen zu transportieren. Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes wurden zunächst neuartige DNA-basierte Nanopartikel für den intrazellulären Transport kurzer RNA-Moleküle geprüft (siehe 4.2.1). Da bei dieser innovativen Technik jedoch noch zahlreiche Probleme zu lösen sind, erfolgte die Testung von RIG-I Aktivierung durch ppp-RNA in einem AML-Maus-Modell mittels systemischer Applikation im Komplex mit einem klassischen Transfektions-Agens (siehe 4.2.2). Trotz des fehlenden spezifischen Transports konnten hier einige bemerkenswerte Ergebnisse erzielt werden.

4.2 EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

4.2.1 *Evaluation DNA-basierter Nanopartikel für den intrazellulären Transport kurzer RNA-Moleküle*

Eigene Publikationen:

- Kocabey S et al., Lichtenegger FS: Cellular uptake of tile-assembled DNA nanotubes. *Nanomaterials*. 2015; 5(1):47-60

Der Transport von Biomolekülen einschließlich Krebsmedikamenten in die Zielzellen oder gar deren Organellen ist eine große Herausforderung in der Biotechnologie. Verschiedene Nanopartikel-basierte Transportsysteme sind hierzu bereits entwickelt worden, unter anderem Polymere, Liposomen und Konjugate, mit unterschiedlicher Effizienz und Toxizität. In den letzten Jahren haben DNA-basierte Nanostrukturen viel Aufmerksamkeit als interessante Option zur Lösung dieser Herausforderung gefunden, etwa zum Transport von siRNA (*Small interfering RNA*), Antikörpern, Immunstimulanzien und Krebsmedikamenten. Der Vorteil von DNA-Nanopartikeln ist, dass sie leicht mit verschiedenen molekularen Gruppen modifiziert werden können, um einen zielgerichteten Transport zu ermöglichen. Eine häufig verwendete Zielstruktur zur Etablierung neuer Nanostrukturen ist dabei der Folat-Rezeptor. Ein typisches Problem dieser Strukturen ist ihre Stabilität in Blut oder Gewebe.

In dieser *in vitro* Studie untersuchten wir, ob ein neuartiges Röhren-förmiges Nanopartikel, welches sich aus 24 Oligonukleotiden eigenständig zusammensetzt (siehe Abbildung 14), in der Lage ist, eine Folat-mediierte Aufnahme kurzer RNA-Moleküle ins Zytosol von HeLa-Zellen zu bewirken. Zur experimentellen Überprüfung wurden die Nanopartikel mit siRNA, welche gegen GFP (*Green Fluorescent Protein*) gerichtet ist, sowie einem Fluorochrom zur Lokalisationsanalyse verwendet.

Es zeigte sich, dass die DNA-Strukturen in das Endosom aufgenommen wurden, das Zytosol der Zielzellen hingegen nicht erreichten. Entsprechend erfolgte auch kein Silencing des GFP-Gens. Die Hinzunahme von bis zu 6 Folat-Molekülen auf der Oberfläche hatte keinen Einfluss auf die Aufnahme der Nanopartikel. Daneben arbeiteten wir experimentell einige weitere Herausforderungen heraus, welche bei der Durchführung von *in vitro* und *in vivo* Experimenten mit DNA-basierten Strukturen zu beachten sind. Die Arbeit wurde in ihrem Feld aufmerksam aufgenommen, als Methode zum Transport immunstimulatorischer RNA in AML-Zellen eigneten sich die DNA-Partikel damit jedoch nicht.

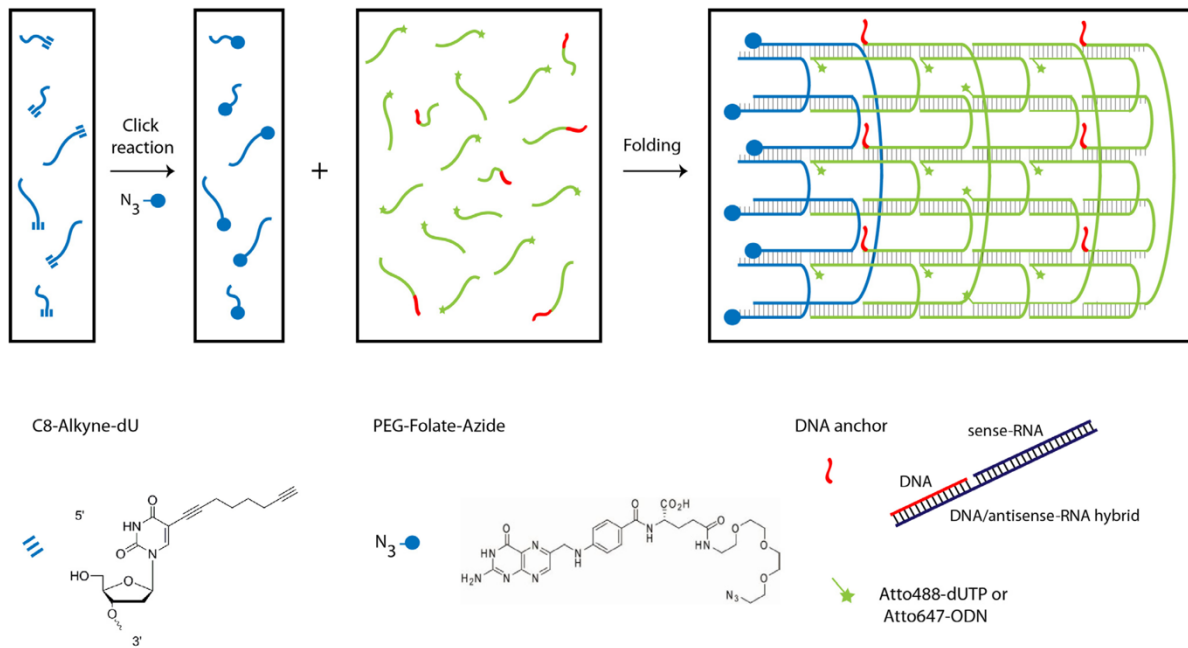


Abbildung 14: Spontaner Zusammenbau des Röhren-förmigen Nanopartikels. Mittels Klick-Reaktion verbinden sich die modifizierten Oligonukleotide mit dem PEGylierten Folat (links), bevor sich je 24 DNA-Partikel spontan zu einer 6 Helices umfassenden Röhre verbinden (rechts). Abbildung aus [45].

4.2.2 *In vivo* Testung systemischer RIG-I Aktivierung durch 5'-Triphosphat-RNA in einem AML Modell

Eigene Publikationen:

- Ruzicka M et al., Lichtenegger FS, Rothenfusser S: RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*. 2020 Apr; 34(4):1017-1026. doi: 10.1038/s41375-019-0639-x.

Das therapeutische Potential systemischer RIG-I Aktivierung durch intravenöse Gabe von ppp-RNA zusammen mit einem klassischen Transfektions-Agens untersuchten wir in einem Mausmodell auf Basis des murinen C1498 Klons. Die Gabe von ppp-RNA führte zu einer Reduktion der Anzahl an AML-Zellen in allen untersuchten Kompartimenten und zu einer deutlichen Verzögerung des Erkrankungsverlaufs (siehe Abbildung 15). In mehreren Tieren konnte sogar eine CR induziert werden einschließlich Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Mittels weiterer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der therapeutische Effekt abhängig ist von der Signalweitergabe durch IFN und MAVS sowie von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, nicht jedoch

von NK- oder B-Zellen. Die Immunaktivierung durch ppp-RNA führte dabei zu Hochregulierung von PD-L1 auf den verbliebenen AML-Zellen. Die Kombination von ppp-RNA mit einem CPI gegen PD-1 zeigte daher einen erhöhten antileukämischen Effekt.

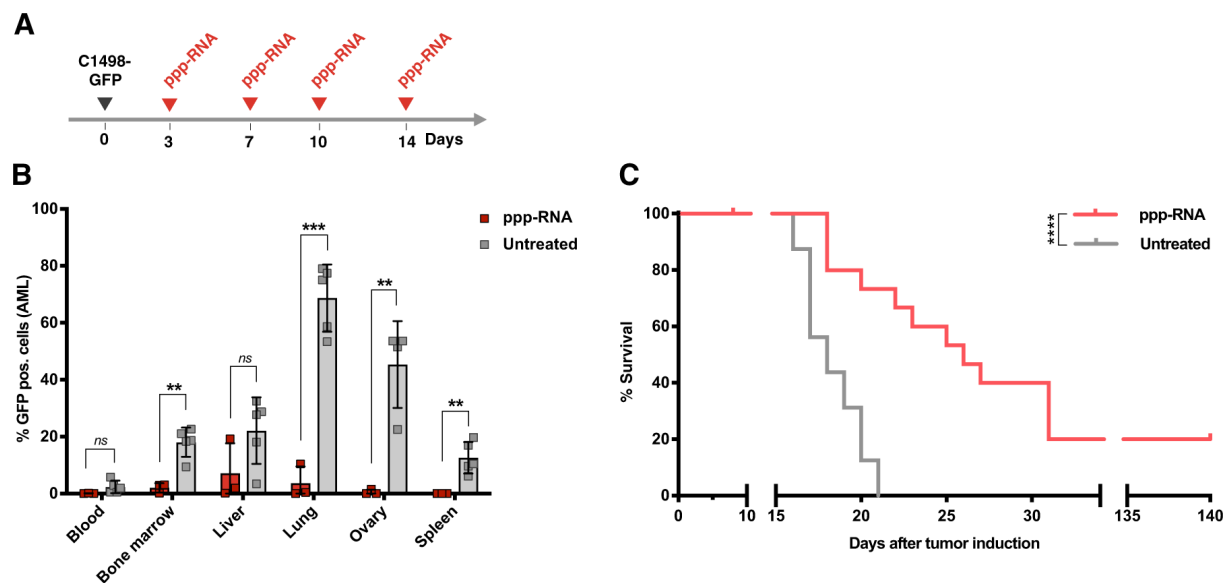


Abbildung 15: Systemische Behandlung mit ppp-RNA führt zu einer Reduktion der AML-Last und verlängertem Überleben in einem AML-Mausmodell. (A) In einem syngenem C1498-GFP Mausmodell wurden die Mäuse vier Mal innerhalb von zwei Wochen intravenös mit 50 µg Triphosphat-RNA behandelt. (B) An Tag 17 zeigte sich in den meisten der untersuchten Organe ein signifikant geringerer Anteil GFP-positiver (AML-) Zellen bei den behandelten (n=3) im Vergleich zu den unbehandelten (n=5) Mäusen. (C) Die Behandlung mit Triphosphat-RNA führte zu einem deutlich verlängerten Überleben der Mäuse nach Induktion einer AML (n=16 pro Gruppe). Abbildung aus [70].

4.3 DISKUSSION UND AUSBLICK

T-Zell-Aktivierung durch immunstimulatorische RNA ist eine innovative immuntherapeutische Strategie, die präklinisch gut untersucht ist und derzeit in ersten klinischen Studien geprüft wird. [26,35] Dabei kommt aktuell überwiegend eine intratumorale Applikation von RIG-I Agonisten bei Patienten mit soliden Tumoren zur Anwendung. Die Herausforderung eines zielgerichteten Transports dieser Biomoleküle ist bisher nicht gelöst, jedoch gibt es interessante Ansätze mit Hilfe verschiedener neuer Nanopartikel. [18,36] Es bleibt abzuwarten, ob die lokale Applikation im klinischen Setting antitumorale Effekte zeigt und ob spezifischere Transportstrategien sich klinisch translätieren lassen.

In diesem Zusammenhang ist es sicherlich interessant, dass wir zeigen konnten, dass eine intravenöse Applikation ohne zielgerichteten Transportmechanismus bei einer systemischen Erkrankung wie der AML im Maus-Modell bemerkenswerte immunstimulatorische und antileukämische Aktivität zeigte. Insbesondere aufgrund der beobachteten kompletten Remissionen mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses stellt die Behandlung mit ppp-RNA eine potentiell interessante neue immuntherapeutische Strategie zur Behandlung der AML dar.

5. EINSATZ VON T-ZELL-REKRUTIERENDEN ANTIKÖRPERN ZUR T-ZELL-AKTIVIERUNG BEI AML-PATIENTEN

5.1 HINTERGRUND

Antikörper-basierte Immuntherapien sind eine etablierte Strategie zur Bekämpfung chemoresistenter Tumorzellen. Neben konventionellen Antikörpern und Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten sind in den letzten Jahren T-Zell-rekrutierende Antikörper in den Fokus des Interesses gerückt (siehe Abbildung 1). Dabei handelt es sich um bispezifische Antikörper-Konstrukte, deren Wirkmechanismus es ist, durch simultane Bindung an T-Zellen des Patienten – zumeist über CD3 im T-Zell-Rezeptor-Komplex – und Tumorzellen – über Tumor-assoziierte Antigene – beide in räumliche Nähe zueinander zu bringen. Die Aktivierung der T-Zellen führt dann zu einer Lyse der Tumorzelle, und zwar unabhängig von der Spezifität des T-Zell-Rezeptors.

Der Nachweis, dass dieser Wirkmechanismus zu klinischem Benefit führen kann, wurde durch das CD19/CD3 Antikörper-Konstrukt Blinatumomab erbracht. Es wurde 2014 von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von rezidivierender oder refraktärer Philadelphia-negativer B-Vorläufer-ALL zugelassen, nachdem in einer Phase II Studie gezeigt wurde, dass bereits ein oder zwei Zyklen der Therapie zu einer CR-Rate von 43% führten. [84] In der Phase III Studie translatierte sich das in einen signifikanten OS-Vorteil gegenüber Chemotherapie. [39] Seither sind zahlreiche T-Zell-rekrutierende Antikörper in unterschiedlichen Formaten und mit unterschiedlichen Zielstrukturen entwickelt und klinisch getestet worden. [67]

Auch für die AML haben T-Zell-rekrutierende Antikörper einen großen Stellenwert innerhalb der untersuchten immuntherapeutischen Strategien. Eine bedeutsame Frage ist hier die Wahl des richtigen Ziel-Antigens (siehe auch 6). Mit unseren beiden Arbeiten zum CD33/CD3 bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörper AMG 330 (siehe 5.2.1) trugen wir wesentlich dazu bei, diesen Antikörper präklinisch zu validieren und den Weg zu bereiten für die klinische Studie zur Erprobung dieser Therapie bei Patienten mit rezidivierender oder refraktärer AML (NCT02520427). Eine Interimsanalyse von 60 Patienten zeigte eine hohe, aber noch beherrschbare Rate an Zytokin-Ausschüttungs-Syndrom (*cytokine release syndrome*, CRS) und eine mäßige klinische Effektivität in der Monotherapie in allerdings stark vorbehandelten Patienten. [68] Um die Spezifität zu erhöhen, werden in letzter Zeit auch Antikörper entwickelt, die gegen intrazelluläre Targets gerichtet sind. Ein Beispiel dafür ist ein bispezifischer T-Zell-rekrutierender Antikörper gegen ein WT1-Peptid im Kontext von HLA-A*02 (siehe 5.2.2).

5.2 EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

5.2.1 *T-Zell-Aktivierung in der AML durch Einsatz des CD33/CD3 bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpers AMG 330*

Eigene Publikationen:

- Krupka C et al.: CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 2014; 123(3):356-65
- Krupka C et al.: Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3-BiTE® antibody construct AMG 330: reversing a T-cell induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 2016 Feb;30(2):484-91. doi: 10.1038/leu.2015.214.

In diesen beiden Arbeiten wurde *ex vivo* evaluiert, ob der T-Zell-rekrutierende Antikörper AMG 330 zur klinischen Erprobung als Therapie der AML geeignet ist. Mittels einer neu etablierten Langzeit-Kultur konnte die Interaktion von primären AML-Zellen mit autologen T-Zellen des Patienten im Kontext des Antikörpers über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Es zeigte sich, dass AMG 330 in der Lage ist, Gedächtnis-T-Zellen effizient zu rekrutieren und zu expandieren und in der Folge eine überwiegende bis komplette Lyse der AML-Zellen zu bewirken. [47]

In weiterführende Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Kinetik und Effektivität der durch AMG 330 induzierten Lyse von der CD33-Expression und dem Verhältnis von T-Zellen zu AML-Zellen innerhalb der Probe abhängt. T-Zell-Aktivierung durch AMG 330 führte zu proinflammatorischen Bedingungen und dabei auch zu einer Hochregulation des Checkpoint-Moleküls PD-L1, das bei Primärdiagnose gar nicht bis nur gering konstitutiv exprimiert wird. Insbesondere unter Bedingungen mit suboptimaler T-Zell-Stimulation, beispielsweise aufgrund eines geringen Verhältnisses von T-Zellen zu AML-Zellen, führte die Kombination von AMG 330 mit einem CPI gegen PD-1 oder PD-L1 daher zu einer erheblichen Verstärkung von T-Zell-Stimulation und Lyse der AML Zellen (siehe Abbildung 16). [48]

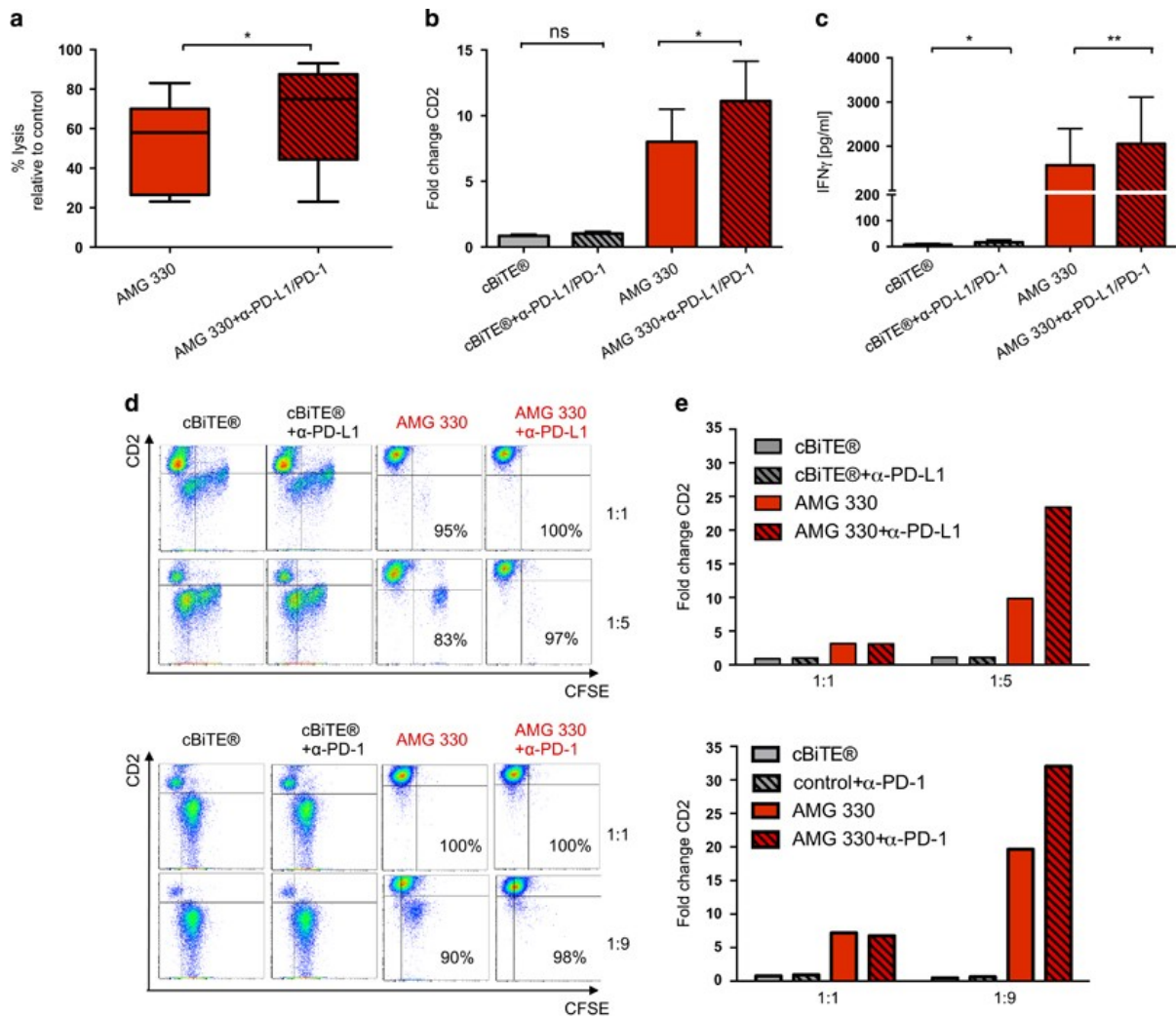


Abbildung 16: Die Blockade von PD-1/PD-L1 verstärkt die AMG 330-bedingte Lyse primärer AML-Zellen. Primäre AML-Patienten-Proben wurden mit autologen oder allogenen T-Zellen kokultiviert unter Anwesenheit von AMG 330 oder einem Kontroll-Antikörper-Konstrukt. Die Hinzugabe eines blockierenden Antikörpers gegen PD-1 oder PD-L1 führte zu erhöhter Lyse (a), T-Zell-Proliferation (b) und IFN- γ Sekretion (c) in den Bedingungen mit AMG 330. Dieser Effekt auf Lyse (d) und Proliferation (e) war insbesondere unter Bedingungen mit suboptimaler Stimulation durch AMG 330 zu beobachten, beispielsweise aufgrund eines geringen Verhältnis von T-Zellen zu AML-Zellen (1:9 vs. 1:1). Abbildung aus [48].

5.2.2 *T-Zell-Aktivierung in der AML durch Einsatz eines bispezifischen T-Zell-rekrutierenden Antikörpers gegen CD3 und ein WT1-Peptid im Kontext von HLA-A*02*

Eigene Publikationen:

- Augsberger C, Hänel G et al.: Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody. *Blood*. 2021 Dec 23;138(25):2655-2669. doi: 10.1182/blood.2020010477.

AML-Zellen haben ihre Linien-spezifischen Oberflächen-Antigene gemein mit hämatopoetischen Zellen der myeloischen Reihe. Dies hat zur Folge, dass der gewünschte antileukämische Effekt nicht ausreichend zu trennen ist von unerwünschten Nebenwirkungen auf die gesunde Myelopoese. Eine vielversprechende Strategie ist es, intrazelluläre Antigene im Kontext spezifischer HLA-Moleküle als Zielstruktur zu verwenden. Der T-Zell-rekrutierende Antikörper gegen das WT1-Peptid RMFPNAPYL im Kontext von HLA-A*02 (*WT1-T cell bispecific*, WT1-TCB), der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist dafür ein innovatives Beispiel.

Der WT1-TCB bewirkte Antikörper-medierte zelluläre Toxizität gegen AML-Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von WT1 und HLA-A*02. In Langzeitkulturen konnte eine spezifische Lyse primärer AML-Zellen sowohl durch allogene als auch durch autologe T-Zellen nachgewiesen werden. Dabei erwiesen sich polyklonale T-Zellen nach Aktivierung durch WT1-TCB als effektiver als ein Peptid-spezifischer T-Zell-Klon. Die Kombination des WT1-TCB mit Lenalidomid als Immunmodulator verstärkte den zytotoxischen Effekt der T-Zellen gegen die AML-Zellen. In einem Zelllinien-basierten ebenso wie in einem Patienten-Xenograft-basierten humanisierten AML-Mausmodell konnte eine signifikante und Dosis-abhängige Reduktion der leukämischen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17).

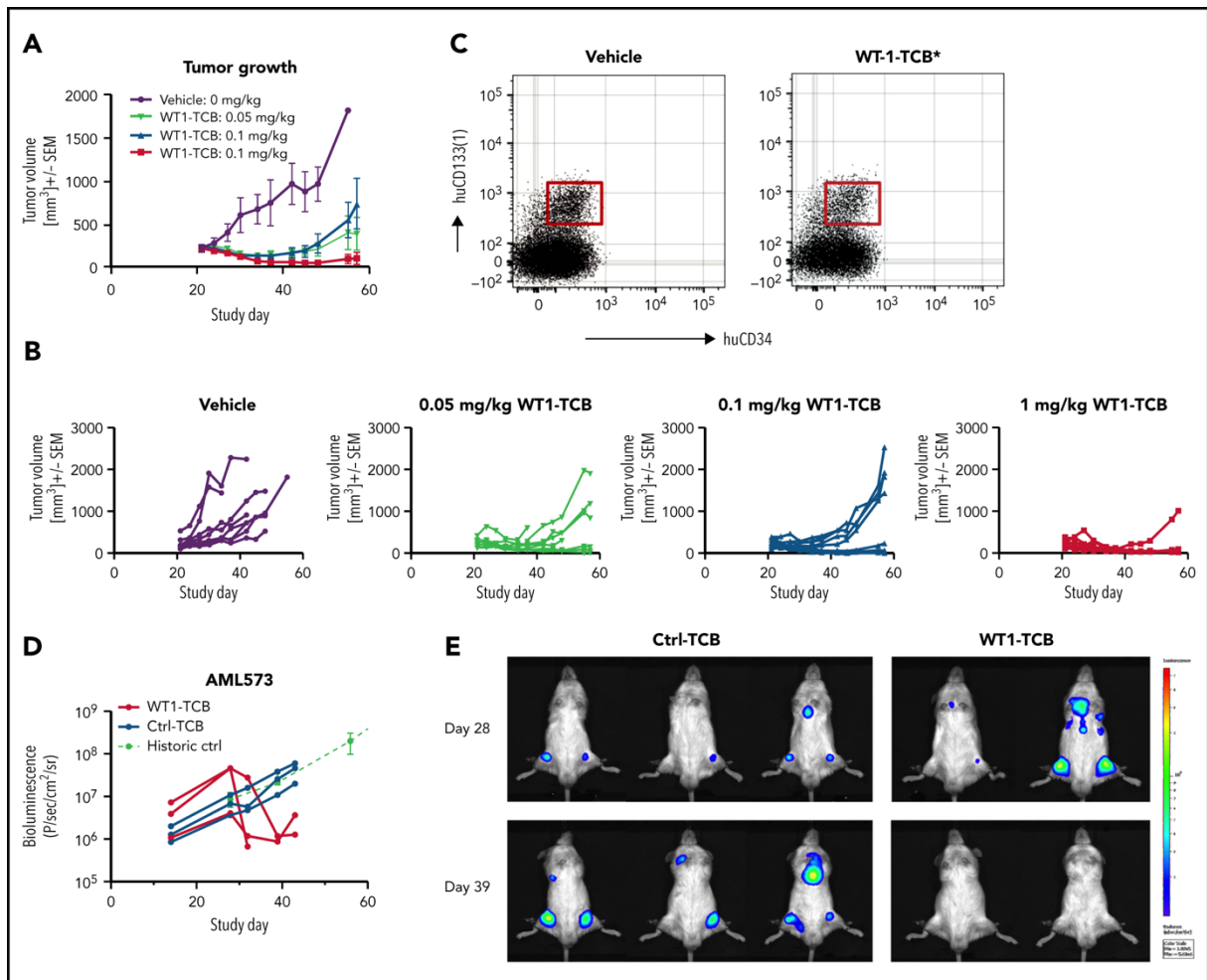


Abbildung 17: Der T-Zell-rekrutierende Antikörper gegen WT1 (WT1-TCB) zeigt antileukämische Wirksamkeit in einem humanisierten Mausmodell. (A-B) Wachstumskurven leukämischer SKM-1 Zellen in humanisierten Mäusen unter wöchentlicher Behandlung mit unterschiedlichen Dosen des WT1-TCB oder einer Vehikel-Kontrolle. (C) Die $\text{CD34}^+\text{CD133}^+$ gesunde Stammzell-Population bleibt in den humanisierten Mäusen unter Behandlung mit WT1-TCB weitgehend erhalten. (D-E) WT1-TCB zeigt antileukämische Aktivität in einem Xenograft-Modell. Abbildung aus [4].

5.3 DISKUSSION UND AUSBLICK

Ausgelöst durch den Erfolg T-Zell-rekrutierender Antikörper in der Therapie von B-Zell-Erkrankungen, zunächst der B-Vorläufer-ALL [39,84], aber auch der malignen B-Zell-Lymphome [10,34] und des Multiplen Myeloms [32], werden derzeit auch gegen die AML zahlreiche T-Zell-rekrutierende Antikörper erprobt. Bedeutsame Zielstrukturen auf der Oberfläche der AML-Zellen sind dabei die Linien-spezifischen Antigene CD33 [17] und CD123 [78]. Wie schon in 5.2.2 erwähnt, muss ein möglicher therapeutischer Benefit hier gegen die langdauernde

Myelosuppression abgewogen werden, die durch den On-Target-Off-Tumor-Effekt gegen gesunde myeloische Zellen bewirkt wird. Der wichtigste unerwünschte Effekt im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus per se ist daneben für alle T-Zell-rekrutierenden Antikörper das CRS. Die derzeit laufenden frühen klinischen Studien werden zeigen, ob diese beiden unerwünschten Effekte im Setting der AML beherrschbar sind und ob der antileukämische Effekt bei sicheren Dosen ausreichend ist, um ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis zu ermöglichen und eine weitere klinische Entwicklung zu unterstützen.

Daneben wird an vielen Optionen gearbeitet, um mit modifizierten T-Zell-rekrutierenden Antikörpern das Risiko insbesondere für On-Target-Off-Tumor-Effekte zu reduzieren. Eine dieser Möglichkeiten ist es, statt eines Oberflächen-Antigens ein intrazelluläres Peptid im HLA-Kontext als Zielstruktur zu verwenden. Die Anzahl dieser Strukturen auf der Oberfläche einer AML-Zelle ist deutlich niedriger als die typischer Oberflächen-Antigene. Durch die höhere Avidität des WT1-TCBs im Vergleich zu typischen unmodifizierten TCRs reicht diese geringe Zahl von Zielstrukturen jedoch für eine effektive Lyse *in vitro* aus. Aktuell erfolgt die klinische Erprobung in einer Phase I Studie (NCT04580121). Die Ergebnisse dieser Studie werden Bedeutung über dieses Molekül hinaus für diese therapeutische Strategie als Ganzes haben.

6. AKTUELLE ENTWICKLUNG UND ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN

Bis vor wenigen Jahren gab es zur Behandlung der AML im Wesentlichen eine einheitliche Strategie weitgehend unabhängig von den Charakteristika der Erkrankung: eine mehr oder weniger intensive zytotoxische Therapie, wenn möglich gefolgt von einer konsolidierenden allo-SZT. Neben der Entwicklung zielgerichteter Therapien liegt der Fokus der aktuellen Forschung auf innovativen T-Zell-basierten Therapiestrategien, die darauf abzielen, antileukämische Effekte zu vermitteln, ohne dabei die ausgeprägten und lange anhaltenden Nebenwirkungen einer allo-SZT mit sich zu bringen.

Mit dem vorliegenden Habilitationsprojekt haben wir zu Erkenntnissen über zwei wichtige Plattformen für T-Zell-basierte Therapiestrategien beigetragen, die sich derzeit in klinischer Entwicklung befinden: zum einen die Generierung von AML-spezifischen Immunantworten durch Vakzinierung mit Dendritischen Zellen (siehe 3), zum anderen den Einsatz von T-Zell-rekrutierenden Antikörpern zur T-Zell-Aktivierung (siehe 5). Ein weiterer Fokus meiner Arbeit war die experimentelle Untersuchung einer T-Zell-Aktivierung durch immunstimulatorische RNA als Therapieprinzip in der AML (siehe 4); eine klinische Prüfung steht hier noch aus. Eine weitere bedeutsame Plattform ist die Verwendung genetisch modifizierter T-Zellen, seien es TCR-transgene oder CAR-modifizierte T-Zellen; diese war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. CPI als Monotherapie zeigen in der AML mäßige Aktivität, stellen aber potentiell wichtige Kombinationspartner sowohl für andere immuntherapeutische als auch nicht-immuntherapeutische Strategien dar.

Alle genannten Therapiestrategien stehen in der AML noch am Anfang der klinischen Entwicklung. Eine große Herausforderung ist die Auswahl des Zielantigens bzw. des Zielepitops. [21] Eine ideale Zielstruktur wie für die B-Zell-Neoplasien konnte für die AML bisher nicht identifiziert werden. Die Aktivierung von T-Zellen gegen Linien-spezifische Antigene, wie sie bisher in der Mehrzahl der klinischen Studien untersucht wird, führt zu begleitender, zum Teil lang andauernder Myelosuppression. T-Zellen gegen LAA, die auf den Zellen der gesunden Hämatopoese weniger oder gar nicht exprimiert werden, zeigen häufig On-Target-Off-Tumor Toxizitäten in anderen Geweben. Und die Stimulation von T-Zell-Antworten gegen intrazelluläre Leukämie-spezifische Antigene steht noch am Beginn der klinischen Untersuchungen (siehe 5.2.2). Möglicherweise werden zukünftige Strategien auch eine Kombination mehrerer Ziel-Antigene verwenden, sei es parallel oder sequentiell.

Als häufigste unerwünschte Therapie-bedingte Nebenwirkung im Zusammenhang mit T-Zell-aktivierenden Therapien hat sich das CRS herausgestellt. Dieses ist durch Prämedikation und frühe Intervention zwar meist beherrschbar, jedoch sind Strategien zur Vermeidung und zum optimalen Management dieser Nebenwirkung Gegenstand intensiver Diskussionen und Untersuchungen.

Zusammenfassend hat es in den letzten Jahren deutliche Fortschritte in der Entwicklung innovativer immuntherapeutischer Strategien zur Behandlung der AML gegeben. Dennoch stehen wir noch am Anfang der Entwicklung, die meisten klinischen Studien befinden sich in frühen Phasen und sind noch nicht abgeschlossen. Weitere Schwerpunkte aktueller Diskussionen sind die gezielte Verwendung von Biomarkern zur Selektion geeigneter Therapien für den einzelnen Patienten und die Identifikation des idealen Settings für den Einsatz von Immuntherapien in der AML, beispielsweise MRD oder frühe Rezidive. In den nächsten 5-10 Jahren werden damit wesentliche Erkenntnisse erwartet, die den Stellenwert der Immuntherapie für die Behandlung der AML klarer bestimmen werden.

7. DANKSAGUNG

Zuvorderst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Marion Subklewe bedanken, in deren Arbeitsgruppe die Mehrzahl der hier besprochenen Arbeiten entstanden ist. Unsere stets vertrauensvolle und wertschätzende Zusammenarbeit und unsere vielen bereichernden Diskussionen, während derer die meisten der zugrunde liegenden Ideen entstanden sind, haben meinen wissenschaftlichen Werdegang und meine Denkweise ganz entscheidend geprägt. Zugleich bin ich sehr dankbar für ihren erfahrenen Rat an entscheidenden Stellen meiner bisherigen Laufbahn.

Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann und Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt, an deren Klinik ein großer Teil der hier vorgestellten Arbeiten entstanden ist, möchte ich für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während meiner 11 Jahre währenden klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit in der Medizinischen Klinik III danken. Das positive Arbeitsumfeld in der Klinik und ihre Förderung der Verbindung von klinischer und wissenschaftlicher Tätigkeit haben meine Weiterbildung sehr beeinflusst.

Prof. Dr. Simon Rothenfußer und Prof. Dr. Stefan Endres danke ich für eine sehr bereichernde zweijährige Postdoc-Zeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie und ihre Unterstützung dabei, auch noch lange über diese Zeit hinaus ein spannendes Forschungsprojekt zu einem erfolgreichen Ende zu führen.

Prof. Dr. Christof von Kalle, Prof. Dr. Magdalena Tary-Lehmann und Prof. Dr. Paul Lehmann waren wesentliche Unterstützer meiner ersten wissenschaftlichen Schritte und haben mich sowohl die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens gelehrt als auch meine Begeisterung für die medizinische Forschung und insbesondere die Immunologie weiter entfacht.

Die hier vorgestellten Arbeiten wären ohne die Mithilfe zahlreicher Kolleginnen und Kollegen nicht zustande gekommen. Stellvertretend danken möchte ich Dr. Michael Ruzicka und Gerulf Hänel für ihr beeindruckendes Engagement und ihre wertvollen Ideen während ihrer Promotionszeit.

Die durchgehende ideelle und tatkräftige Unterstützung meiner Eltern war eine ganz wesentliche Hilfe auf dem langen Weg von den Kinderschuhen bis zur Habilitation, dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meiner Frau Friederike Lichtenegger für ihre durchgehende große Unterstützung und ihr Verständnis während der vergangenen Jahre, ohne die der Spagat zwischen klinischer und wissenschaftlicher Arbeit sowie wachsender familiärer Verantwortung nicht möglich gewesen wäre.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	Akute lymphatische Leukämie
Allo-SZT	Allogene Stammzell-Transplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
AML-CG	<i>Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
BDZ	Blut Dendritische Zelle(n)
CAR T-Zelle	Chimäre Antigen-Rezeptor T-Zelle
cDZ1	CD141+ myeloische Dendritische Zelle(n)
cDZ2	CD1c+ myeloische Dendritische Zelle(n)
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CPI	Checkpoint-Inhibitor
CR	Komplette Remission (<i>complete remission</i>)
CRS	Zytokin-Ausschüttungs-Syndrom (<i>cytokine release syndrome</i>)
DZ	Dendritische Zelle(n)
ELISpot	<i>Enzyme-linked immune absorbent spot</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing practice</i>)
hCMVpp65	Humanes Cytomegalie-Virus Phosphoprotein 65
HD	Gesunder Proband (<i>healthy donor</i>)

HLA	Humanes Leukozytenantigen
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
IIT	Von Wissenschaftlern initiierte Studie (<i>investigator-initiated trial</i>)
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>
ivt	<i>in vitro</i> transkribiert
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LAG-3	<i>Lymphocyte Activation gene 3</i>
LSZ	Leukämische Stammzelle
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>)
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NPM1	<i>Nucleophosmin</i>
OS	Gesamt-Überleben (<i>overall survival</i>)
pDZ	Plasmazytoide dendritische Zelle(n)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PHA	Phytohämagglutinin
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
ppp-RNA	5'-Triphosphat-RNA
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen in melanoma</i>
RFS	Rezidiv-freies Überleben (<i>relapse-free survival</i>)
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
T _{reg} Zelle	Regulatorische T-Zelle
WT1	Wilms Tumor 1
WT1-TCB	T-Zell-rekrutierender Antikörper gegen das WT1-Peptid RMFPNAPYL im Kontext von HLA-A*02 (<i>WT1-T cell bispecific</i>)

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anguille S, Van de Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, et al.. Dendritic cell vaccination as post-remission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(15):1713-21.
2. Antohe I, Dăscălescu A, Dănăilă C, Titieanu A, Zlei M, Ivanov I, et al.. B7-Positive and B7-Negative Acute Myeloid Leukemias Display Distinct T Cell Maturation Profiles, Immune Checkpoint Receptor Expression, and European Leukemia Net Risk Profiles. *Front Oncol*. 2020;10:264.
3. Appelbaum FR, Bernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(22):2373-6.
4. Augsberger C, Hänel G, Xu W, Pulko V, Hanisch LJ, Augustin A, et al.. Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody. *Blood*. 2021;138(25):2655-69.
5. Barrett AJ, Le Blanc K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):223-32.
6. Beck B, Dörfel D, Lichtenegger FS, Geiger C, Lindner L, Merk M, et al.. Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission. *J Transl Med*. 2011;9:151.
7. Bernasconi P, Borsani O. Immune Escape after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): From Mechanisms to Novel Therapies. *Cancers (Basel)*. 2019;12(1):69.
8. Blum WG, Mims AS. Treating acute myeloid leukemia in the modern era: A primer. *Cancer*. 2020;126(21):4668-77.
9. Boddu P, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Allison J, Sharma P, Daver N. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma*. 2017;59(4):790-802.
10. Budde LE, Assouline S, Sehn LH, Schuster SJ, Yoon SS, Yoon DH, et al.. Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol*. 2021;
11. Burnett AK. New induction and postinduction strategies in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(2):76-81.

12. Büchner T, Berdel WE, Schoch C, Haferlach T, Serve HL, Kienast J, et al.. Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(16):2480-9.
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
14. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al.. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5323-37.
15. Chow KT, Gale M, Loo YM. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:667-94.
16. Christiansson L, Söderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, et al.. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One*. 2013;8(1):e55818.
17. Clark MC, Stein A. CD33 directed bispecific antibodies in acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020;33(4):101224.
18. Das M, Shen L, Liu Q, Goodwin TJ, Huang L. Nanoparticle Delivery of RIG-I Agonist Enables Effective and Safe Adjuvant Therapy in Pancreatic Cancer. *Mol Ther*. 2019;27(3):507-17.
19. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, et al.. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*. 2003;170(8):4069-76.
20. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, et al.. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov*. 2019;9(3):370-83.
21. Daver N, Alotaibi AS, Bücklein V, Subklewe M. T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments. *Leukemia*. 2021;35(7):1843-63.

22. Di Stasi A, Jimenez AM, Minagawa K, Al-Obaidi M, Rezvani K. Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol.* 2015;6:36.
23. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al.. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2016;129(4):424-47.
24. Dulphy N, Chrétien AS, Khaznadar Z, Fauriat C, Nanbakhsh A, Caignard A, et al.. Under-ground Adaptation to a Hostile Environment: Acute Myeloid Leukemia vs. Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 2016;7:94.
25. Elion DL, Jacobson ME, Hicks DJ, Rahman B, Sanchez V, Gonzales-Ericsson PI, et al.. Therapeutically Active RIG-I Agonist Induces Immunogenic Tumor Cell Killing in Breast Cancers. *Cancer Res.* 2018;78(21):6183-95.
26. Elion DL, Cook RS. Activation of RIG-I signaling to increase the pro-inflammatory phenotype of a tumor. *Oncotarget.* 2019;10(24):2338-9.
27. Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, et al.. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- β 1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2013;73(6):1709-20.
28. Gassner FJ, Zaborsky N, Neureiter D, Huemer M, Melchardt T, Egle A, et al.. Chemotherapy-induced augmentation of T cells expressing inhibitory receptors is reversed by treatment with lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(5):67-9.
29. Griffiths EA, Srivastava P, Matsuzaki J, Brumberger Z, Wang ES, Kocent J, et al.. NY-ESO-1 Vaccination in Combination with Decitabine Induces Antigen-Specific T-lymphocyte Responses in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *Clin Cancer Res.* 2018;24(5):1019-29.
30. Haubner S, Perna F, Köhnke T, Schmidt C, Berman S, Augsberger C, et al.. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia.* 2018;33(1):64-74.
31. Hänel G, Angerer C, Petry K, Lichtenegger FS, Subklewe M. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother.* 2021:1-14.

32. Hosny M, CPM V, J VDS, Frerichs KA, Mutis T, Zweegman S, et al.. Current State of the Art and Prospects of T Cell-Redirecting Bispecific Antibodies in Multiple Myeloma. *J Clin Med*. 2021;10(19):4593.
33. Hughes E, Scurr M, Campbell E, Jones E, Godkin A, Gallimore A. T-cell modulation by cyclophosphamide for tumour therapy. *Immunology*. 2018;154(1):62-8.
34. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, Carlo-Stella C, Offner FC, Sureda A, et al.. Glofitamab, a Novel, Bivalent CD20-Targeting T-Cell-Engaging Bispecific Antibody, Induces Durable Complete Remissions in Relapsed or Refractory B-Cell Lymphoma: A Phase I Trial. *J Clin Oncol*. 2021;39(18):1959-70.
35. Iurescia S, Fioretti D, Rinaldi M. The Innate Immune Signalling Pathways: Turning RIG-I Sensor Activation Against Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):3158.
36. Jacobson ME, Wang-Bishop L, Becker KW, Wilson JT. Delivery of 5'-triphosphate RNA with endosomolytic nanoparticles potentially activates RIG-I to improve cancer immunotherapy. *Biomater Sci*. 2019;7(2):547-59.
37. Javorovic M, Pohla H, Frankenberger B, Wölfel T, Schendel DJ. RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. *Mol Ther*. 2005;12(4):734-43.
38. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al.. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997;27(12):3135-42.
39. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al.. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(9):836-47.
40. Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017;10(4):245-51.
41. Kayser S, Levis MJ. Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2021;
42. Kedl RM, Kappler JW, Marrack P. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(1):120-7.

43. Khoury HJ, Collins RH, Blum W, Stiff PS, Elias L, Lebkowski JS, et al.. Immune responses and long-term disease recurrence status after telomerase-based dendritic cell immunotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2017;123(16):3061-72.
44. Knaus HA, Berglund S, Hackl H, Blackford AL, Zeidner JF, Montiel-Esparza R, et al.. Signatures of CD8+ T cell dysfunction in AML patients and their reversibility with response to chemotherapy. *JCI Insight*. 2018;3(21):e120974.
45. Kocabey S, Meinl H, MacPherson IS, Cassinelli V, Manetto A, Rothenfusser S, et al.. Cellular Uptake of Tile-Assembled DNA Nanotubes. *Nanomaterials*. 2014;5(1):47-60.
46. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, et al.. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia*. 2009;23(2):375-82.
47. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, Köhnke T, et al.. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 2014;123(3):356-65.
48. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Köhnke T, et al.. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3-BiTE® antibody construct AMG 330: reversing a T-cell induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 2015;30(2):484-91.
49. Lambie AJ, Kosaka Y, Laderas T, Maffit A, Kaempf A, Brady LK, et al.. Reversible suppression of T cell function in the bone marrow microenvironment of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(25):14331-41.
50. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al.. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(26):2684-92.
51. Lichtenegger FS, Mueller K, Otte B, Beck B, Hiddemann W, Schendel DJ, et al.. CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-Like Receptor-Induced Dendritic Cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e44266.
52. Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Hiddemann W, Subklewe M. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy*. 2013;5(1):63-78.

53. Lichtenegger FS, Lorenz R, Gellhaus K, Hiddemann W, Beck B, Subklewe M. Impaired NK cells and increased T regulatory cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML. *Leuk Res.* 2014;38(8):964-9.
54. Lichtenegger FS, Krupka C, Köhnke T, Subklewe M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol.* 2015;52(3):207-14.
55. Lichtenegger FS, Kondla I, Krempasky M, Weber AL, Herold T, Krupka C, et al.. RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(12):1505-15.
56. Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Köhnke T, Subklewe M. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):142.
57. Lichtenegger FS, Rothe M, Schnorfeil FM, Deiser K, Krupka C, Augsburg C, et al.. Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol.* 2018;9:385.
58. Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Rothe M, Deiser K, Altmann T, Bücklein VL, et al.. Toll-like receptor 7/8-matured RNA-transduced dendritic cells as post-remission therapy in acute myeloid leukaemia: results of a phase I trial. *Clin Transl Immunology.* 2020;9(3):e1117.
59. Lion E, Willemsen Y, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Smits EL. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2019-26.
60. Luo N, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Sanchez V, Opalenik SR, Li H, et al.. DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC-I to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nat Commun.* 2018;9(1):248.
61. Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenbein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood.* 2009;114(8):1528-36.
62. Noone AM, Howlander N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/, based on November 2017 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2018. <https://seer.cancer.gov>. Accessed September 27, 2018.

63. Nunes C, Wong R, Mason M, Fegan C, Man S, Pepper C. Expansion of a CD8(+)PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res.* 2012;18(3):678-87.
64. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al.. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-21.
65. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, et al.. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med.* 2008;14(11):1256-63.
66. Prue RL, Vari F, Radford KJ, Tong H, Hardy MY, D'Rozario R, et al.. A phase I clinical trial of CD1c (BDCA-1)+ dendritic cells pulsed with HLA-A*0201 peptides for immunotherapy of metastatic hormone refractory prostate cancer. *J Immunother.* 2015;38(2):71-6.
67. Rader C. Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Current opinion in biotechnology.* 2020;65
68. Ravandi F, Walter RB, Subklewe M, Buecklein V, Jongen-Lavrencic M, Paschka P, et al.. Updated results from phase I dose-escalation study of AMG 330, a bispecific T-cell engager molecule, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (R/R AML). *JCO.* 2020;38(15_suppl):7508.
69. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al.. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 2013;121(9):1612-21.
70. Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, DFR B, Vick B, Heuer EM, et al.. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia.* 2020;34(4):1017-26.
71. Saxena K, Konopleva M. An expert overview of emerging therapies for acute myeloid leukemia: novel small molecules targeting apoptosis, p53, transcriptional regulation and metabolism. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(9):973-88.
72. Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, et al.. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol.* 2015;8(1):93.

73. Schreibelt G, Bol KF, Westdorp H, Wimmers F, Aarntzen EH, Duiveman-de Boer T, et al.. Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells. *Clin Cancer Res.* 2015;22(9):2155-66.
74. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, et al.. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer.* 2007;121(12):2585-90.
75. Siebenkäs C, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Sharma A, Jeschke J, Vatapalli R, et al.. Inhibiting DNA methylation activates cancer testis antigens and expression of the antigen processing and presentation machinery in colon and ovarian cancer cells. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179501.
76. Sittig SP, de Vries IJM, Schreibelt G. Primary Human Blood Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy-Tailoring the Immune Response by Dendritic Cell Maturation. *Biomedicines.* 2015;3(4):282-303.
77. Skalova K, Mollova K, Michalek J. Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: does maturation matter? *Vaccine.* 2010;28(32):5153-60.
78. Slade MJ, Uy GL. CD123 bi-specific antibodies in development in AML: What do we know so far? . *Best Pract Res Clin Haematol.* 2020;33(4):101219.
79. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer.* 1951;4(1):39-59.
80. Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, James SR, Collamat-Lai G, Blagitko-Dorfs N, et al.. Induction of cancer testis antigen expression in circulating acute myeloid leukemia blasts following hypomethylating agent monotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(11):12840-56.
81. Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, Javorovic M, Kvalheim G, Schendel DJ, et al.. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(10):1093-103.
82. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreibelt G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, et al.. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* 2013;73(3):1063-75.
83. Tettamanti S, Pievani A, Biondi A, Dotti G, Serafini M. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. *Leukemia.* 2021;36(1):13-22.

84. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al.. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):57-66.
85. Van Acker HH, Versteven M, Lichtenegger FS, Roex G, Campillo-Davo D, Lion E, et al.. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2019;8(5):579.
86. Versteven M, Van den Bergh MJM, Marcq E, Smits ELJ, Van Tendeloo VFI, Hobo W, et al.. Dendritic Cells and Programmed Death-1 Blockade: A Joint Venture to Combat Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:394.
87. Weinstock M, Rosenblatt J, Avigan D. Dendritic Cell Therapies for Hematologic Malignancies. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;5:66-75.
88. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;13(6):492-9.
89. Williams P, Basu S, Garcia-Manero G, Hourigan CS, Oetjen KA, Cortes JE, et al.. The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2019;125(9):1470-81.
90. Yao Y, Zhou J, Wang L, Gao X, Ning Q, Jiang M, et al.. Increased PRAME-specific CTL killing of acute myeloid leukemia cells by either a novel histone deacetylase inhibitor chidamide alone or combined treatment with decitabine. *PLoS One.* 2013;8(8):e70522.

10. VERZEICHNIS DER EIGENEN ARBEITEN

Augsberger C, Hänel G, Xu W, Pulko V, Hanisch LJ, Augustin A, et al.. Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody. *Blood*. 2021;138(25):2655-69.

Beck B, Dörfel D, Lichtenegger FS, Geiger C, Lindner L, Merk M, et al.. Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission. *J Transl Med*

Haubner S, Perna F, Köhnke T, Schmidt C, Berman S, Augsberger C, et al.. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia*. 2018;33(1):64-74.

Hänel G, Angerer C, Petry K, Lichtenegger FS, Subklewe M. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2021:1-14.

Kocabey S, Meinel H, MacPherson IS, Cassinelli V, Manetto A, Rothenfusser S, et al.. Cellular Uptake of Tile-Assembled DNA Nanotubes. *Nanomaterials*. 2014;5(1):47-60.

Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, Köhnke T, et al.. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*. 2014;123(3):356-65.

Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Köhnke T, et al.. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3-BiTE® antibody construct AMG 330: reversing a T-cell induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 2015;30(2):484-91.

Lichtenegger FS, Mueller K, Otte B, Beck B, Hiddemann W, Schendel DJ, et al.. CD86 and IL-12p70 Are Key Players for T Helper 1 Polarization and Natural Killer Cell Activation by Toll-Like Receptor-Induced Dendritic Cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e44266.

Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Hiddemann W, Subklewe M. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy*. 2013;5(1):63-78.

Lichtenegger FS, Lorenz R, Gellhaus K, Hiddemann W, Beck B, Subklewe M. Impaired NK cells and increased T regulatory cell numbers during cytotoxic maintenance therapy in AML. *Leuk Res*. 2014;38(8):964-9.

Lichtenegger FS, Krupka C, Köhnke T, Subklewe M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol.* 2015;52(3):207-14.

Lichtenegger FS, Kondla I, Krempasky M, Weber AL, Herold T, Krupka C, et al.. RNA and protein expression of herpesvirus entry mediator (HVEM) is associated with molecular markers, immunity-related pathways and relapse-free survival of patients with AML. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(12):1505-15.

Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Köhnke T, Subklewe M. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):142.

Lichtenegger FS, Rothe M, Schnorfeil FM, Deiser K, Krupka C, Augsberger C, et al.. Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol.* 2018;9:385.

Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Rothe M, Deiser K, Altmann T, Bücklein VL, et al.. Toll-like receptor 7/8-matured RNA-transduced dendritic cells as post-remission therapy in acute myeloid leukaemia: results of a phase I trial. *Clin Transl Immunology.* 2020;9(3):e1117.

Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, DFR B, Vick B, Heuer EM, et al.. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia.* 2020;34(4):1017-26.

Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, et al.. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol.* 2015;8(1):93.

Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, Javorovic M, Kvalheim G, Schendel DJ, et al.. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(10):1093-103.

Van Acker HH, Versteven M, Lichtenegger FS, Roex G, Campillo-Davo D, Lion E, et al.. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2019;8(5):579.