

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

**Antikörper-basierte Immuntherapie
bei Akuter Myeloischer Leukämie: Einfluss von
immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die
CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte T-Zellaktivierung und die T-
Zellvermittelte Zytotoxizität**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Sarah Platzer
aus
Graz, Österreich

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

| | |
|---|--|
| Berichterstatterin: | <u>Frau Prof. Dr. Marion Subklewe</u> |
| Mitberichterstatter: | <u>Herr PD Dr. Christian Kellner</u> |
| | <u>Herr Prof. Dr. Tobias Feuchtinger</u> |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | <u>Frau Dr. Christina Heitmüller (geb. Krupka)</u> |
| Dekan: | <u>Herr Prof Dr. med. Thomas Gudermann</u> |
| Tag der mündlichen Prüfung: | <u>04.05.2023</u> |

Eidesstattliche Versicherung

Name: Platzer
Vorname: Julia Sarah

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Antikörper-basierte Immuntherapie bei Akuter Myeloischer Leukämie: Einfluss von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte T-Zellaktivierung und die T-Zellvermittelte Zytotoxizität

selbständig verfasst, mich außer der angegeben keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Landshut, 28.08.2023

Ort, Datum

Julia Sarah Platzer

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| I | Einleitung | 1 |
| 1 | Akute Myeloische Leukämie | 1 |
| 1.1 | Therapie bei AML | 1 |
| 1.2 | Medikamente in der Therapie von AML..... | 3 |
| 2 | Immuntherapie im Einsatz gegen die Akute Myeloische Leukämie | 6 |
| 2.1 | Allogene Stammzelltransplantation als Mutter der Immuntherapie | 6 |
| 2.2 | Antikörperbasierte Immuntherapie in Anwendung bei AML | 6 |
| 2.3 | Definierte Targets und neue mögliche Targets bei AML | 9 |
| 2.4 | Cytokine-Release-Syndrome | 11 |
| II | Konzept | 13 |
| 1 | Zielsetzung | 13 |
| 2 | Fragestellung | 13 |
| III | Material und Methoden | 14 |
| 1 | Material | 14 |
| 1.1 | Medien, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze | 14 |
| 1.2 | Geräte, Zubehör und Computerprogramme | 15 |
| 1.3 | Selbsthergestellte Medien und Puffer..... | 16 |
| 1.4 | Kits | 16 |
| 1.5 | Zelllinien | 17 |
| 1.6 | Humanes Zellmaterial..... | 17 |
| 1.7 | Antikörper und weitere Substanzen für Färbungen | 18 |
| 1.8 | CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HALB zzgl. Jeweiliger Negativkontrollen | 18 |
| 2 | Methoden | 19 |
| 2.1 | Isolation von mononukleären Zellen aus Knochenmark bzw. Vollblut von Patienten und gesunden Spendern..... | 19 |
| 2.2 | Kryokonservierung von mononukleären Zellen..... | 20 |
| 2.3 | Auftauen kryokonservierter mononukleärer Zellen..... | 20 |
| 2.4 | Zellzählung und Viabilitätsmessung | 20 |
| 2.5 | Herstellung eines Nährbodens für Patientenproben mit MS5-Nährzellen..... | 20 |
| 2.6 | MACS Pan-T-Zell-Isolation von gesunden Vollblutspenden | 21 |
| 2.7 | CFSE-Färbung der T-Zellen..... | 21 |
| 2.8 | Färbung der Oberflächenmarker mittels Fluorchrom-markierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie..... | 22 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.9 | Durchflusszytometrie | 22 |
| 2.10 | Cytometric Bead Array..... | 23 |
| 2.11 | Bestimmung der physiologischen Medikamentenkonzentrationen in Überständen der Zellkulturen..... | 23 |
| 2.12 | Analyse der Auswirkung von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die Expression von Oberflächenantigenen der AML-Blasten | 24 |
| 2.13 | Analyse der Auswirkung von Dexamethason und Tocilizumab auf die Expression von Oberflächenantigenen der AML-Blasten | 24 |
| 2.14 | Analyse der Auswirkung von zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen auf die Zytotoxizität der T-Zellen unter Anwendung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 | 25 |
| 2.15 | Analyse der Auswirkung von Dexamethason und Tocilizumab auf die Zytotoxizität der T-Zellen in Patientenproben unter Anwendung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 | 26 |
| 2.16 | Ausblick: Vergleich des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 mit halbwertszeit- verlängernden Konstrukten hinsichtlich T-Zellaktivierung und Zytotoxizität | 26 |
| 2.17 | Durchflusszytometrische Auswertung | 27 |
| 2.18 | Statistische Auswertung | 28 |
| IV | Ergebnisse | 29 |
| 1 | Einfluss von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte <i>in vitro</i> T-Zellaktivierung und die T-Zellvermittelte Zytotoxizität mit Spender-T-Zellen und AML-Blasten von Zelllinien | 29 |
| 1.1 | Vergleich der <i>in vitro</i> T-Zellaktivierung durch den CD/CD33 BiTE® AMG 330 nach Vorbehandlung der T-Zellen mit Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine | 29 |
| | | 30 |
| 1.2 | Vergleich der <i>in vitro</i> T-Zellvermittelten Zytotoxizität des CD3/CD33 BiTE® AMG 300 Einfluss von Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine..... | 31 |
| 1.3 | Statistische Auswertung | 34 |
| 2 | Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason auf die CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte T-Zellaktivierung und die T-Zellvermittelte Zytotoxizität in Patientenproben <i>ex vivo</i> 35 | |
| 2.1 | Vergleich der T-Zell-Aktivierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter <i>ex vivo</i> Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason | 35 |
| 2.2 | Vergleich der T-Zellvermittelten Zytotoxizität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter <i>ex vivo</i> Einfluss von Tocilizumab und Dexamthason | 36 |
| | | 36 |
| 2.3 | Vergleich der Zytokinsekretion des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter <i>ex vivo</i> Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason | 38 |
| 3 | Veränderungen der Oberflächenexpression unter Vorbehandlung von AML-Zelllinien mit immunmodulierenden Substanzen <i>in vitro</i> | 39 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.1 | Vergleich der Oberflächenexpression von CD157 auf AML-Zelllinien unter <i>in vitro</i> Einfluss mit immunmodulierenden Substanzen | 39 |
| 3.2 | Vergleich der Oberflächenexpression von CD33 auf AML-Zelllinien unter <i>in vitro</i> Einfluss von immunmodulierenden Substanzen..... | 40 |
| 3.3 | Vergleich der Oberflächenexpression von CD123 auf AML-Zelllinien unter <i>in vitro</i> Einfluss von immunmodulierenden Substanzen..... | 41 |
| 4 | Ausblick: Auswirkung von halbwegszeitverlängernden Konstrukten auf die von CD3/CD33 BiTE® AMG 330 vermittelte <i>ex vivo</i> T-Zellaktivierung und Zytotoxizität in Patientenproben..... | 42 |
| 4.1 | Vergleich der <i>ex vivo</i> T-Zell-Aktivierung mit CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB..... | 42 |
| 4.2 | Vergleich der <i>ex vivo</i> T-Zell-vermittelten Zytotoxizität mit CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB..... | 42 |
| V | Diskussion | 44 |
| 1 | Einfluss von Substanzen auf Target – ein Überblick über mögliche Therapiekombinationen | 44 |
| 1.1 | Lenalidomid | 45 |
| 1.2 | Azacytidine | 46 |
| 1.3 | Decitabine..... | 48 |
| 1.4 | Dexamethason und Tocilizumab | 50 |
| 2 | Management des CRS und die Auswirkung auf die antikörperbasierte Immuntherapie 51 | |
| 3 | Ausblick: Aktuelle Ansätze zur Verlängerung der Halbwertszeit bei BiTE®-Antikörperkonstrukten | 52 |
| VI | Zusammenfassung..... | 54 |
| VII | Literaturverzeichnis..... | 55 |
| VIII | Abkürzungsverzeichnis | 68 |
| IX | Anlagen..... | 70 |
| 1 | Abbildungsverzeichnis | 70 |
| 2 | Tabellenverzeichnis | 73 |
| 3 | Danksagungen | 74 |
| 4 | Curriculum vitae | 75 |
| 5 | Publikationen..... | 76 |

I Einleitung

1 Akute Myeloische Leukämie

Die *International Agency for Research on Cancer* schätzt die Zahl der Krebsneuerkrankungen auf rund 18 Millionen und die Zahl der Krebstoten weltweit für das Jahr 2018 auf rund 9,56 Millionen. Davon sind Lungen-, Magen-, Darm-, Leber- und Brustkrebs für über die Hälfte der Todesfälle verantwortlich. [1]

Nach Lungen-, Magen-, Darm-, Leber- und Brustkrebs ist die Gruppe der bösartigen Neubildungen des blutbildenden Systems als häufigste Krebsneuerkrankung aufgeführt. Allein 2016 wurde bei 13.900 Menschen in Deutschland eine Leukämie neudiagnostiziert. Der Anteil der Patienten, die an Akuter Myeloischer Leukämie (AML) erkrankten, lag dabei geschlechtsunabhängig bei 23% (Anteile nach Geschlecht: Frauen: 25%; Männer: 22%). Das altersunabhängige 5-Jahres-Überleben lag in diesem Zeitraum bei circa 21% - für die Altersgruppe >65 Lebensjahren liegt diese sogar <10%. [2, 11, 76]

Als AML bezeichnet man eine Erkrankung von hämatopoetischen Zellen, die durch genetische Veränderung zu einer Deregulation in Wachstum und Differenzierung dieser Zellen führt. Hierdurch akkumulieren unreife myeloische Zellen, die zwar teilungsfähig aber funktionell absolut unreif sind. Diese Zellen werden im Folgenden als „AML-Blasten“ bezeichnet. Diese Deregulation führt zu einer unkontrollierten Expansion der AML-Blasten, die schlussendlich zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese führen. Differentialdiagnostisch sichern lässt sich die Diagnose entweder durch Nachweis von >20% AML-Blasten im peripheren Blut bzw. Knochenmark oder durch den Nachweis von AML-bestimmenden Mutationen. Je nach genetischer Mutation wird die AML in unterschiedliche Subtypen eingeteilt, welche sich teilweise in den Erstlinien-Therapien unterscheiden. [3] [174]

Zu diesen Therapieansätzen gehören auch immuntherapeutische Behandlungskonzepte, zu denen ich in der vorliegenden Dissertation Daten erhoben habe. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt hierbei auf der antikörperbasierten Immuntherapie mit einem CD3/CD33 bispezifischen Antikörperkonstrukt.

1.1 Therapie bei AML

Nach der Diagnosestellung einer Leukämie werden zunächst mittels Morphologie, Immunophänotypisierung und zytogenetischen Untersuchungen die Subgruppe der AML sowie positive und negative prognostische Faktoren festgestellt. [4] Bis auf die Subgruppe der Akuten Promyelozytären Leukämie, welche eine spezifische Therapie verlangt, werden die übrigen Subgruppen anhand klinischer Scores in sogenannte „fite“ (Lebensalter <75 Jahre, keine bzw.

wenige Komorbiditäten und „unfitte“ (Lebensalter >75 Jahre, schwerwiegende Komorbiditäten) Patientengruppen eingeteilt. [174]

Die daraufhin eingeleitete Erstlinien-Therapie bei den sogenannten „fitten“ Patienten verfolgt einen kurativen Ansatz mittels Polychemotherapie im 7+3 Schema mit Ara-C und Daunorubicin. Je nach genetischen Mutationen können in diesem Fall weitere zielgerichtete Therapeutika eingesetzt werden: wird der Oberflächenmarker CD33 nachgewiesen, wird zusätzlich zur Polychemotherapie Gemtuzumab-Ozagmicin, ein Anti-CD33-Antikörper eingesetzt; bei Nachweis einer FLT3 Mutation, wird neben der Polychemotherapie Midostaurin, ein FLT3-Inhibitor, verwendet. Im Rahmen von AML bei Myelodysplastischen Veränderungen oder therapieassoziierter AML wird eine Polychemotherapie mittels CPX351, welches einer liposomalen Formulierung von Cytarabin und Daunorubicin entspricht, durchgeführt. Nach Erreichen einer kompletten Remission folgt die Postremissionstherapie, welche durch Elimination von residualen leukämischen Stammzellen ein Rezidiv verhindern soll. Für die Konsolidierungstherapie gibt es die Möglichkeit der weiteren konventionellen Chemotherapie entweder mittels Ara-C in höherer Dosierung zzgl. der zielgerichteten Therapiemöglichkeiten oder einer allogenen Stammzelltransplantation. [3-4, 12, 15-17, 23, 25-26, 28, 31, 78, 99-103, 115, 174]

Bei der sogenannten „unfitten“ Patientengruppe steht die Lebensverlängerung bzw. Lebensqualität im Mittelpunkt. Hierzu wird als First-Line-Therapie zunächst eine hypomethylierende Substanz mit Venetoclax, einem zielgerichteten BCL2-Inhibitor, kombiniert. Alternativ werden auch eine Monotherapie von hypomethylierenden Substanzen oder Kombinationen von niedrig dosiertes Ara-C mit Venetoclax oder Glasdegib, einem Hedgehodge-Inhibitor, eingesetzt. [3-4, 25-27, 37, 104-107, 114, 174]

Im Falle eines Rezidivs wird anhand verschiedener klinischer Scores entschieden, ob der Patient für eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommt. Falls eine allogene Stammzelltransplantation möglich ist, wird zunächst anhand des Status einer FLT3-Mutation eine Re-Induktionstherapie durchgeführt. Bei FLT3-Wildtyp erfolgte diese als Re-Induktionstherapie mit Chemotherapeutika entsprechend der Firstline-Therapie. Bei einer FLT3-Mutation kann Gliterinib, ein FLT3-Inhibitor, eingesetzt werden. Nach Durchführung der Re-Induktionstherapie erfolgt die allogene Stammzelltransplantation. [4-6, 25, 27, 78-79, 80-83, 174]

Bei Patienten, die den Kriterien einer allogenen Stammzelltransplantation nicht entsprechen, wird ebenfalls zwischen FLT3-Wildtyp oder einer FLT3-Mutation unterschieden. Letzteres wird mittels Gliderinib-Monotherapie behandelt. Im Falle eines FLT3-Wildtyp und bisher nicht erfolgter Therapie mit hypomethylierenden Substanzen wird eine Chemotherapie mit diesen in Kombination mit Venetoclax empfohlen. Falls eine nicht-naive FLT3-Wildtyp AML vorliegt,

wird anhand weiterer vorliegender Mutationen im Isocitrat-Dehydrogenase 1/2-Gen die weitere Therapie entschieden: bei IDH1-Mutation kann Ivosidenib bzw. bei IDH2-Mutation kann Enasidenib als IDH1 bzw. IDH2-Inhibitoren eingesetzt werden. Im Falle eines IDH1/2-Wildtyps gibt es unterschiedliche Therapiemöglichkeiten, u.a. Kombinationstherapien von hypomethylierenden Substanzen mit Venetoclax oder niedrig dosiertem Ara-C mit Venetoclax sowie der Einsatz einer Monotherapie mit Gemtuzumab-Ogamazin bei CD33+ Mutation und eine Monotherapie mit Mephalan. [4-6, 25-27, 78-79, 80-83, 89, 94-98, 174]

1.2 Medikamente in der Therapie von AML

Tabelle 1: Eingesetzte Medikamente in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie

| Name | Wirkstoffbezeichnung | Mechanismus | Indikation |
|----------------------|---|---|---|
| Gemtuzumab-Ozagmicin | Anti-CD33-Antikörper-Wirkstoff-Konjugat | Spezifische Bindung an CD33-Antigen auf AML-Blasten, intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes N-Acetyl-Gamma-Calicheamicin, welches DNA-Doppelstrangbrüche induziert und zur Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion führt. [3, 4, 12, 15, 16, 17, 23, 31, 179] | AML (Induktion bei ED) mit CD33 + Mutation, Kombination mit Chemotherapeutika |
| Midostaurin | FLT3-Inhibitor Multikinase-Inhibitor | Hemmung der Kinasen FLT3 und KIT dadurch resultierender Zellzyklusstillstand und Apoptoseinduktion [4-6, 25-27, 78, 79, 80-83, 115, 178] | AML bei FLT3-Mutation (Induktion, Konsolidierung, Erhaltung bei ED) |
| CPX-351 | rekombinant hergestellte liposomaler Träger von Cytarabine und Daunorubicin (in einem 5:1 Verhältnis) [25, 28, 99-103, 197] | s. Mechanismus von Cytarabine und Daunorubicin | AML ED, therapie-assoziierte AML, MDS-assoziierte AML [197] |
| Ara-C bzw. Cytarabin | Pyrimidinnukleosid-Analogon | Hemmung der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus durch Interkalierung [177] | AML (Induktion, Konsolidierung, Erhaltung bei ED) |
| Decitabine | Hypomethylierende Substanz Nukleosid-Analogon | Durch Hemmung der DNS-Methyltransferase kommt es zur Hypomethylierung von Gen-Promotoren resultierend in einer Reaktivierung von Tumorsuppressor-Genen mit Induktion der Zelldifferenzierung und des programmierten Zelltod [4, 7, 8, 10, 25, 26, 27, 84-91, 175] | AML bei „unfitter“ Patientengruppe |

| | | | |
|------------------------|--|---|---|
| Azacytidine | Hypomethylierende Substanz Pyrimidin-Analogon | Durch Hemmung der DNA-Methyltransferase kommt es zur Hypomethylierung und damit zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Zudem weist es unklare zytotoxische Mechanismen auf. [4, 7, 8, 10, 25, 84-89, 176] | AML bei „unfitter“ Patientengruppe, >65 Lebensjahre, AML mit sehr hohem Blastenanteil Aktuell in Zulassungsprozess für Erhaltungstherapie in Remission |
| Venetoclax | BCL2-Inhibitor | Bindung des BCL2-Gen resultierend in einer erhöhten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, Aktivierung von Caspasen und Apoptoseinduktion [25- 27, 37, 104-107, 180] | AML, nicht-kurative Absicht in Kombination mit Azacytidine oder Ara-C |
| Glasdegib | Hedgehoge-Inhibitor SMO-Inhibitor | Aktivitätsminderung des GLI-Transkriptionsfaktor resultierend in der Reduktion des leukämischen Potentials von AML-Blasten und Erhöhung der Sensitivität der AML-Blasten gegen Chemotherapeutika [25, 114, 181] | AML bei nicht-kurativem Therapieansatz, in Kombination mit Ara-C oder Azacytidine |
| Gliterinib | FLT3-Inhibitor Multikinaseinhibitor | Induktion von Apoptose bei leukämischen Zellen [4, 5, 6, 25, 27, 78, 79, 80-83, 182] | AML Rezidivtherapie bei FLT3-Mutation |
| Ivosidenib | IDH1-Inhibitor | Reduktion von 2-Hydroxyglutarat in AML-Blasten zur Induktion der Zellreifung [5, 25, 26, 27, 89, 94-98, 183] | AML mit IDH1-Mutation bei Rezidiv, nicht zugelassen |
| Enasidenib | IDH2-Inhibitor | Reduktion von 2-Hydroxyglutarat in leukämischen Zellen zur Induktion zur Zellreifung in Blasten [5, 25, 26, 27, 89, 94-98, 193] | AML mit IDH2-Mutation bei Rezidiv, nicht zugelassen |
| Mephalan | Alkylierende Substanz | bewirkt Quervernetzung von DNA-Strängen resultierend in der Hemmung der Zellreplikation [184] | Nicht-kurative Therapie bei Rezidiv, >65 Lebensjahre |
| All-trans-Retinolsäure | | Bindung an nuklearen Retinsäure-Rezeptor und Induktion dessen Abbaus [185] | Akute Promyelozytäre Leukämie (Induktion bei ED und Rezidiv) |
| Arsentrioxid | | Induktion der DNS-Fragmentierung resultierend in Apoptoseinduktion [186] | Akute Promyelozytäre Leukämie (Induktion bei ED und Rezidiv, Konsolidierung bei ED) |

| | | | |
|--------------|---|---|--|
| Daunorubicin | Zytostatikum, Anthrazyklin Antibiotikum mit antineoplastischen Eigenschaften | Hemmung der DNS- und RNS-Synthese mittels DNS-Interkalation und Inhibition der Topoisomerase-II-Aktivität [187] | AML (Induktion ED) |
| Etoposid | Zytostatikum | Verursacht DNA-Doppelstrangbrüche und Interaktion von DNA-Topoisomerase II resultierend in Apoptoseinduktion [188] | AML (Induktion im Kindesalter, Re-Induktion bei Rezidiv) |
| Hydroxyurea | Zytostatikum | Hemmung der DNA-Synthese durch Inhibition des Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor [189] | Im Zulassungsprozess: AML bei Hyperleukozytose |
| Idarubicin | Daunorubicin-Analogon Anthrazyklin | DNA-Interkalation und Topoisomerase-II-Inhibition resultierend in der Hemmung der Nukleinsäuresynthese [194] | AML (Induktion und Konsolidierung bei ED) |
| Mitoxantron | Zytostatikum | Verursacht Quervernetzung von DNS-Strängen, inhibiert die Topoisomerase II und resultiert in Apoptose-Induktion [190] | AML |
| Thioguanin | Purinantagonist | Hemmung der De-Novo Purinsynthese [191] | AML (Induktion, Konsolidierung) |
| Sorfafenib | FLT3-Inhibitor Multikinase-Inhibitor | Hemmung von Targets an der Tumorzelle (CRAF, BRAF, C-KIT, FLT3) und der Angiogenese (VEGFR, CRAF, PDGFR) [4, 5, 6, 25, 27, 78, 79, 80-83, 192] | ED AML mit FLT3-Mutation, Erhalt nach allogener SZT |
| Lenalidomid | Immunmodulator | Bindung an Cereblon (Enzymkomplex), welcher die Transkriptionsfaktoren Aiolos und Ikaros rekrutiert, diese durch Ubiquinierung dem Abbau zuführt und in zytotoxischen und immunmodulierenden Effekten resultiert [75, 92-93, 195-196] | AML bei „unfitter“ Patientengruppe, >65 Lebensjahre |

2 Immuntherapie im Einsatz gegen die Akute Myeloische Leukämie

2.1 Allogene Stammzelltransplantation als Mutter der Immuntherapie

Die allogene Stammzelltransplantation ist eine effektive, aber risikoreiche Therapiemöglichkeit, die bei sorgfältiger Abwägung in folgenden Fällen bei der „fitten“ Patientengruppe indiziert ist: Konsolidierung bei Erstdiagnose, Rezidivtherapie. [174, 198, 201]

Der Wirkmechanismus erfolgt über den sogenannten Graft-Versus-Leukemia-Effekt, welcher eine zytotoxische Wirkung der CD3+ Spender-T-Zellen gegenüber leukämischen Antigenen beschreibt. [198, 202]

Ein weiterer Effekt ist der sogenannte Graft-Versus-Host-Effekt, welche eine unerwünschte Reaktion der CD3+ Spender-T-Zellen gegen „minor histocompatibility antigens“ des Empfängers beschreibt. Um den unerwünschten GvH-Effekt zu minimieren, wird als Spender ein HLA-identisches Spender-/Empfängerpaar ausgesucht. Versuche den GvH-Effekt vollständig zu eliminieren durch Entfernung der Spender-T-Zellen aus dem Transplantat gehen allerdings mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher. Es zeigt sich, dass eine Entwicklung einer GvH-Effekts nach allogener Stammzelltransplantation mit einer verminderten Rezidivrate assoziiert ist. [198, 199-200, 202]

2.2 Antikörperbasierte Immuntherapie in Anwendung bei AML

Die antikörperbasierte Immuntherapie versucht über verschiedene Mechanismen den Wirkungsgrad einer allogenen Stammzelltransplantation zu erreichen. Antikörper können hierbei über unterschiedliche Zielantigene und entsprechenden Effektormechanismen antineoplastisch wirken. Als häufig eingesetztes Targetmolekül auf den AML-Blasten wird der Oberflächenmarker CD33 verwendet. Dieses Target wurde bereits in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Studien als Ziel der antikörperbasierten Immuntherapie beschrieben und findet bereits Anwendung in der Therapie der AML. Neben Versuchen monoklonale CD33-Antikörper als Monotherapie oder als Konjugat mit radioaktiven Partikeln einzusetzen, haben sich vor allem zwei Arten der antikörperbasierten Immuntherapie durchgesetzt auf die ich im Folgenden eingehen möchte. [12, 16, 19, 21, 22]

2.2.1 Antikörper-Toxin-Konjugate

Der Mechanismus von Antikörper-Toxin-Konjugaten (ADC = antibody-drug-conjugates) erfolgt durch eine Verbindung eines tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers mit einem zytotoxischen Medikament. Der Antikörper bindet an den Rezeptor der Tumorzelle und wird in das Endosom internalisiert. Durch den niedrigen pH-Wert im lysosomalen Kompartiment in der Zelle wird das Zytotoxin aus der stabilen Bindung entlassen und entfaltet seine spezifische Wirkung, was in der Induktion einer Zellapoptose resultiert. [12, 14]

Im Kapitel 1.1 ist uns bereits Gemtuzumab-Ozogamicin (GO) als Bestandteil der Standardtherapie bei AML begegnet. GO ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD33, welcher als Oberflächenmarker auf AML-Blasten exprimiert wird, und ist mit dem Zytotoxin Calicheamicin konjugiert. Die Wirkung erfolgt über die intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffes N-Acetyl-Gamma-Calicheamicin, welches DNA-Doppelstrangbrüche induziert und zu einem Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion führt. Die Zulassung umfasst insbesondere die Induktionstherapie bei einer AML Erstdiagnose bei Nachweis einer CD33+ Mutation sowie in der Rezidivtherapie. [3, 4, 12, 15, 16, 17, 23, 31, 179]

Zudem gibt es mehrere ADCs, die in klinischer Erprobung sind. Vadastuximab-Talirine ist ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen CD33, welcher an Pyrrolobenzodiazepine (PBD) gebunden ist. Das Zytotoxin verursacht Zellapoptose durch Bindung an DNA-Strukturen und Störung der Zellteilung. Dieser zeigt sich in ersten klinischen Studien wirksam – auch in AML Subgruppen, die bisher nicht gut auf GO angesprochen haben. [12, 18, 23]

Ein weiteres Beispiel für einen ADC, der CD33 als Oberflächenmarker nutzt, ist HUM-195. HUM-195 ist mit einem rekombinanten Glenon (rGel) verbunden, welches auf ribosomaler Ebene die Proteinsynthese verhindert. *In vitro* hat der HUM-195/rGel eindrucksvolle zytotoxische Effekte gezeigt, welche in *in vivo* Modellen bestätigt wurden. In ersten klinischen Untersuchungen zeigt sich jedoch keine deutliche Verbesserung im Vergleich zu bisherigen Therapieansätzen. [12, 21]

Ein weiteres Beispiel für einen ADC in der Behandlung von AML ist ein monoklonaler CD123-Antikörper, welcher an auch an PBD gebunden wurde. Der Oberflächenmarker CD123 ist Teil des Interleukin-3-Rezeptors, der ebenfalls auf AML-Blasten exprimiert wird. In präklinischen Studien zeigt der ADC vielversprechende Ergebnisse, vor allem in Kombination mit einem FLT3-Inhibitor in FLT3-genmutierten AML-Modellen. [12, 20]

2.2.2 Bispesifische Antikörper

Bereits seit den 80er Jahren werden bispesifische Antikörper hergestellt. Ein solches Konstrukt hat zwei unterschiedliche Erkennungsstellen und kann daher – im Gegensatz zu einem herkömmlichen Antikörper – zwei unterschiedliche Antigene binden. In den meisten Fällen bindet der Antikörper auf der einen Seite über den Oberflächenmarker CD3 an T-Zellen. Auf der anderen Seite wird ein tumorspezifischer Marker ausgewählt, um die Targetzelle zu binden. So wird eine immunologisch wirksame Synapse zwischen T-Zelle und Tumorzelle gebildet. Mittels der Aktivierung der T-Zelle wird dadurch eine T-Zell-induzierter Zelltod durch Granzyme B und Perforin initiiert. [29, 38, 39]

2.2.2.1 Mechanismen und Bauweise von bispesifischen Antikörpern

Eine Bauweise ist es die bispesifischen Antikörper aus variablen Einzelketten eines humanen IgGs herzustellen. Hierbei werden die variablen Domänen der schweren und leichten Kette zweier Antikörper mittels Polypeptid-Linker verbunden. Hierunter fallen folgende Typen: [41]

- BiTE[®]: Ein „bispecific T-Cell-Engager“ wird aus zwei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern hergestellt, die mit einem kurzen flexiblen Linker verbunden sind, der eine flexible Rotation beider Arme gewährleistet. Das bekannteste Beispiel hierfür ist wohl der CD3/CD19-BiTE[®] Blinatumomab, der bei ALL erfolgreich eingesetzt wird. In dieser Doktorarbeit wird näher auf den CD3/CD33-BiTE[®] AMG 330 eingegangen. [29, 40, 41]
- DART[®]: „Dual Affinity Re-Targeting“-Konstrukte sind ebenso aus zwei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern hergestellt, allerdings sind sie durch zwei Linker gekreuzt verbunden. Laut präklinischen Studien sei dies eine stabilere Form als ein BiTE[®]. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte CD3/CD123-DART[®] MGD006, der gegen AML in klinischer Erprobung ist. [40, 41]
- Tandem Diabodies[®]: Diese Untergruppe beschreibt ein tetravalentes Konstrukt aus monoklonalen Antikörpern des IgG-Typs, mit jeweils zwei möglichen Bindungsstellen für sowohl Antigene der Targetzelle als auch der Effektorzelle. Beispiele hierfür sind u.a. der CD3/CD19 Tandem-Diabody[®] AFM111, welcher in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen und ALL eingesetzt wird, und der CD30/CD16a Tandem-Diabody[®] AFM 113, welcher durch Stimulation von natürlichen Killerzellen bei Morbus Hodgkin und beim malignen T-Zell Lymphom in klinischer Erprobung ist. [40, 41]
- CiTE[®]: Ein *checkpoint inhibitory T-Cell-Engager* ist eine Weiterentwicklung des BiTE[®] mit einer fusionierten extrazellulären Domäne zur Bindung und Inhibition eines Checkpoints. Herrmann et al entwickelte einen CD3-CD33-PD1 CiTE[®] der in vitro gute Ergebnisse zeigte. [71]
- BiKE[®]: Ein *bispecific Killer-Cell-Engager* gilt als Abwandlung des BiTE[®], der im Gegensatz zum BiTE[®] nicht gegen einen Oberflächenmarker auf T-Zellen bindet, sondern mit natürlichen Killerzellen interagiert. Als Beispiel wäre CD16/CD33-BiKE[®] zu nennen, der in präklinischer Erprobung ist. [72]
- TriKE[®]: Ein *trispecific Killer-Engager* ist eine Weiterentwicklung des BiKE[®], in dem zusätzlich ein IL-15-Crosslinker eingebaut wurde. Ein Beispiel ist ein CD16/IL15/CD33-TriKE[®], der in präklinischer Entwicklung ist, zum Einsatz in der AML-Therapie. [73, 74]

Die zweite Variante ist die Herstellung von Y-förmigen bispezifischen Antikörpern. Da diese in weiterer Folge meiner Doktorarbeit keine Rolle spielen, möchte ich hier nicht weiter auf diese Gruppe eingehen.

2.2.3 Halbwertszeit der bispezifischen Antikörper

Ein typischer BiTE[®] hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und ist damit so klein, dass er renal frei filtrierte wird. Die Halbwertszeit liegt bei circa 1,25 +/- 0,63 Stunden. Da aber der Antikörper eine bestimmte Zieldosis im Körper erreichen soll, muss er dauerhaft infundiert werden. Ein

DART® hat ungefähr die gleiche Größe und macht ebenfalls eine Dauerinfusion notwendig. Im Gegensatz hierzu ist u.a. der Tandem Diabody®, welcher mit einem Molekulargewicht von circa 105 kDa nicht renal filtriert wird und somit eine längere Halbwertszeit gewährleistet. [41]

Es wurden bereits mehrere Möglichkeiten entwickelt, die Halbwertszeit der bispezifischen Antikörper zu erhöhen, und zwar durch Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens durch PEGylierung oder durch Anhängen von Polypeptidketten oder Glykoengineering. [42]

In meiner Doktorarbeit möchte ich zwei weitere Wege genauer beleuchten, die bereits als halbwertszeit-verlängernde Varianten für den CD3/CD33 BiTE® AMG 330 produziert wurden und in meiner Doktorarbeit auf ihre Effektivität geprüft werden:

- HLE-BiTE® Crossbody: Bildung eines Konstrukts durch Bindung des bispezifischen Antikörper an eine Fc-Domäne, die das Molekulargewicht deutlich erhöht. Dies wurde sowohl für BiTE® als auch für DART® bereits umgesetzt. Erste Studien zeigen hier die Erhöhung der Halbwertszeit auf bis zu 112 Stunden. [42]
- HLE-BiTE® HALB: Bildung eines Antikörper-Albumin-Konstrukts durch Bindung von Albumin an den N-, C-Terminus, die Fv-Fragmente oder an die Fc-Rezeptorbindestelle, um somit das hydrodynamische Volumen und das Molekulargewicht zu erhöhen. [42]

Um mit diesen Antikörperkonstrukten effektiv gegen Tumorzellen vorgehen zu können, braucht es passende Zielstrukturen auf den Tumorzellen. Im folgenden Kapitel gebe ich eine Übersicht über definierte und mögliche Targets bei der AML.

2.3 Definierte Targets und neue mögliche Targets bei AML

Tabelle 2: Definierte und mögliche Targets bei AML.

| Name | Beschreibung | Natürliche Lokalisation | Expression |
|----------------------|--|--|---|
| CD7 [30] | <i>T-Cell-Leukemia Antigen</i> [45] | Thymozyten, TZ, pre-BZ, NKZ, MZ [45] | AML [46] |
| CD11b [30, 44] | Komplexbildung mit CD18 = Mac-1 oder CR3 [45] | aktivierten LZ, MZ, GZ, NKZ [45] | AML [47] |
| CD13 [30, 44] | =Aminopeptidase N, Regulation des Proteinmetabolismus [45] | Hämatopoetische Vorläufer - zellen, GZ, MZ, Mastzellen [45] | AML [48] |
| CD25 [23, 43, 44] | =Teil des IL2-Rezeptors, mit CD122 und CD132 [45] | Thymozyten, PBSCs v.a. aktivierte TZ [45] | AML [49, 65] CML [54] B- ALL, HL, NHL [65] nicht auf NBM und HSC [55] |
| CD26 [43] | Adenosin-Deaminase-Bindeprotein [45] | TZ, BZ, NKZ, Makrophagen [45] | AML mit FLT3- Mutationen [43], CML aber nicht auf NBM [54] |
| CD30 [44] | = Zytokinrezeptor, Teil der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren- Gruppe, Regulation der Zellproliferation, -apoptose [45] | Stimulierte TZ und BZ [45] | AML [50] CML [54] |

| | | | |
|---------------------------------|--|--|---|
| CD33 [23-24, 30, 43-44, 203] | = Silgec-3, Funktion als Zelladhäsionsmolekül [45, 203] | MZ, aktivierte TZ, myeloide Vorläuferzellen, Mastzellen [45, 203] | AML, CML, NBM [23-24, 30, 43-44, 54-55, 203] |
| CD38 [23,44, 203] | = Transmembranöses Glykoprotein mit enzymatischer Funktion, reguliert Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung [45, 203] | Thymozyten, aktivierte TZ, Plasmazellen, MZ, Makrophagen, DZ, NKZ, myeloide und erythroide Vorläuferzellen [45, 203] | AML [51, 204], MM, T-NHL [65] |
| CD44 [43, 203] | = Rezeptor für Hyaluronsäure, Rolle in Zellmigration, Lymphozytenaktivierung und -adhäsion [45, 203] | Leukozyten, Erythrozyten, Epitheliale Zellen, Plättchen [45, 203] | AML, CML, NBM [54, 55, 203] |
| CD45 [23, 44] | = Tyrosinphosphatase, Regulation von Leukozyten-Funktionen | Alle kernhaltigen Hämatopoetischen Zellen [45] | v.a. AML t(8;21) [52] |
| CD47 [43] | =Integrin-assoziiertes Protein, Checkpoint [45] | Alle hämatopoetische Zellen [45] | AML, CML, NBM [53-55] |
| CD52 [23, 43] | Glykosyliertes Protein in der Zellmembran, Funktion noch nicht eindeutig geklärt [45] | Thymozyten, MZ, DZ, Eosinophile, testinale Epithelzellen [45] | AML, HSC [55] CLL [65] |
| CD56 [23, 44, 203] | Adhäsionsprotein, Regulation von Zell-zu-Zell-Adhäsionen [45, 203] | NKZ [45, 203] | AML [23, 203] CML [54] |
| CD70 [203] | Aktivierung von T-Zellen zur Zytotoxischen T-Zellen, Aktivierung von B-Zellen [203] | Thymozyten [203] | AML [203] |
| CD96 [23, 43, 203] | =Teil der Immunglobulin-Superfamilie, bindet an CD155 [45, 203] | NKZ, TZ [45, 203] | T-ALL und AML [56, 203] |
| CD98 [45] | Transport von Aminosäuren, Regulation von Zellaktivierung, -Proliferation und -Überleben [45] | LZ, MZ, GZ, intestinale Epithelzellen [45] | AML [65] |
| CD105 [43] | =Endoglin, Regulation der Angiogenese [45] | Endothelzellen, Fibroblasten [45] | Solide Tumore, AML, B-ALL [57] |
| CD114 [43] | =GCSF-Rezeptor [45] | GZ, MZ, DZ, Endothelzellen, Plättchen, Plazenta [45] | AML, CML, NBM [54] |
| CD117 [43, 203] | =cKIT = Stammzellefaktor-Rezeptor, Tyrosinkinase, Rolle in der Hämatopoese und Mastzellendifferenzierung [45, 203] | Hämatopoetische Vorläuferzellen, Thymozyten, Mastzellen, Hepatozyten, Histozyten [45, 203] | AML, CML, NBM [54-55, 58-59, 203] |
| CD123 [23-24, 44, 203] | Teil des Interleukin-3-Rezeptors, bindet spezifisch IL-3 [45, 203] | Hämatopoetische Vorläuferzellen, Basophile, Eosinophile, Mastzellen, MZ, Makrophagen, DZ, Megakaryozyten, BZ, Endothelzellen [45, 203] | AML, CML, NBM [54-55, 60-61, 203] |
| CD133 [43] | = Teil der Prominin-Gen-Familie [45] | KM, PBSCs, Neurale Stammzellen, epitheliale Zellen, Vorläuferzellen, Retinale Zellen, [45] | AML, HSC [55], Melanom und Retinoblastom [45] |

| | | | |
|---------------------------|--|--|------------------------|
| CD135 [23, 43, 203] | =FLT3, Tyrosinkinase, Wachstumsfaktor der Vorläuferzellen [45, 203] | B-Vorläuferzellen [45, 203] | AML, HSC [55, 62, 203] |
| CD157 [45] | =BST-1, Regulation von Neutrophil- /Monozytenadhäsion, Diapedesis und Tumorzellwanderung [45] | KM, GZ, MZ, Makrophagen, DZ, Endothelzellen, B- und T- Vorläuferzellen [45] | AML [45, 63-65] |
| CD184 [43] | =CXCR4, Chemokin-Rezeptor. Regulationen in der Hämatopoese, Vaskularisierung und neurologische Entwicklung [45] | Lymphoide und myeloide Vorläuferzellen, Megakaryozyten, Plättchen, TZ, BZ, GZ, MZ, Makrophagen, DZ, Vaskuläre Endothelzellen, Epithelzellen, Neuronen, und Astrozyten [45] | AML, HSC [55, 65] |
| CD371 [43-44, 203] | =CCL1, =CLEC12A, Weiterentwicklung von Dendritischen Zellen und Produktion von IL-12 [45, 203] | MZ, Makrophagen, DZ, GZ, NKZ [45, 203] | AML [43, 55, 203] |
| EPHA3 [23] | EPO-produzierender humaner Rezeptor, Tyrosinkinase [66] | Viele Organe, v.a. Gallenblase, Prostata, Placenta, Schilddrüse, Harnblase etc. [23, 66-65] | AML [65] |
| CD366 [23, 203] | =Tim3; Teil der humanen Tim- Immunglobulin-Familie. Reguliert Aktivierung von Makrophagen und THZ-1 [45, 203] | THCZ1, Tc1, Th17, regulatorische T-Zellen, NKZ, DZ, Mastzellen, MZ, Makrophagen [45, 203] | AML [45, 60] |
| CD244/ 2B4 [203] | Regulation von Aktivierung oder Inhibition der Natürlichen Killerzellen [203] | Natürliche Killerzellen in vielen Organen[203] | AML, HSC [203] |

TZ = T-Zellen, BZ = B-Zellen, MZ = Monozyten, NKZ = Natürliche Killerzellen, LZ = Lymphozyten, GZ = Granulozyten, DZ = Dendritische Zellen, KM = Knochenmark, THZ-1 = T-Helferzellen 1, MM=Multiples Myelom, HSC=Hämatopoetische Stammzellen, CML=Chronisch Myeloische Leukämie, NBM=Normales Knochenmark

In meiner Doktorarbeit werde ich vor allem auf die Targets CD33, CD123 und CD157 eingehen, für die bereits unterschiedliche Antikörper in präklinischer und klinischer Erprobung im Einsatz gegen AML sind.

2.4 Cytokine-Release-Syndrome

Als *Cytokine-Release-Syndrome* (CRS) bezeichnete man die überschüssige Aktivierung des Immunsystems nach Gabe einer zielgerichteten Immuntherapie. Die Symptome treten charakteristischer Weise zeitverzögert, zum Teil erst Wochen nach der Verabreichung des Medikaments auf. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass sie auf der Aktivierung von T-Zellen nach Bindung an ihr Zielantigen beruht. Je nach kinetischen Eigenschaften des Medikaments tritt die Bindung an das Zielantigen Tage bis Wochen nach Verabreichung ein. Das CRS ist hauptsächlich durch die Freisetzung von Interleukin-6 (IL6) verursacht. CRS im Rahmen einer Immuntherapie mit einem BiTE® ist im Rahmen der klinischen Studien mit Blinatumomab charakterisiert worden – dort variiert das

Auftreten von CRS bei 2% bis 36% aller Patienten. Aktuell therapiert man CRS mit einer präventiven Gabe von Dexamethason, einem Kortikosteroid, oder Tocilizumab, einem spezifischen IL6-Rezeptor-Inhibitor. [67]

Symptome eines CRS werden in drei Gradstufen unterteilt und anhand unterschiedlicher Skalen eingeteilt (CTCAE-Skala, MD Anderson Cancer Center/Lee-Skala, CRP-basierte Skala). Grad 1 umfasst nicht-lebensbedrohliche Symptome (Fieber, Übelkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen) und wird symptomatisch behandelt. Grad 2 umfasst bereits Anzeichen einer Organdysfunktion (Fieber und Hypotension), die medikamentös behandelt werden müssen. Grad 3 bezeichnet eine schwere Reaktion, die eine intensiv-medizinische Therapie notwendig machen. [67]

In meiner Dissertation überprüfe ich, inwieweit die Verabreichung von Dexamethason oder Tocilizumab die *in vitro* Effektivität des CD3/CD33-BiTE® AMG 330 beeinflusst. [67]

II Konzept

1 Zielsetzung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich den Einfluss zytoreduktiver und immunsuppressiver Substanzen auf die Wirkung des CD3/CD33-BiTE® AMG 330 *in vitro* charakterisiert. Da die T-Zell Funktion für die Wirkungsweise des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 unerlässlich ist, muss die Wirkung von Zytostatika und Immunsuppressiva, die teils einen direkten Einfluss auf die T-Zell-Funktion haben, untersucht werden. Um die maximale Wirkung zu gewährleisten wurde der Einfluss dieser Therapien im Rahmen einer Vorphase bzw. Kombination dieser als auch typischer Medikamente, die für eine CRS Therapie eingesetzt werden, untersucht. Um eine maximale Wirkung zu gewährleisten, braucht man zudem eine stabile Expression von Targetantigenen. Ein negativer Einfluss auf die Expression des Targetantigens würde sich ebenfalls negativ auf die Therapie Auswirkungen. Hierfür habe ich die unter II.2 folgenden Fragestellungen im Detail formuliert.

2 Fragestellung

- Welchen Einfluss hat die Inkubation mit zytoreduktiven oder anderen immunmodulierenden Medikamenten in der Vorphase einer antikörperbasierten Immuntherapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 auf die *in vitro* Zytotoxizität gegen CD33+ AML-Blasten und die *in vitro* Proliferation von Spender-T-Zellen?
- Inwieweit werden Oberflächenmarker bzw. mögliche Zielantigene auf AML-Blasten in ihrer Expression durch *in vitro* Inkubation mit zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen beeinflusst?
- Welchen Einfluss haben die Medikamente Dexamethason und Tocilizumab, die bei einem sogenannten CRS eingesetzt werden, auf die *in vitro* Zytotoxizität gegen CD33+ AML-Blasten und die *in vitro* Proliferation von Spender-T-Zellen unter Einsatz des CD3/CD33 BiTE® AMG 330?
- Werden *in vitro* Oberflächenmarker bzw. mögliche Zielantigene auf AML-Blasten in ihrer Expression durch die bei CRS eingesetzten Medikamente (Dexamethason und Tocilizumab) beeinflusst?
- Eine unabhängige, zusätzliche Fragestellung meiner Doktorarbeit beschäftigte sich mit dem Vergleich halbwertszeitverlängernde Modifikationen des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 *in vitro* und *ex vivo* (Patientenproben) im Bezug auf die Zytotoxizität gegen CD33+ AML-Blasten und die *in vitro* Proliferation von T-Zellen.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Medien, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

Tabelle 3: Medien, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| 5'-Azacythidine (Azacytidine) | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Alpha MEM Eagle Medium mit L-Glutamine, RNS, DNS und 2,2 g/L NaHCO ₃ | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE |
| β-Mercaptoethanol | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Biocoll/Ficoll 1,077 g/ml, isoton | Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Dexamethason 4 mg Injektionslösung | Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, DE |
| DMSO | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE |
| DPBS | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE |
| EDTA 0,5M pH 8,0 | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Fetales Kälberserum (FKS) | GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Formaldehyd 37% | Carl Roth & Co GmbH, Karlsruhe, DE |
| Gammunex (humanes IgG) 10% | Grifolis GmbH, Frankfurt, DE |
| Hepes-Puffer 1M | GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Lenalidomid | Selleck Chemicals, München, DE |
| MACS Humanes Fc-Rezeptor Blocking-Reagenz | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE |
| MACS BSA Stock Solution | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE |
| Penicillin-Streptomycin-Glutamin | GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Pferdeserum | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Prostaglandin E2 | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Rekombinantes humanes G-CSF | PeproTech Inc., Wien, AT |
| Rekombinantes humanes IL-2 | R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA |
| Rekombinantes humanes IL-3 | PeproTech Inc., Wien, AT |
| Rekombinantes humanes Thrombopoietin | PeproTech Inc., Wien, AT |
| RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l NaHCO ₃ und stabilem Glutamin | Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| RoActemra® Tocilizumab 20 mg/ml | F. Hoffmann – La Roche AG, Basel, CH |
| Trypanblau 0,4% | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

1.2 Geräte, Zubehör und Computerprogramme

Tabelle 4: Geräte, Zubehör und Computerprogramme

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| Adobe Illustrator CC 2015.1.0 Release | Adobe Systems Inc. |
| Bestrahlungsanlage | Atomic Energy of Canada Limited, Chalkriver, ON, CAN |
| FCAP Array™ Software Version 3.0 | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| Durchflusszytometer LSR II & FACS Diva 4 | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| Eppendorf Tubes® 1,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 10-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Falcon™ Polystyrene Round-Bottom-Tube | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| Falcon™ Conical Tube | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| Falcon™ Zellkulturflasche | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| FlowJo 9.6 | Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA |
| GraphPad PRISM 6 | Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA |
| Greiner LeucoSep™ Tube | Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Heraeus Multifuge 3 S-R Benchtop Centrifuge | Kendro, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Inkubator CO2 | Binder GmbH, Tuttlingen, DE |
| Kryoröhrchen mit Außengewinde | STARLAB GmbH, Hamburg, DE |
| Kühl- und Gefrierschränke | Liebherr Internation S.A., Bulle, Schweiz |
| Laminar-Flow Reinluftwerkbank | BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, DE |
| MACS Columns | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE |
| MACS Separator | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE |
| Microsoft Office 16.21 | Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA |
| Mikroskop Leica DM IL | Leica Microsystems, Wetzlar, DE |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Nunc™ Zellkultur-Multischalen 24- und 96-Well-Platten | Nalgene Nunc International Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Stripette™ Serologische Pipetten 1-25 ml | Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA |
| S-Monovette® Lithium-Heparin 7,5 ml | Sarsted, Nümbrecht, DE |
| Safety-Multifly® 20 G Flügelkanüle | Sarsted, Nümbrecht, DE |
| Stickstofftank | Messer Industriegase GmbH, Bad Siden, DE |
| Vortex-Genie 2 Vortexer | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA |
| ED-13 offenes Wasserbad | Julabo GmbH, Seelbach, DE |
| Zellzähler Countess | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Zellzähler Kammerobjektträger | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

1.3 Selbsthergestellte Medien und Puffer

Tabelle 5: Selbsthergestellte Medien und Puffer

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| Blastenmedium | 500 ml Alpha MEM Egale Medium + 12,5% Pferdeserum + 12,5% FKS + 5 ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin |
| FACS Fix | FACS-Puffer + 2% Formaldehyd 37% |
| FACS Puffer | 50 ml DPBS + 2,5 ml BSA 0,5% + 2 ml EDTA 0,5M |
| Kryokonservierungsmedium | 80% FKS + 20% DMSO |
| MACS Puffer | 50 ml DPBS + 2,5 ml BSA 0,5% + 2 ml EDTA 0,5M |
| R10 Medium | 500 ml RPMI 1640 Medium + 50 ml FKS + 5 ml Hepes-Puffer + 5 ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin |
| Zellkulturmedium | Blastenmedium + 20 ng/ml IL-3 + 20 ng/ml TPO + 20 ng/ml G-CSF + 57,4 µmol β2-Mercaptoethanol |

1.4 Kits

Tabelle 6: Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| CBA Human IFN-γ Flex Set | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| CBA Human IL-6 Flex Set | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II | BD Biosciences, San José, CA, USA |
| CellTrace CFSE cell Proliferation Kit | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| MACS Humanes Pan T-Zell-Isolation Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Mycoplasma Detection Kit for PCR | Minerva Biolabs GmbH, Berlin, DE |

1.5 Zelllinien

Tabelle 7: Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung | Herkunft |
|-------------|--|------------------------------|
| HL-60 | Human; Peripheres Blut aus 1976 bei AML FAB M2 einer weiblichen 35-jährigen Patientin. Mutationen: verstärkte MYC-Gen Expression; immunologische Marker: CD3-, CD4+, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, HLA-DR-. | DSMZ, Braunschweig, DE |
| Molm-13 | Human; Peripheres Blut aus 1995 bei AML FAB M5a eines männlichen 20-jährigen Patienten nach initialem MDS mit refraktärer Anämie und Blastenexzess. Mutationen: Tandemduplikation von FLT3 ohne FLT3-Proteinexpression, CBL deltaExon8 Mutation; Immunologische Marker: CD3-, CD4+, CD13 (+), CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-, cyCD68+, HLA-Dr-. | DSMZ, Braunschweig, DE |
| MS-5 | Murin; Nährzellen; Bestrahlte Fibroblasten aus Knochenmarkskulturen von C3H/HeNSIc-abstammenden Mäusen | DSMZ, Braunschweig, DE |
| MV4-11 | Human; von einem männlichen 10-jährigen Patienten mit AML FAB M%. Mutationen: t(4/11), Tandemduplikation von FLT3; Immunologische Marker: CD3-, CD4+, CD5-, CD8-, CD10-, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34-. | DSMZ, Braunschweig, DE |
| OCI-AML3 | Human; Peripheres Blut aus 1987 bei einer ED AML Subtyp FAB M4 eines männlich 57-jährigen Patienten. Mutationen: NPM1 Genmutation Typ A, DNMT3A R882C Mutation; Immunologische Marker: CD3 -, CD4+, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, cyCD68+, HLA-DR-, CD33 im aktuellen DSMZ-Katalog nicht angegeben. | DSMZ, Braunschweig, DE |

Aufbewahrung im Inkubator bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in geeigneten Kulturmedien (Leukämische Zelllinien in R10 Medium, MS5 in Blasten-Medium). Es erfolgten regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen und Untersuchungen mittels dem Mycoplasma Detection Kit via PCR.

1.6 Humanes Zellmaterial

Tabelle 8: Humanes Zellmaterial

| Herkunft der Spende | Art der Probe |
|--|-------------------------|
| Gesunde Spender-/innen | Vollblut |
| Patientenproben (Patienten/-innen mit stationärem Aufenthalt in der Medizinischen Klinik III im Klinikum Großhadern oder externe Proben-Zusendung an das Labor für Leukämiediagnostik) | Vollblut Knochenmark |

Ein schriftliches Einverständnis zur Probenentnahme mussten sowohl von Patient*innen als auch von gesunden Spender*innen unterzeichnet werden. Zusätzlich lagen eine Zustimmung des Ethikrates der LMU München sowie eine Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki vor.

1.7 Antikörper und weitere Substanzen für Färbungen

Tabelle 9: Antikörper und weitere Substanzen für Färbungen

| Hersteller | Bezeichnung | Fluoreszenz | Klon | Isotyp |
|--|------------------------|-------------|----------|---------------------------------|
| BioLegend Inc., San Diego, CA, USA | Anti-Human CD2 | APC | RPA-2.10 | Mouse IgG1, κ, MOPC-21 |
| | Anti-Human CD3 | APC | UCHT1 | Mouse IgG1, κ, MOPC-21 |
| | Anti-Mouse/Rat CD29 | APC/Cy7 | HMβ1-1 | Armenian Hamster IgG, HTK888 |
| | Anti-Mouse/Rat CD29 | PE-Cy7 | HMβ1-1 | Armenian Hamster IgG, HTK888 |
| | Anti-Human CD33 | BV-471™ | WM53 | Mouse IgG1, κ, MOPC-21 |
| | Anti-Human CD33 | PE | WM53 | Mouse IgG1, κ, MOPC-21 |
| | Anti-Human CD123 | APC | 6H6 | Mouse IgG1, κ, MOPC-21 |
| | Viabilitätsfärbung | 7-AAD | - | - |
| eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA | Anti-Human CD33 | PE | WM53 | Mouse IgG1- κ, P3.6.2.8.1 |
| | Anti-Human CD33 | PE-Cy7 | WM53 | Mouse IgG1, κ, P2.6.2.8.1 |
| | Anti-Human CD157 | PE | SY11B5 | Mouse IgG1, κ, P3.6.2.8.1 |

1.8 CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HALB zzgl. Jeweiliger Negativkontrollen

Tabelle 10: AMG 330 - Bispezifischer BiTE® Antikörper, modifizierte halbwertszeitverlängernde Konstrukte und Negativkontrollen

| Bezeichnung | Beschreibung | Hersteller |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| CD3/CD33- BiTE® AMG 330 | Bispezifischer BiTE® Antikörper zusammengesetzt aus zwei scFv-Fragmenten; N-Terminus spezifisch für CD33 (human, Javaner Affen) und C-Terminus spezifisch für ε-Kette des CD3 im TZR (human, Javaner Affen) hergestellt durch rekombinante DNA-Technologie aus einer CHO-Zelllinie und zweistufigem Reinigungsprogramm (Nickel-Chelatchromatographie, Gelfiltration) | AMGEN Research, München, DE |
| HLE-BiTE® Crossbody | CD33-Fc-Crossbody-AMG 330-BiTE® -Diabody Derivat (DART-like) mit weitestgehend inaktiviertem IgG1-Fc Teil | AMGEN Research, München, DE |
| HLE-BiTE® HALB | Humanalbumin-Fusionskonstrukt mit CD3/CD33 BiTE® AMG 330 | AMGEN Research, München, DE |
| Kontroll- AMG 330 | Bispezifischer BiTE® Antikörper zusammengesetzt aus zwei scFv-Fragmenten; statt N-Terminus Einzelkette spezifisch für Herbizide | AMGEN Research, München, DE |
| Kontroll- Crossbody | s. Crossbody; zusammengesetzt aus zwei scFv-Fragmenten; statt N-Terminus Einzelkette spezifisch für Herbizide | AMGEN Research, München, DE |
| Kontroll- HALB | s. HALB; zusammengesetzt aus zwei scFv-Fragmenten; statt N-Terminus Einzelkette spezifisch für Herbizide | AMGEN Research, München, DE |

Die Titration der einzelnen BiTE® Antikörper und deren Negativkontrollen lagen teilweise bereits vor und wurden komplementiert durch Kerstin Lämmermann, MTRA der Arbeitsgruppe. Ebenso wurden die Zelllinien auf das Vorhandensein eines IL6-Rezeptors durch Kerstin Lämmermann überprüft.

2 Methoden

2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus Knochenmark bzw. Vollblut von Patienten und gesunden Spendern

Die Vollblutproben wurden von gesunden Spendern oder im Rahmen von Routinekontrollen von Patienten der Medizinischen Klinik III des Klinikum Großhaderns entnommen. Die Knochenmarkproben der Patienten wurden bei therapeutisch und diagnostisch durchzuführenden Knochenmarkspunktionen zusätzlich abgenommen. Das Material wurde sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Patienten in heparinisierten Monovetten bzw. geeigneten Spritzen bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte anhand eines bereits in der Arbeitsgruppe verwendeten Protokolls. Hierzu wurde das Material erst 1:2 mit DPBS verdünnt. Zusätzlich bereitete man Greiner LeucoSep™ Röhrchen mit je 15 ml Bicolll vor. Maximal 25 ml der verdünnten Blutprobe wurde gleichmäßig über den Bicolll verteilt. Es erfolgt eine 30-minütige Zentrifugation (2000 rpm, ungebremst, Raumtemperatur). Durch den entstehenden Dichtegradienten bildeten die mononukleären Zellen eine gut erkennbare Schicht, die vorsichtig pipettiert werden konnte. Die gesammelten mononukleären Zellen wurden dreimal mit RPMI1640 Medium zentrifugiert (1800 rpm, Raumtemperatur). Dann erfolgte entweder eine weitere Verarbeitung in Experimenten oder sie wurden kryokonserviert.

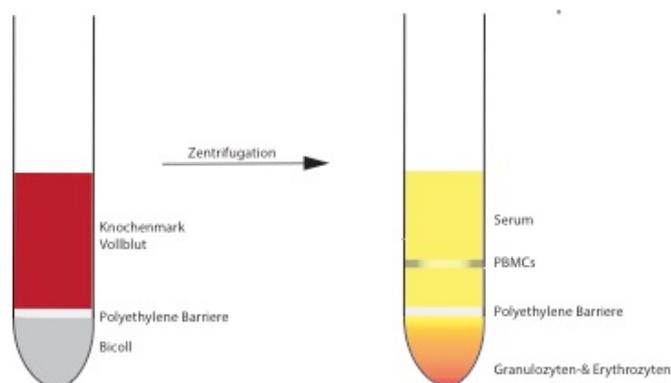


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Isolation mononukleärer Zellen aus Knochenmark oder Vollblut

2.2 Kryokonservierung von mononukleären Zellen

Die Kryokonservierung wurde für mononukleäre Zellen von gesunden Spendern und Patienten eingesetzt. Hierzu erfolgte eine Aufnahme von 1×10^7 Zellen pro 400 μl DPBS und 400 μl Kryokonservierungsmedium in ein Kryoröhrchen. Es erfolgte eine Aufbewahrung bei -80°C im Mr. Frosty – Gefrierbehälter. Die Aufbewahrung erfolgte in einem Stickstofftank.

2.3 Auftauen kryokonservierter mononukleärer Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank geholt. Daraufhin erfolgte ein zügiges Auftauen im 37°C warmen Wasserbad und Aufnahme im erwärmten R10-Medium. Die mononukleären Zellen wurden in Suspension mit R10-Medium zweimal zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur). Danach schloss sich die weitere Verarbeitung der Zellen an.

2.4 Zellzählung und Viabilitätsmessung

Ein abzentrifugiertes Zellpellet wurde in 1 ml R10 Medium oder Blastenmedium aufgenommen und mittels Vortexer durchmischt. Daraufhin wurde in einer 96-Wellplatte 20 μl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gefärbt. Es erfolgte eine Durchmischung mit einer Pipette. Dann wurde 10 μl der gefärbten Zellsuspension in einen Kammerobjektträger des Zellzählers pipettiert. Die Messung erfolgte durch den Zellzähler, welcher die Gesamtzellzahl und das Verhältnis von viablem und totem Zellmaterial ermittelte. Verifizierung des Ergebnisses erfolgte mithilfe des Mikroskops.

2.5 Herstellung eines Nährbodens für Patientenproben mit MS5-Nährzellen

Die teilbaren Nährzellen wurden in Blastenmedium aufgenommen und mittels zweistündiger Bestrahlung inaktiviert. Die daraufhin teilungsunfähigen Nährzellen wurden zentrifugiert (550 G, RT) und erneut in Blastenmedium aufgenommen. Die inaktivierten Nährzellen wurden auf einer 24-Wellplatte zu 3×10^4 Zellen pro Well verteilt. Die 24-Wellplatte wurde daraufhin für mindestens 24 Stunden inkubiert. Die Zellen bildeten auf dem Boden der 24-Wellplatte einen Nährboden für AML-Blasten. Die Funktionsweise und Handhabung der MS5-Nährzellen wurde bereits beschrieben. [68-70]

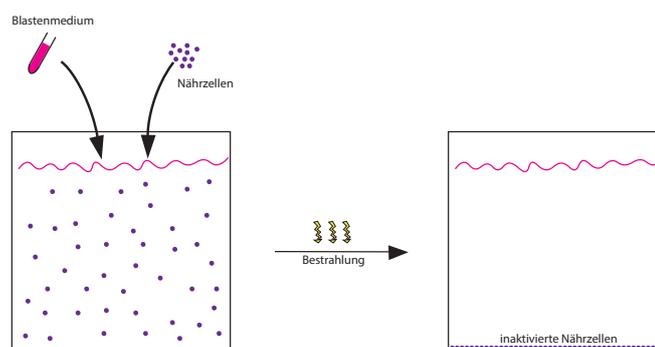


Abbildung 2: Schematische Abbildung der Herstellung eines MS5-Nährbodens für AML-Blasten

2.6 MACS Pan-T-Zell-Isolation von gesunden Vollblutspenden

Die Isolation von T-Zellen aus Vollblutproben von gesunden Spendern erfolgte gemäß der Anleitung des MACS Pan-T-Zell-Isolation-Kit von Miltenyi Biotec GmbH. Hierzu wurde nach der Isolierung der mononukleären Zellen des gesunden Spenders das Zellmaterial gezählt. Daraufhin erfolgte ein intensiver Waschvorgang in R10 Medium und Zentrifugation. Gemäß der Anleitung wurden die gewaschenen mononukleären Zellen mit 10 µl Pan-T-Zell Biotin-Antikörper Cocktail pro 1×10^7 Zellen sowie 40 µl R10 Medium pro 1×10^7 Zellen suspendiert. Der Biotin-Antikörper Cocktail markiert durch Bindung an spezifische Oberflächenmarker alle Zellen außer den T-Zellen (Dendritische Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Erythrozyten, Neutrophilie, B-Zellen, Monozyten, Stammzellen). Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation in einem Kühlschrank bei +7°C. Danach wurden 20 µl Pan-T-Zell MicroBead Cocktail pro 1×10^7 Zellen und 30 µl R10 Medium pro 1×10^7 Zellen hinzugegeben. Durch die MicroBeads wurden die zuvor an Antikörper gebundene Zellen magnetisch markiert. Es erfolgte eine weitere zehnminütige Inkubation in einem Kühlschrank bei +7°C. Während der Inkubation erfolgte eine Vorbereitung des MACS Separator und einer MACS Säule. Die MACS Säule wurde mit 3 ml R10 gereinigt. Daraufhin wurde die Zellsuspension in die Säule pipettiert. Durch den magnetischen MACS Separator verblieben die magnetisch markierten Zellen im Bereich des Magneten. Das durchgetretene R10 Medium enthält so nur die unmarkierten T-Zellen. Diese isolierten T-Zellen wurden erneut zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur) und wurden dann zur weiteren Verarbeitung in frischem R10 Medium aufgenommen.

2.7 CFSE-Färbung der T-Zellen

Mithilfe des CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit können mehrere Generationen in der Durchflusszytometrie erkannt werden. Dies erfolgte mit den isolierten T-Zellen aus Vollblut von gesunden Spendern in Suspension mit R10. Es erfolgt eine Zentrifugation (550 G, Raumtemperatur). Das Pellet wird in 4 ml PBS + 0,1% BSA aufgenommen. Zusätzlich lässt man 1 µl CFSE CellTrace (1:10 Verdünnung mit R10) langsam an der Wand des Falcon® Röhrchen hinabrinnen. Es erfolgt eine gute Durchmischung mit dem Vortexer. Es erfolgt eine zehnminütige Inkubation im Inkubator mit erneuter Durchmischung nach fünf Minuten. Daraufhin wird das Röhrchen mit eisgekühltem R10 aufgefüllt und es erfolgt eine fünf-minütige Inkubation auf Eis. Im weiteren Verlauf wird die Suspension zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet erneut mit eisgekühltem R10 aufgefüllt und zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach nahm man das Zellpellet mit raumtemperierten R10 auf und konnte die T-Zellen weiterverarbeiten.

2.8 Färbung der Oberflächenmarker mittels Fluorchrom-markierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie

Zur Markierung der Oberflächenmarker wurden die zu untersuchenden Zellpopulationen in jeweils zwei Falcon® Round Bottom Tubes bzw. Röhrchen zu je 1×10^6 Zellen überführt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation (550 G, Raumtemperatur). Nach Abschütten des Überstands erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit 10 μ l Fc-Rezeptor-Blocker pro Röhrchen in einem Kühlschrank bei +7°C. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit jeweils 3 ml FACS-Puffer zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur). Nach erneutem Abschütten des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Zellen in 100 μ l FACS-Puffer pro Röhrchen. In eines der zwei Röhrchen wurde der spezifische Fluorchrom-markierte Antikörper für den zu messenden Oberflächenmarker in der empfohlenen Menge pipettiert. In das zweite Röhrchen wurde die spezifische Isotypkontrolle in vergleichbarer Menge hinzugegeben. Unabhängig von den zu messenden Oberflächenmarker wurde bei jeder Färbung der 7-ADD Fluorchrom-markierte Antikörper zur Unterscheidung zwischen viablen und toten Zellen hinzugefügt. Nach gleichmäßiger Durchmischung durch den Vortexer erfolgte eine 25-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 7°C. Daraufhin wurde das Röhrchen erneut mit jeweils 1 ml FACS-Puffer pro Röhrchen zentrifugiert (550 G, Raumtemperatur). Im finalen Schritt erfolgte die Zugabe von 100 μ l FACS-Fix pro Röhrchen. Die Messung der Proben konnte somit bis zu drei Tage nach Färbung am Durchflusszytometer LSR II erfolgen. Alle eingesetzten Fluorchrom-markierten Antikörper sowie die spezifischen Isotypkontrollen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

2.9 Durchflusszytometrie

Die Analyse durch das Durchflusszytometer LSR II erfolgt durch einen laminaren Flüssigkeitsstrom. Durch diesen wird jede Zelle einzeln durch das Licht des eingebauten Lasers geführt, wodurch Streulicht entsteht. Die eingebauten Detektoren stehen im rechten Winkel zueinander und fangen dieses Streulicht ein. Die Detektoren wandeln das eingehende Streulicht in ein Spannungssignal um. So entstehen zwei Maße: Forwardscatter und Sidescatter. Der Forwardscatter bezeichnet das Licht, welches in Richtung des Laserstrahls gestreut wird und ist ein Wert, der die Größe der Zelle beschreibt. Der sogenannte Sidescatter dagegen bezeichnet das senkrecht zum Laser einfallende Licht und ist ein Maß, für die Granularität der Zelle. Aufgrund dieser Eigenschaft ist bereits eine Unterscheidung verschiedener Zellen bei bekannter Charakterisierung bezüglich Größe und Granularität möglich. Zu weiteren Spezifizierung kann man jedoch auch mithilfe von Fluorchrom-markierten Antikörpern spezifische Oberflächenmarker anfärben. Diese Fluorochrome absorbieren einen Teil des Lichts beim Durchtritt der Zelle durch den Laser und geben eine für das Fluorchrom spezifische Licht ab. Dieses Licht wird mithilfe der eingebauten dichroitischen Spiegel in den Fluorchrom spezifischen Wellenlängen zum Detektor geleitet. Zur Vorbereitung war die Anlage von sogenannten Färbepanels notwendig, da manche Fluorochrome ähnliche Wellenlängen

haben und somit die Messungen verfälschen können. Um dies zu verhindern, wurde eine Kompensation mit einer Kontrollprobe durchgeführt, durch die der überlappende Anteil der Wellenlänge abgezogen werden kann.

2.10 Cytometric Bead Array

Die quantitative Bestimmung von Zytokinen erfolgte gemäß der Anleitung des CBA Human Cytokine Kit von BD Biosciences. Dieser Kit beinhaltet je nach Produktgröße einen oder mehrere spezifische Human Cytokine Capture Beads. Diese antikörpergebundenen Capture Beads binden an spezifische Zytokine und besitzen eine einheitliche Fluoreszenzfärbung in spezifischer Intensität. Hierzu wurden 10 µl der spezifischen Capture Beads pro zu messender Einheit in ein Röhrchen pipettiert. Nach einer guten Durchmischung mit dem Vortexer wurde von der Capture Bead-Mischung je 50 µl in alle zu messenden Röhrchen pipettiert. Es erfolgte eine Zugabe von 50 µl der bereits vorbereiteten Standardverdünnungen pro Röhrchen. Des Weiteren wurden 50 µl des zu messenden Wells und 50 µl des BD Detektionsreagenz hinzugefügt. Das BD Detektionsreagenz beinhaltet einen weiteren Fluorchrom-markierten Antikörper, der in direkter Relation zur Zytokinkonzentration an Zytokine bindet. Es erfolgt eine gute Durchmischung durch den Vortexer und eine dreistündige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Röhrchen mit je 1 ml BD Wash Buffer zentrifugiert (200 G, 5 Minuten, Raumtemperatur). Das Pellet wurde in je 300 µl BD Wash Buffer aufgenommen und vorsichtig durchgemischt. Die Messung der Proben konnte daraufhin am Durchflusszytometer LSR II erfolgen. Alle eingesetzten BD™ CBA Human Cytokine Kits sind in Tabelle 6 angeführt.

2.11 Bestimmung der physiologischen Medikamentenkonzentrationen in Überständen der Zellkulturen

Die Bestimmung der physiologischen Medikamentenkonzentrationen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Roman Lang vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der TU München. Es erfolgte ein Versuchsaufbau gemäß Kapitel III.2.12 und III.2.13. Die Überstände der jeweiligen Tage wurden mithilfe der Massenspektrometrie untersucht, mit physiologischen Konzentrationen der Literatur verglichen und dementsprechende Dosierungen und Talspiegel folgender Medikamente ermittelt: Lenalidomid, Azacytidine, Decitabine, Tocilizumab und Dexamethason.

2.12 Analyse der Auswirkung von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die Expression von Oberflächenantigenen der AML-Blasten

Die Analyse wurde mit vier verschiedenen AML Zelllinien durchgeführt: Oci-AML3, Molm-13, HL60 und MV4-11 (weitere Informationen siehe Tabelle 7). Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien mit 1×10^6 Zellen pro Well in einer 24-Wellplatte in je 1 ml R10 Medium ausplattiert. Es erfolgte die Zugabe der ausgewählten Substanzen pro Well: Lenalidomid (660 nM, 1,5 μ M, 4 μ M und einer Negativkontrolle), Azacytidine (0,2 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und einer Negativkontrolle) und Decitabine (0,3 μ M, 2 μ M, 5 μ M und einer Negativkontrolle). Es erfolgte eine Inkubation von bis zu 6 Tagen und eine tägliche Zugabe der Substanzen, um eine physiologische Konzentration der Medikamente aufrechtzuerhalten (siehe Bestimmung der physiologischen Medikamentenkonzentrationen in Zellkulturmedien Kapitel III.2.11). An Tag 0, 3 und 6 erfolgten jeweils durchflusszytometrische Bestimmungen der Expression ausgewählter Oberflächenmarker: CD33, CD157 und CD123.

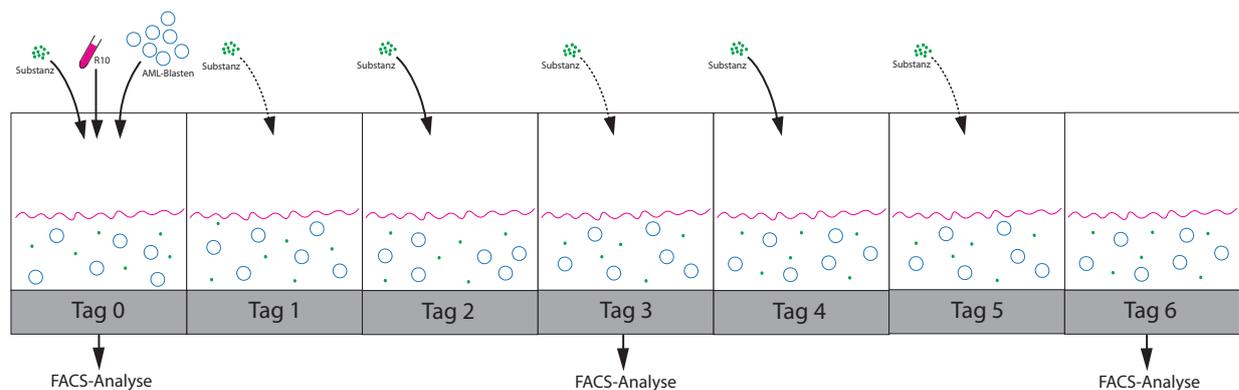


Abbildung 3: Schematische Abbildung des Versuchsaufbaus Expression von Oberflächenantigenen durch immunmodulierende und zytoreduktive Substanzen.

2.13 Analyse der Auswirkung von Dexamethason und Tocilizumab auf die Expression von Oberflächenantigenen der AML-Blasten

Die Analyse wurde ebenfalls mit vier verschiedenen AML Zelllinien durchgeführt: Oci-AML3, Molm-13, HL60 und MV4-11 (weitere Informationen siehe Tabelle 7). Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien mit 1×10^6 Zellen pro Well in einer 24-Wellplatte in je 1 ml R10 Medium ausplattiert. Es erfolgte die Zugabe der ausgewählten Substanzen pro Well: Tocilizumab (743 nM und einer Negativkontrolle) und Dexamethason (75 ng/ml und Negativkontrolle). Es erfolgte eine Inkubation von bis zu 6 Tagen und eine Zugabe von Dexamethason an jedem zweiten Tag, um eine physiologische Konzentration des Medikaments aufrechtzuerhalten (siehe Bestimmung der physiologischen Medikamentenkonzentrationen in Zellkulturmedien Kapitel III.2.11). An Tag 0, 3 und 6 erfolgten jeweils durchflusszytometrische Bestimmung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker: CD33, CD157 und CD123.

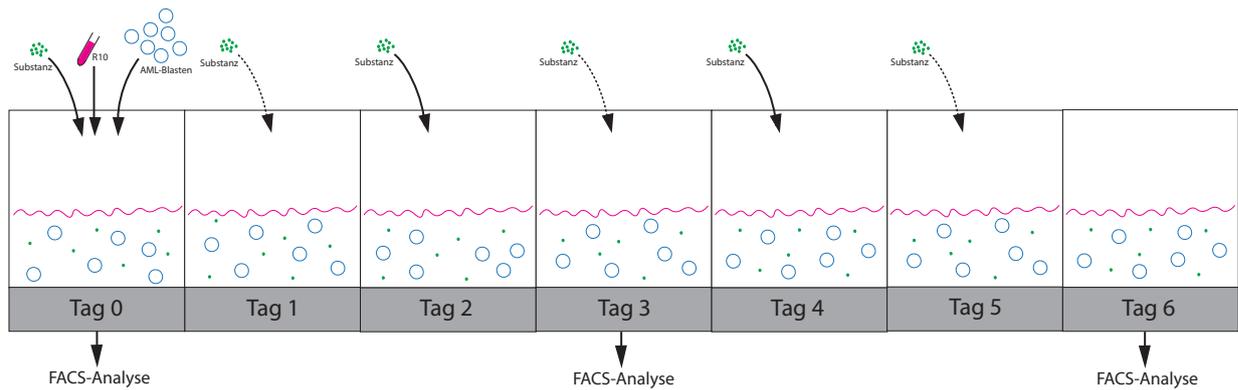


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus Expression von Oberflächenantigenen durch Dexamehason oder Tocilizumab

2.14 Analyse der Auswirkung von zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen auf die Zytotoxizität der T-Zellen unter Anwendung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330

Die Analyse wurde mit isolierten T-Zellen aus Vollblut von gesunden Spendern begonnen. Die T-Zellen wurden gemäß Kapitel III.2.6 isoliert. Es erfolgte eine Aufnahme in R10 Medium und T-Zellen wurden zu je 2×10^6 Zellen pro Well einer 24-Wellplatte verteilt. Danach wurden folgende Substanzen hinzugegeben: Lenalidomid (660 nM, 1,5 μ M, 4 μ M und einer Negativkontrolle), Azacytidine (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und einer Negativkontrolle) und Decitabine (0,2 μ M, 2 μ M, 5 μ M und einer Negativkontrolle). Die T-Zellen wurden für 72 h inkubiert. Nach 72 h wurden die T-Zellen gemäß Kapitel III.2.8 gefärbt. Es erfolgte eine Zählung der Zelllinie HL-60 und Ausplattierung der T-Zellen und HL-60 Zellen in einem Verhältnis mit 1:1, 1:3 oder 1:4 in 2 Wells einer 24 Wellplatte je Konzentration. In den Wells mit der Negativkontrolle erfolgte die Zugabe der Negativkontrolle und in den anderen die Zugabe des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 zu 5 ng/ml. An Tag 0 und 3 erfolgten jeweils die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker: CD2, als Marker auf T-Zellen, und CD33, als Marker auf den AML-Blasten.

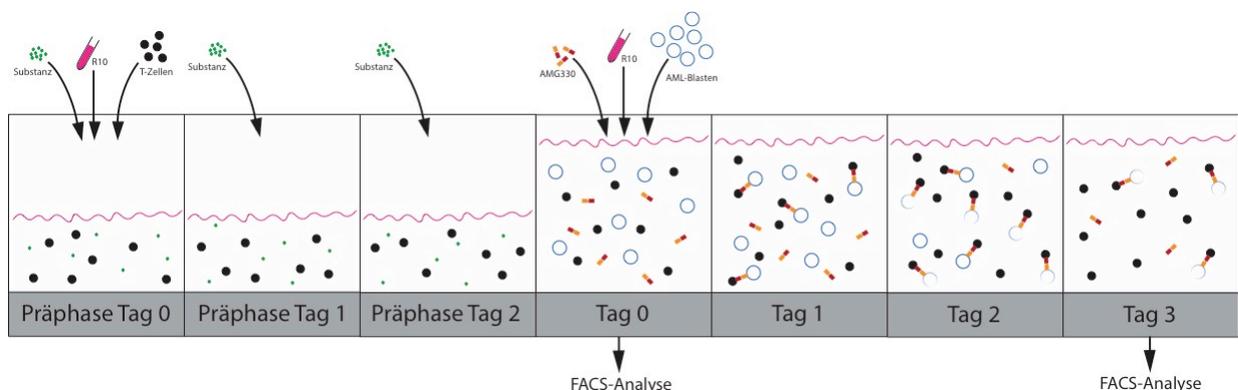


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus Charakterisierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 unter Einfluss von zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen.

2.15 Analyse der Auswirkung von Dexamethason und Tocilizumab auf die Zytotoxizität der T-Zellen in Patientenproben unter Anwendung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330

Die Analyse wurde mit der Herstellung des MS5-Nährbodens gemäß Kapitel III.2.5 begonnen. Es erfolgte eine Aufnahme einer geeigneten Patientenprobe zu $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 24-Wellplatte verteilt. Danach wurden folgende Substanzen hinzugegeben: Tocilizumab (743 nM und eine Negativkontrolle) und Dexamethason (75 ng/ml und Negativkontrolle). Für den Erhalt der jeweiligen Dosierungen siehe Kapitel III.2.11. In den Kontroll-Wells erfolgte die Zugabe der Negativkontrolle und in den anderen die Zugabe des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 zu 5 ng/ml. An Tag 0, Tag 3 und Tag 6 erfolgten jeweils durchflusszytometrische Bestimmung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker: CD2 und CD33.

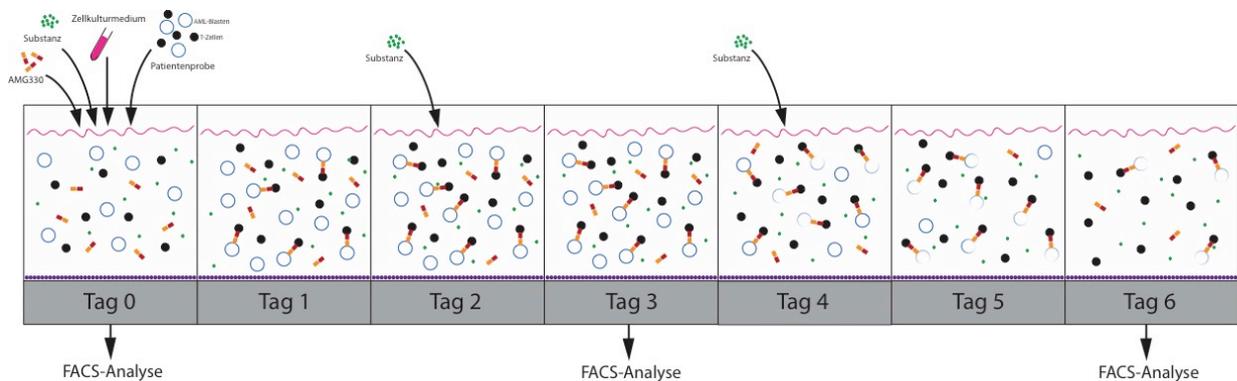


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Charakterisierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 unter Einfluss von Dexamethason oder Tocilizumab.

2.16 Ausblick: Vergleich des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 mit halbwegszeitverlängernden Konstrukten hinsichtlich T-Zellaktivierung und Zytotoxizität

Die Analyse wurde mit der Herstellung des MS5-Nährbodens gemäß Kapitel III.2.5 begonnen. Es erfolgte eine Aufnahme einer geeigneten Patientenprobe zu $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in einer 24-Wellplatte verteilt. Danach wurden folgende Substanzen hinzugegeben: In den Wells mit der Negativkontrolle erfolgte die Zugabe der jeweiligen Negativkontrolle in äquivalenter Dosierung und in den anderen die Zugabe des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 zu 5 ng/ml sowie des HLE-BiTE® Crossbody und des HLE-BiTE® HALB. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Inkubator. An Tag 0, Tag 3, Tag 6, Tag 9 und Tag 14 erfolgten jeweils durchflusszytometrische Bestimmung der Expression ausgewählter Oberflächenmarker: CD2, CD33 und CD29.

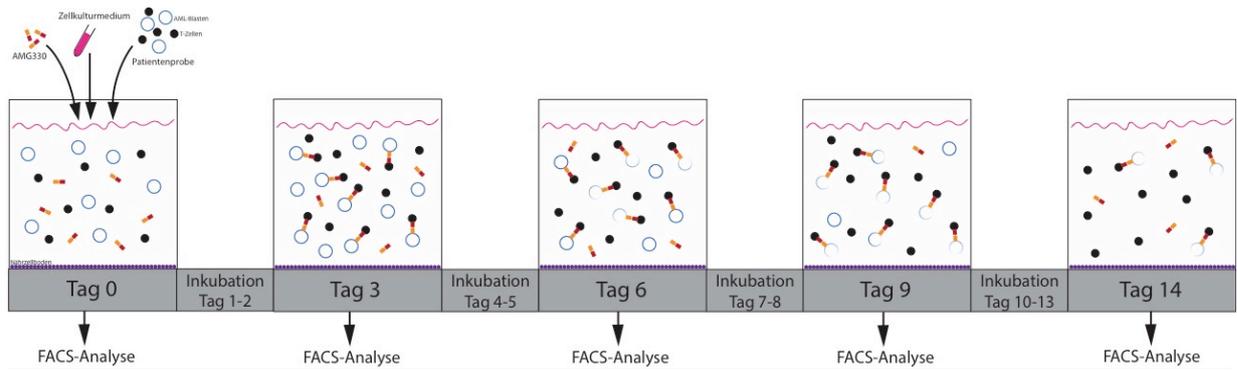


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus, Charakterisierung des AMG 330 und seiner halbwegszeitverlängerten Konstrukten.

2.17 Durchflusszytometrische Auswertung

Die durchflusszytometrische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms FlowJo® Version 8.6. Zuerst erfolgte das Gating im FSC/SSC-View. Hierzu konnte sowohl T-Zellen als auch AML-Blasten durch Festlegung eines Gates nach Größe und Granularität ausgewählt werden. Folgend wurden mithilfe der 7-AAD-Färbung die viablen von den toten Zellen unterschieden. Die weitere Auswertung erfolgte lediglich mit den als viabel gewerteten Zellen. Hierzu wurde zur Messung der ausgewählten Oberflächenmarker eine Hintergrundaktivität mithilfe der Isotypkontrolle ausgeschlossen. Dieses Gate wurde auf die gefärbte Probe angewendet.

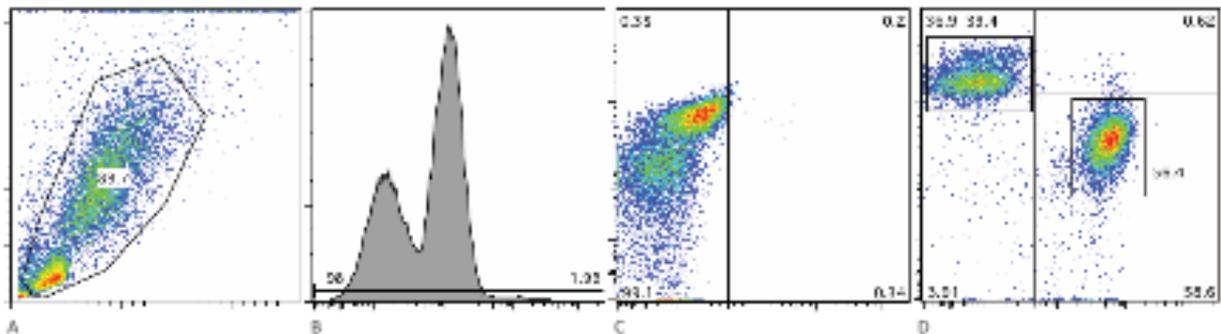


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Auswertung am Beispiel zur Bestimmung der T-Zellen und der CD33+ AML-Blasten. **Bild A:** X-Achse: FSC; Y-Achse: SSC. **Bild B:** MFI der 7-AAD Färbung; **Bild C:** Isotypkontrolle; X-Achse: CD33+; Y-Achse: CD2+. **Bild D:** Gefärbte Probe; X-Achse CD33+; Y-Achse: CD2+

Die CFSE Färbung wurde durch Gating auf die CD2+ T-Zell-Population gemessen. Mithilfe der Isotypkontrolle wurde das Referenzgate festgelegt, dass auf Probe angelegt wurde. So konnte kontrolliert werden, dass die CD2+ Population mehrere Generationen beinhaltet.

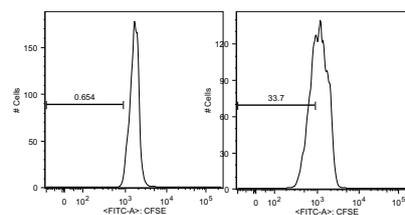


Abbildung 9: Histogramm der CFSE-Färbung der CD2+ T-Zellen

2.18 Statistische Auswertung

Eine Beurteilung der Ergebnisse anhand statistischer Untersuchungsmethoden erfolgte in dieser Doktorarbeit nicht. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen sind die vorhandenen statistischen Verfahren nicht geeignet dazu valide Aussagen über die Signifikanz der Ergebnisse zu treffen.

Lediglich zur quantitativen Auswertung des Einflusses der Konzentrationen unterschiedlicher Medikamente wurden die Konzentrationswerte in metrischer Skalierung dargestellt. Mittels Regressionsanalyse kann man den konzentrationsabhängigen Einfluss anhand der jeweiligen Steigungen der einzelnen Regressionsgeraden quantifizieren. Die Steigungen für die einzelnen Teilgruppen wurden auf Gleichheit getestet. So konnte ich die Signifikanz der dosisabhängigen Wirkung darstellen. Diese Berechnungen wurden in Prism® durchgeführt.

IV Ergebnisse

1 Einfluss von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte *in vitro* T-Zellaktivierung und die T-Zellvermittelte Zytotoxizität mit Spender-T-Zellen und AML-Blasten von Zelllinien

1.1 Vergleich der *in vitro* T-Zellaktivierung durch den CD/CD33 BiTE® AMG 330 nach Vorbehandlung der T-Zellen mit Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine

Nach einer Vorbehandlung von Spender-T-Zellen mit Lenalidomid zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der Aktivierung der T-Zellen (s. Abb. 11). Zudem gibt es keine Korrelation der eingesetzten Lenalidomid-Konzentration und Proliferation der T-Zellen (s. Abb. 11). Lediglich unter Beachtung des eingesetzten Effektor-Zielzell-Verhältnisses (E/T ratio; englisch: effector to target ratio) kann bei einem Verhältnis von 1:3 die Tendenz zur verstärkten Aktivierung der T-Zellen gesehen werden, die jedoch keine statische Signifikanz in der linearen Regressionsanalyse aufweist (s. Abb 10, Abb. 19 und Tabelle 10). Im Gegensatz hierzu zeigen sich sowohl unter Einfluss von Azacytidine (s. Abb. 12) als auch von Decitabine (s. Abb 13) eine signifikante dosisabhängige Reduktion der T-Zellaktivierung (s. Abb. 19 und Tabelle 11).

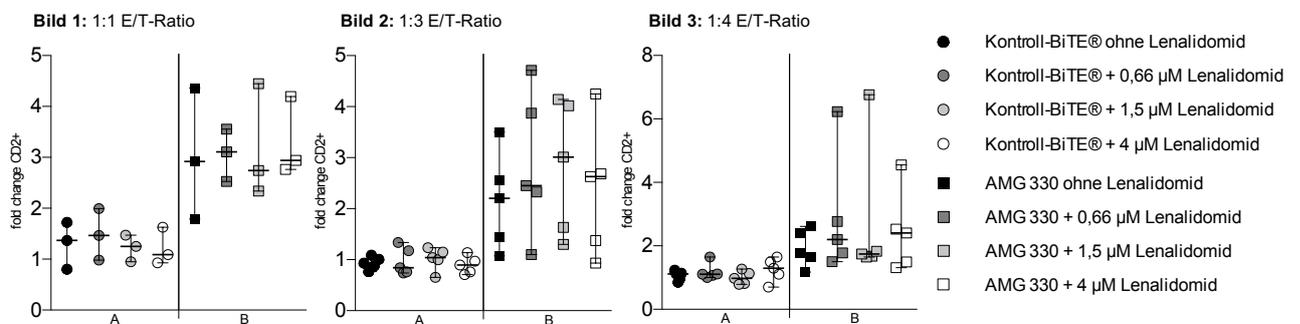


Abbildung 10: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5.

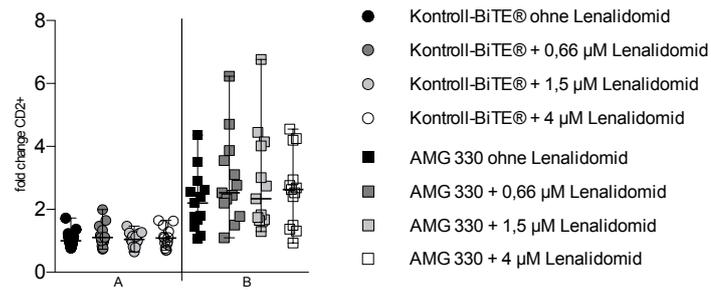


Abbildung 11: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=13

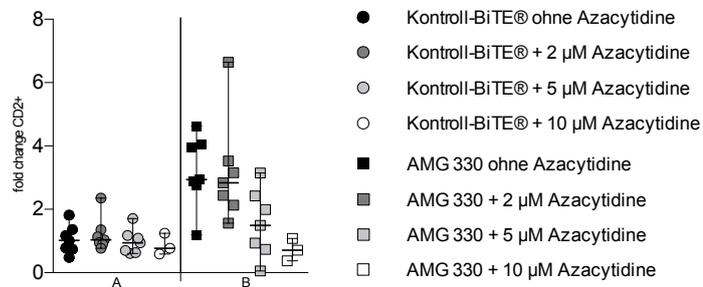


Abbildung 12: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Azacytidine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=3-7.

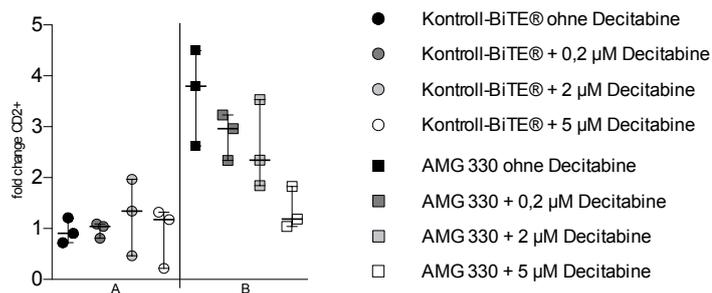


Abbildung 13: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Decitabine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=3

1.2 Vergleich der *in vitro* T-Zellvermittelten Zytotoxizität des CD3/CD33 BiTE® AMG 300 Einfluss von Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine

Nach einer Vorbehandlung mit Lenalidomid zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (s. Abb. 14). Zudem gibt es keine Korrelation der eingesetzten Lenalidomid-Konzentrationen und der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (s. Abb. 14). Auch unter Beachtung der eingesetzten E/T ratios konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (s. Abb 17, Abb 18, Abb. 20 und Tabelle 11).

Im Gegensatz hierzu zeigt sich sowohl unter Einfluss von Azacytidine (s. Abb. 15) als auch von Decitabine (s. Abb 16) dosisabhängig eine Reduktion der T-Zellvermittelten Zytotoxizität (s. Abb. 20 und Tabelle 11).

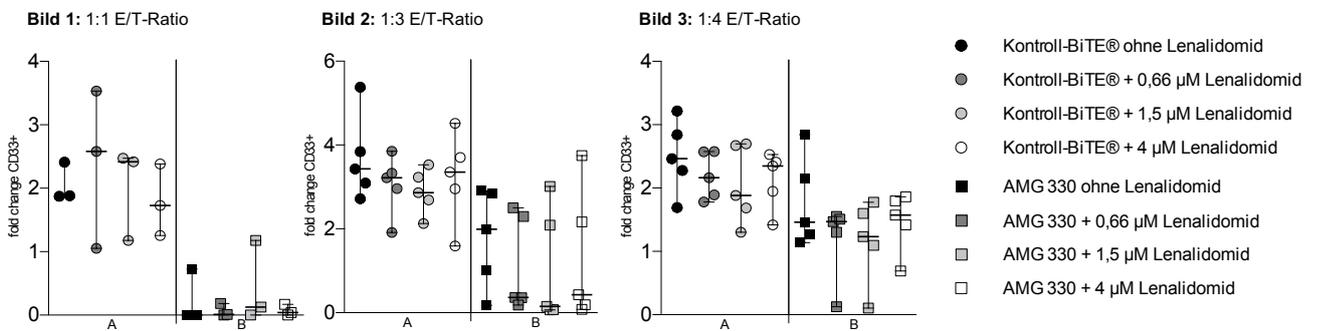


Abbildung 14: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 300 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD33+ fold change der AML-Blasten. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5.

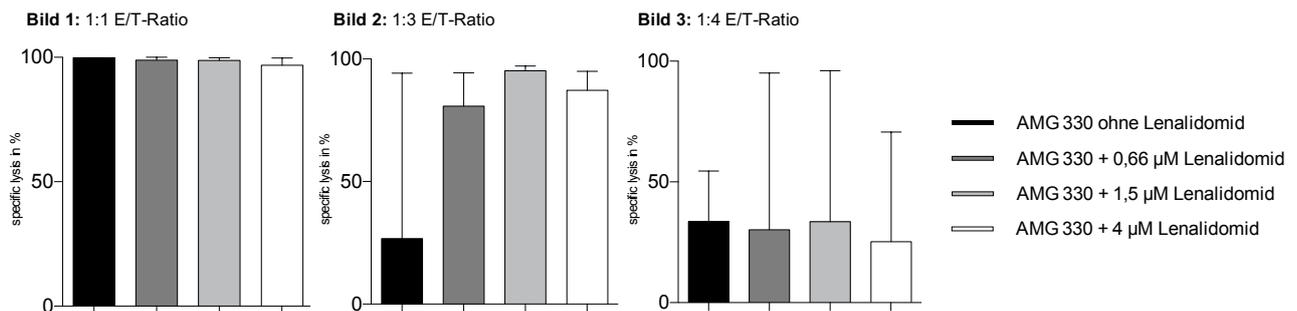


Abbildung 15: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 300 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in Prozent. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5.

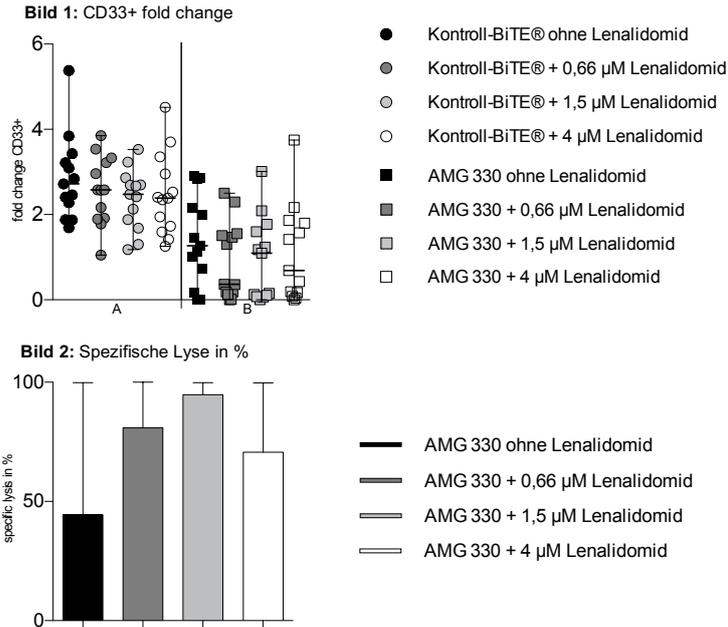


Abbildung 16: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=13.

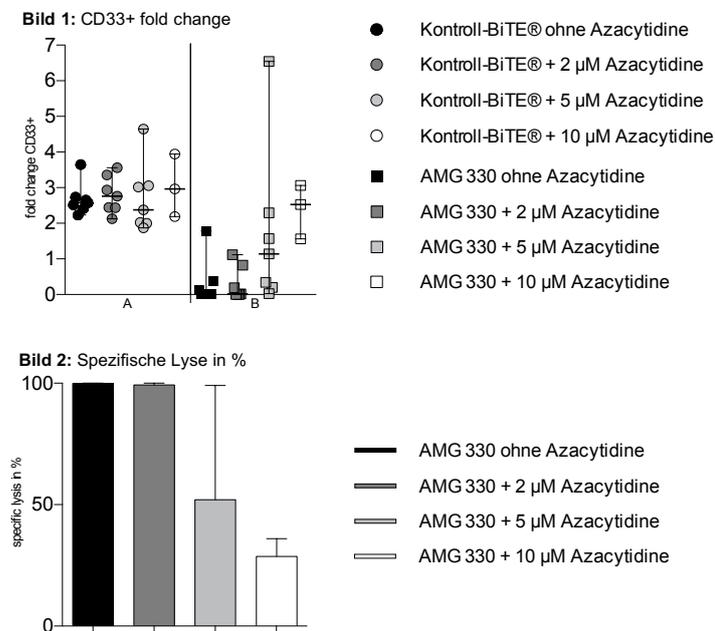


Abbildung 17: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Azacytidine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=3-7.

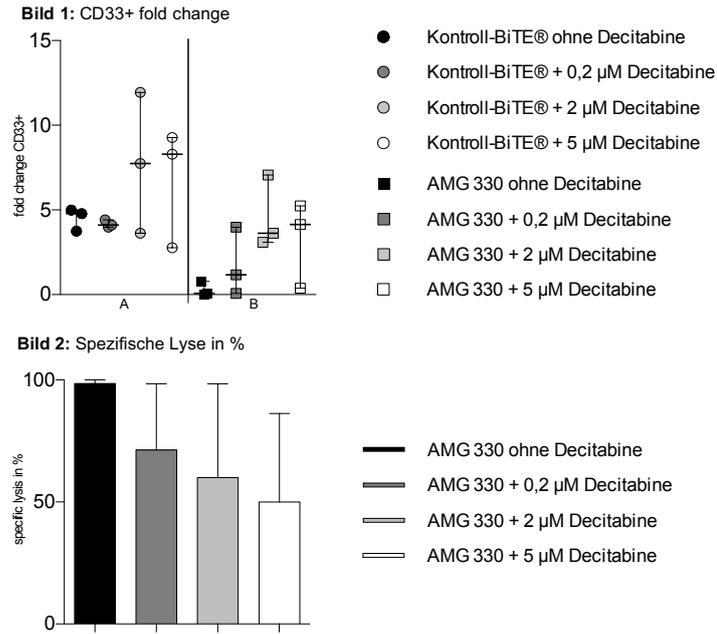


Abbildung 18: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Decitabine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-Antikörper (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=3.

1.3 Statistische Auswertung

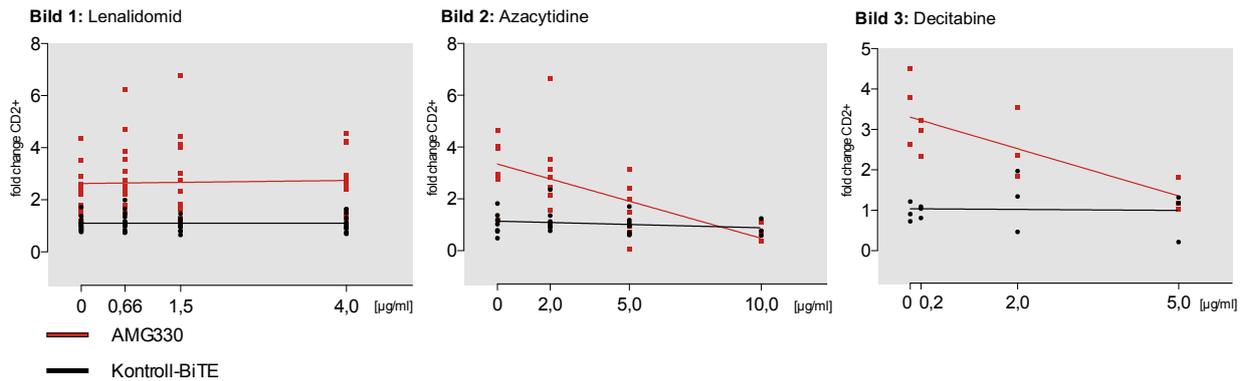


Abbildung 19: Metrische Darstellung der Messwerte unter linearer Regressionsanalyse. Bild 1: Lenalidomid, n=13; Bild 2: Azacytidine, n=7; Bild 3: Decitabine, n=3. X-Achse: Konzentration der einzelnen Substanzen in µM. Y-Achse: Fold change der CD2+ T-Zellen.

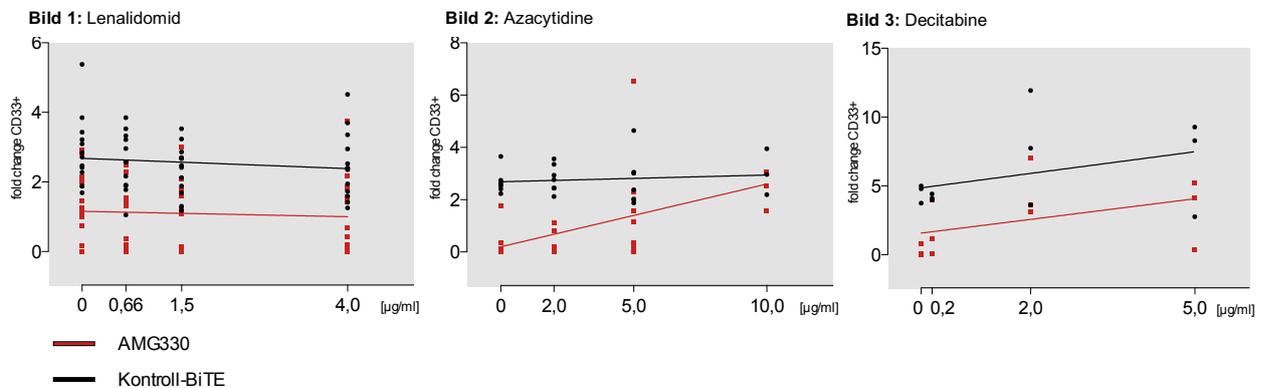


Abbildung 20: Metrische Darstellung der Messwerte unter linearer Regressionsanalyse. Bild 1: Lenalidomid, n=13; Bild 2: Azacytidine, n=7; Bild 3: Decitabine, n=3. X-Achse: Konzentration der einzelnen Substanzen in µM. Y-Achse: Fold change der CD33+ AML-Blasten.

Tabelle 11: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse.

| Substanz | Fold change CD2+ | | Fold change CD33+ | |
|--------------------|--|--|--|---|
| | Kontroll-BiTE® | BiTE® AMG 330 | Kontroll-BiTE® | BiTE® AMG 330 |
| Lenalidomid | 0,9939, not significant Equation $Y = -0,0002074 * X + 1,101$ | 0,8096, not significant Equation $Y = 0,02874 * X + 2,628$ | 0,3565, not significant Equation $Y = -0,07373 * X + 2,680$ | 0,6773, not significant Equation $Y = -0,03883 * X + 1,158$ |
| | 0,8125, not significant P-value, intercepts <0,0001, extremely significant | | 0,7754, not significant P-value, intercepts <0,0001, extremely significant | |
| Azacytidine | 0,3752, not significant Equation $Y = -0,02550 * X + 1,140$ | 0,0016, significant Equation $Y = -0,2867 * X + 3,346$ | 0,5628, not significant Equation $Y = 0,02578 * X + 2,687$ | 0,0094, significant Equation $Y = 0,2402 * X + 0,1979$ |
| | 0,0034, very significant P-value, intercepts | | 0,0292, significant P-value, intercepts | |
| Decitabine | 0,9088, not significant Equation $Y = -0,008208 * X + 1,038$ | 0,0030, significant Equation $Y = -0,3899 * X + 3,304$ | 0,2109, not significant Equation $Y = 0,5246 * X + 4,862$ | 0,1522, not significant Equation $Y = 0,4991 * X + 1,571$ |
| | 0,0051, very significant P-value, intercepts | | 0,9604, not significant 0,003, very significant P-value, intercepts | |

2 Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason auf die CD3/CD33 BiTE® AMG 330 induzierte T-Zellaktivierung und die T-Zellvermittelte Zytotoxizität in Patientenproben *ex vivo*

2.1 Vergleich der T-Zell-Aktivierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter *ex vivo* Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason

Nach einer *in vitro* Behandlung der Patientenproben mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und Tocilizumab zeigt sich eine vergleichbare Aktivierung der T-Zellen (s. Abb. 21 und 22). Nach einer *in vitro* Behandlung der Patientenproben mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und Dexamethason zeigt sich eine deutliche Reduktion der Aktivierung der T-Zellen (s. Abb. 21 und 22). Diese Reduktion zeigt sich zudem an allen gemessenen Zeitpunkten. (s. Abb. 22).

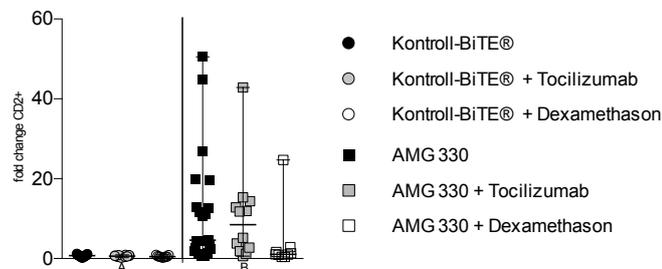


Abbildung 21: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=9-21.

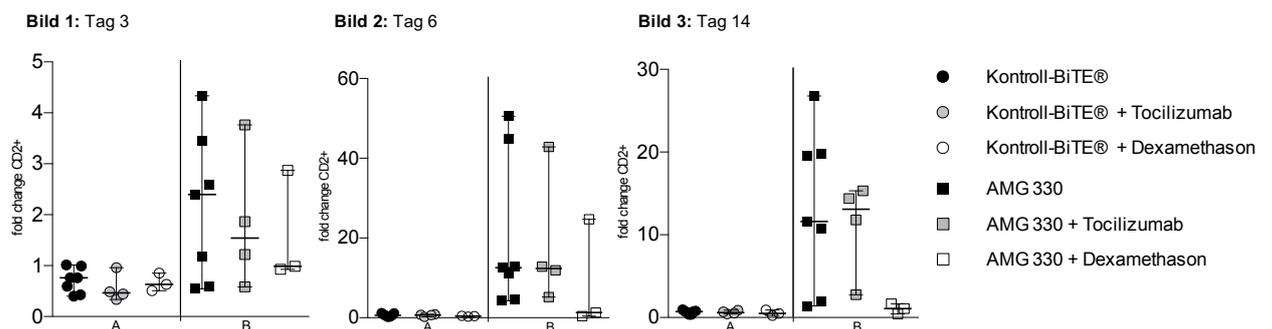


Abbildung 22: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach 6 Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7

2.2 Vergleich der T-Zellvermittelten Zytotoxizität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter *ex vivo* Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason

Während einer Behandlung von Patientenproben mit Tocilizumab zeigt sich in meinen Ergebnissen kein eindeutiger Unterschied in der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (s. Abb. 23-26). Lediglich wenn man die unterschiedlichen CD33+ Populationen, wie in Abb. 23 und 24 gezeigt, ansieht, zeigt sich die Tendenz, dass die AML Blasten bei der mit Dexamethason behandelnden Gruppe weniger reduziert werden, dies zeigt sich aber bezogen auf die Absolutzahlen in der Spezifischen Lyse (s. Abb. 25 und 26) nicht.

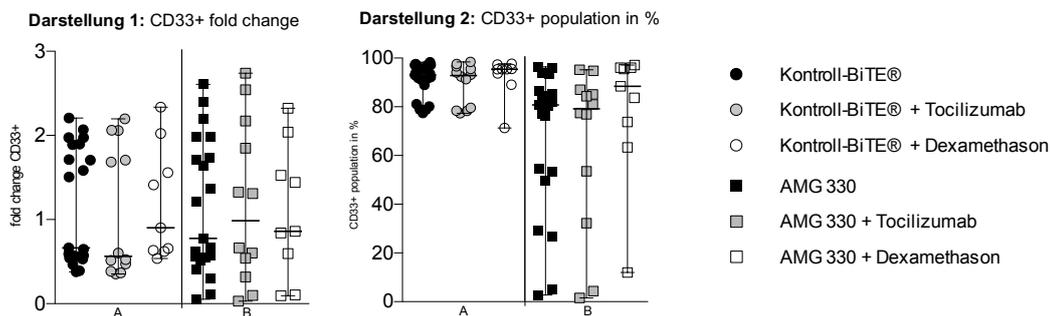


Abbildung 23: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse; Darstellung 1: fold change der CD33+ AML Blasten Y-Achse; Darstellung 2: Population der CD33+ AML-Blasten in %. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. N=9-21.

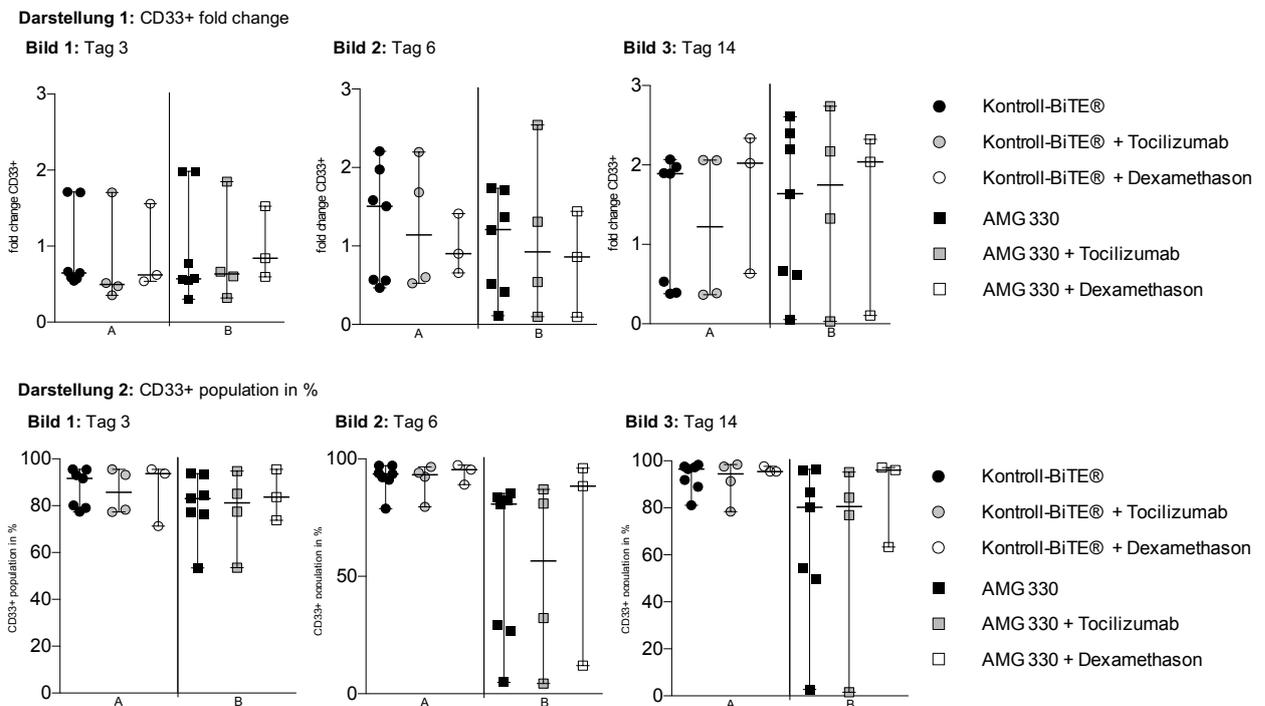


Abbildung 24: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse; Darstellung 1: fold change der CD33+ AML Blasten Y-Achse; Darstellung 2: Population der CD33+ AML-Blasten in %. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach sechs Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7

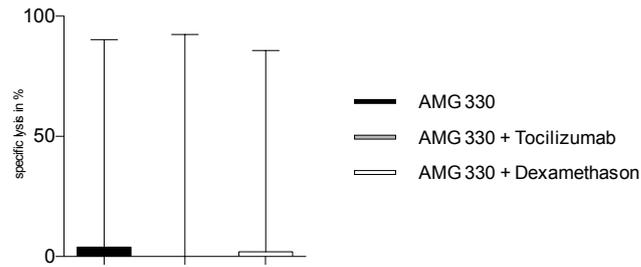


Abbildung 25: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: spezifische Lyse der CD33+ AML Blasten in Prozent. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=9-21.

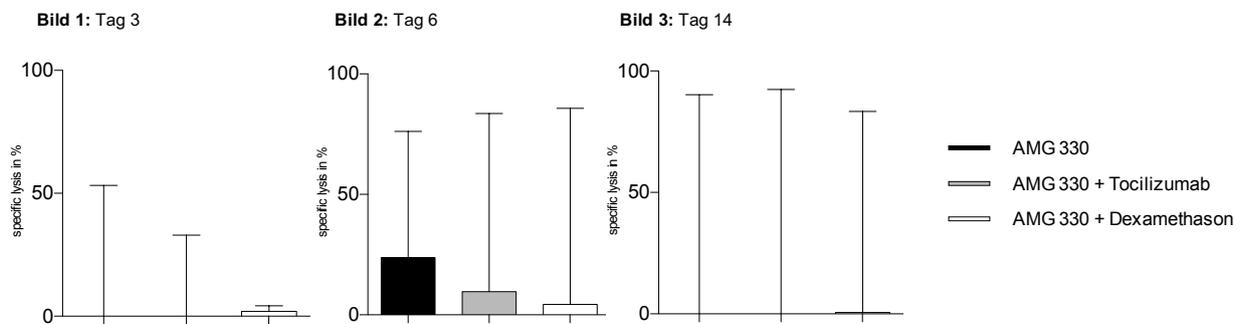


Abbildung 26: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in Prozent. Darstellung mit Median. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach sechs Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7

2.3 Vergleich der Zytokinsekretion des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben unter *ex vivo* Einfluss von Tocilizumab und Dexamethason

Während einer Behandlung von Patientenproben mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und Tocilizumab zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der Ausschüttung von allen gemessenen Zytokinen im Vergleich zu einer Patientenprobe ohne Vorbehandlung (s. Abb. 27). Auch in der Behandlung von Patientenproblem mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und Dexamethason zeigt sich für IL-4, IL-2 und IL-10 kein deutlicher Unterschied. (s. Abb. 27) Im Gegensatz hierzu zeigt sich bei den Zytokinen IFN- γ , TNF- α und IL-6 eine Reduktion der Ausschüttung unter Behandlung mit Dexamethason (s. Abb. 27).

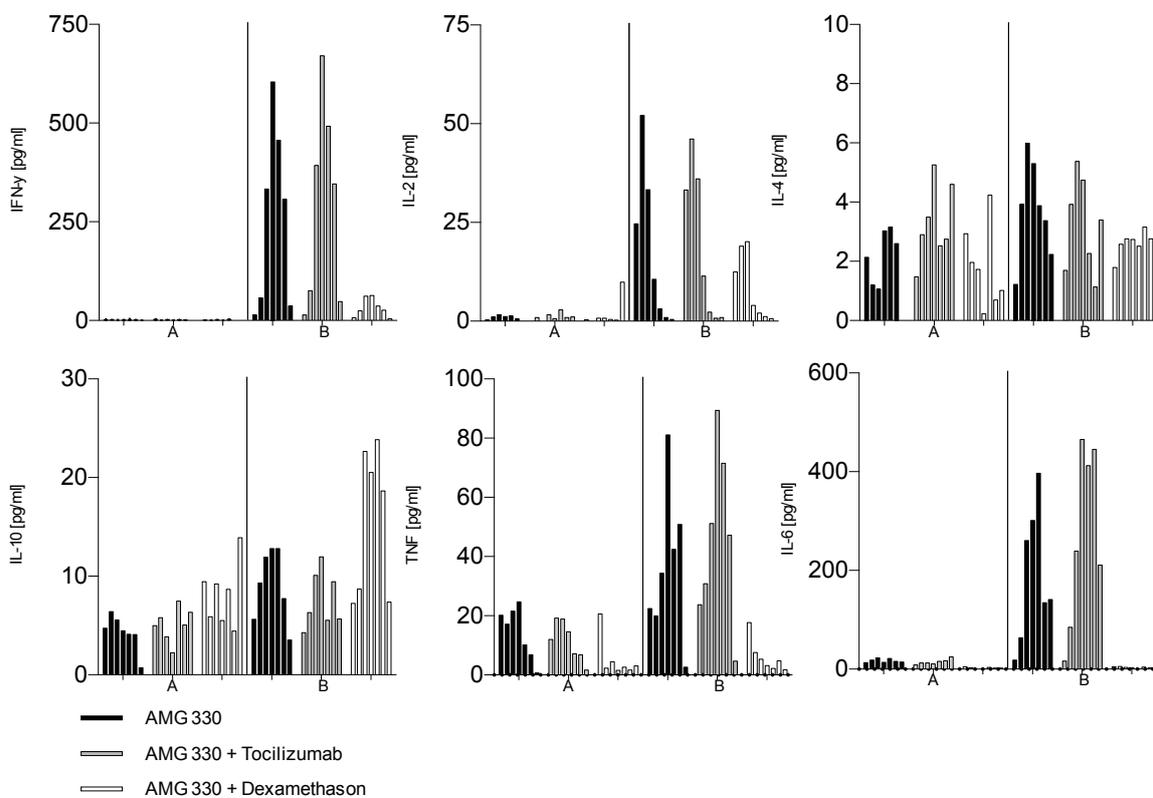


Abbildung 27: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Sekretion von Zytokinen an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Symbolleiste, gruppiert in Ergebnissen der Messtage 1-6 und 14. Y-Achse: Konzentration der Zytokine in pg/ml. Darstellung mit Median. n=1-4

3 Veränderungen der Oberflächenexpression unter Vorbehandlung von AML-Zelllinien mit immunmodulierenden Substanzen *in vitro*

3.1 Vergleich der Oberflächenexpression von CD157 auf AML-Zelllinien unter *in vitro* Einfluss mit immunmodulierenden Substanzen

Wenn man die Zelllinien gesamt betrachtet, lässt sich bei Vorbehandlung mit immunmodulierenden Substanzen keine eindeutige Änderung der Expression des Oberflächenmarkers CD157 erkennen (s. Abb. 28). Lediglich wenn man die Zelllinien individuell betrachtet, lässt sich grafisch ein Unterschied erkennen: Lenalidomid bewirkt gleich wie Acacytidine, Tocilizumab und Decitabine keine Hoch- oder Runterregulation der Expression von CD157. Im Gegenteil, Azacytidine zeigt in zwei der vier Zelllinien und Lenalidomid in einer der vier Zelllinien sogar eine leichte, jedoch konsistente Hochregulation. Lediglich bei Dexamethason zeigt sich in zwei Zelllinien eine deutliche Runterregulation von <25% (s. Abb. 28).

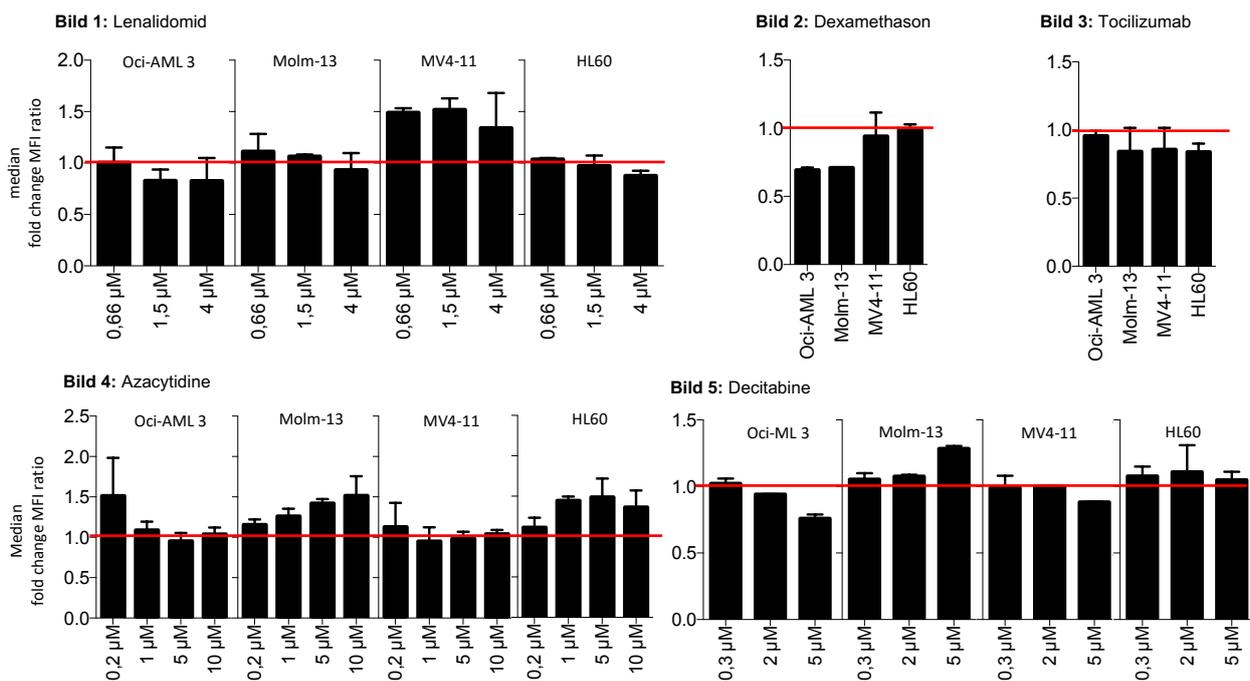


Abbildung 28: Einfluss von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD157 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3

3.2 Vergleich der Oberflächenexpression von CD33 auf AML-Zelllinien unter *in vitro* Einfluss von immunmodulierenden Substanzen

Wenn man die Zelllinien gesamt betrachtet, lässt sich bei Vorbehandlung mit immunmodulierenden Substanzen keine deutliche Änderung der Expression des Oberflächenmarkers CD33 erkennen (s. Abb. 29). Lediglich wenn man die Zelllinien individuell betrachtet, lässt sich grafisch eine Änderung erkennen. Unter Lenalidomid und Tocilizumab kam es weder zu einer Hoch- noch Runterregulation der Expression von CD33. Allerdings kann man bei Azacytidine und Dexamethason in zwei der vier und bei Decitabine in einer der vier verwendeten Zelllinien eine angedeutete Runterregulation der Expression erkennen (s. Abb. 29).

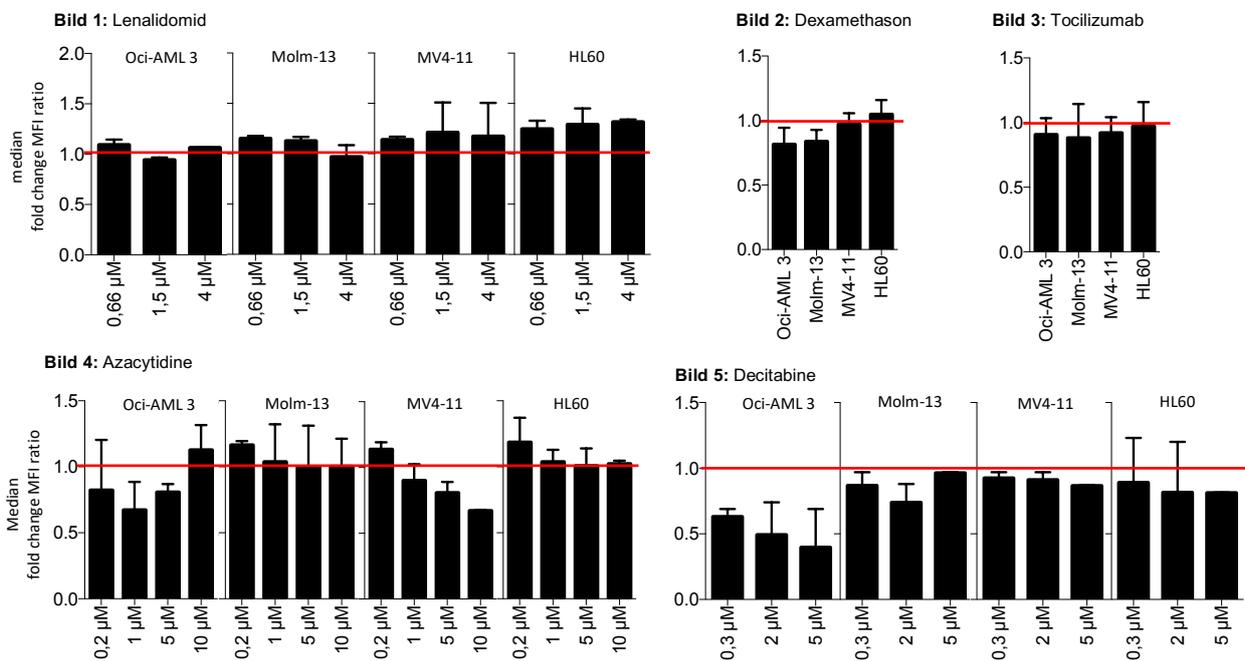


Abbildung 29: Einfluss von immunmodulierenden Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD33 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3

3.3 Vergleich der Oberflächenexpression von CD123 auf AML-Zelllinien unter *in vitro* Einfluss von immunmodulierenden Substanzen

Wenn man die Zelllinien gesamt betrachtet, lässt sich bei Vorbehandlung mit immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen eine deutliche Runterregulation der Expression des Oberflächenmarkers CD123 unter Therapie mit Lenalidomid in einer der Zelllinien, mit Azacytidine oder Decitabine in drei Zelllinien als auch mit Tocilizumab in zwei Zelllinien erkennen.

Generell lässt sich bei diesen Versuchen erkennen, dass die zytoreduktiven Substanzen Azacytidine und Decitabine eher den Effekt haben die Oberflächenmarkerexpression zu reduzieren, im Gegensatz zu den immunmodulierenden Substanzen, Lenalidomid, Dexamthason und Tocilizumab.

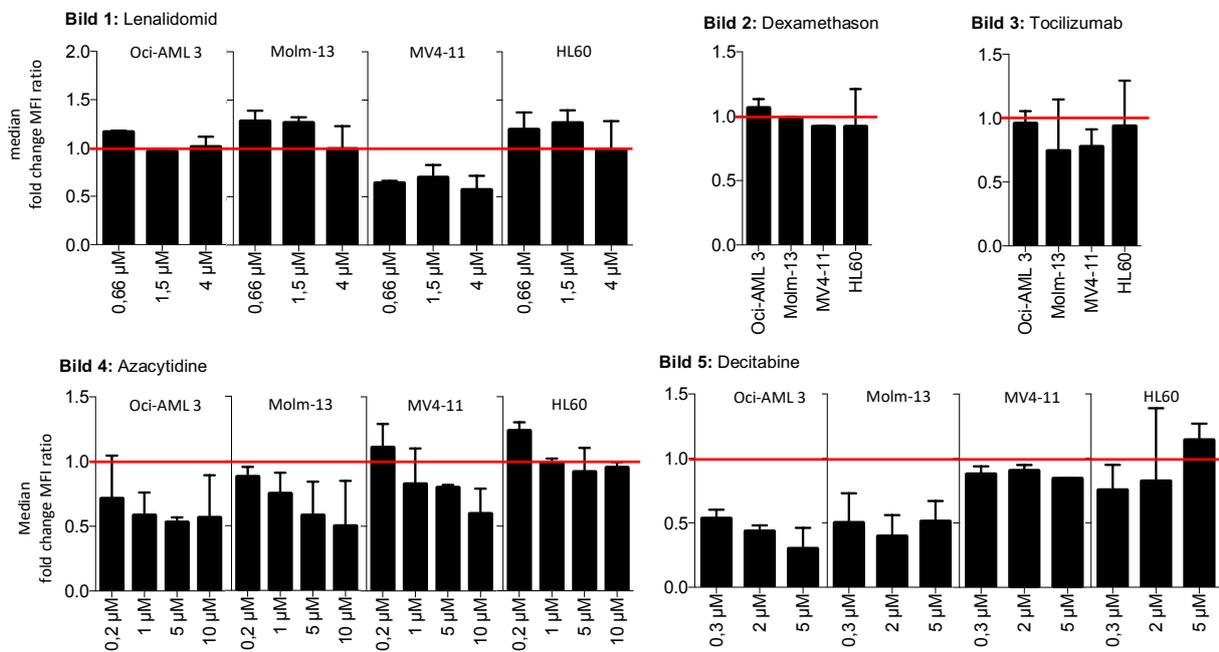


Abbildung 30: Einfluss von immunmodulierenden Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD123 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3

4 Ausblick: Auswirkung von halbwertszeitverlängernden Konstrukten auf die von CD3/CD33 BiTE® AMG 330 vermittelte *ex vivo* T-Zellaktivierung und Zytotoxizität in Patientenproben

4.1 Vergleich der *ex vivo* T-Zell-Aktivierung mit CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB

Bei der *in vitro* Behandlung von Patientenproben mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und den halbwertszeitverlängerten Konstrukten zeigt sich eine vergleichbare Aktivierung der T-Zellen (s. Abb. 31).

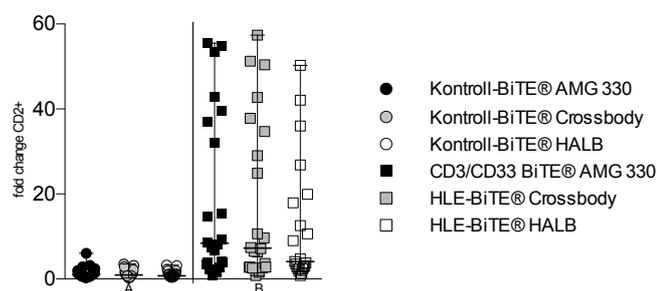


Abbildung 31: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB(B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=7

4.2 Vergleich der *ex vivo* T-Zell-vermittelten Zytotoxizität mit CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB

Bei der Behandlung von Patientenproben mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB zeigt sich in der gesamten Betrachtung eine vergleichbare Reduktion der CD33+ AML-Blasten (s. Abb. 32-34). Bei der Betrachtung der einzelnen Messtage zeigt sich jedoch ein Trend, bei dem die zytotoxische Wirkung des HLE-BiTE® HALB etwas geringer als der CD3/CD33 BiTE® AMG 330 allein und des HLE-BiTE® Crossbody scheint.

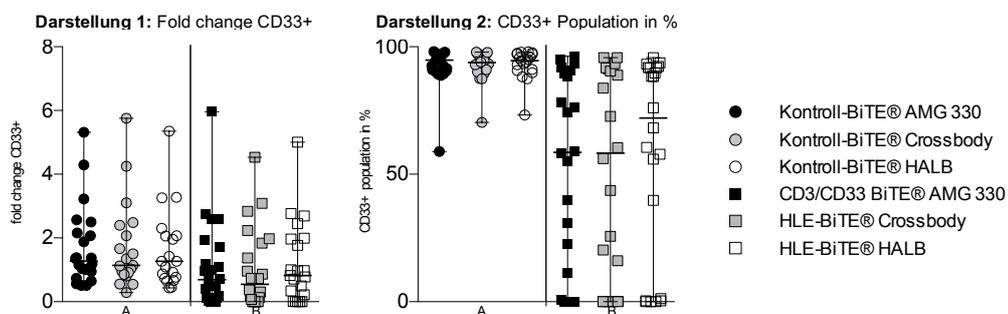


Abbildung 32: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD33+ AML-Blasten. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an vier Messzeitpunkten: Tag 3, 6, 9 und 14. n=7

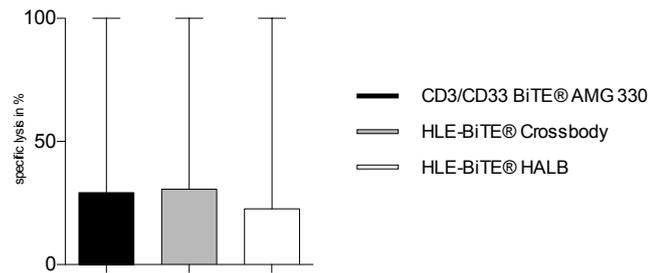


Abbildung 33: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=7

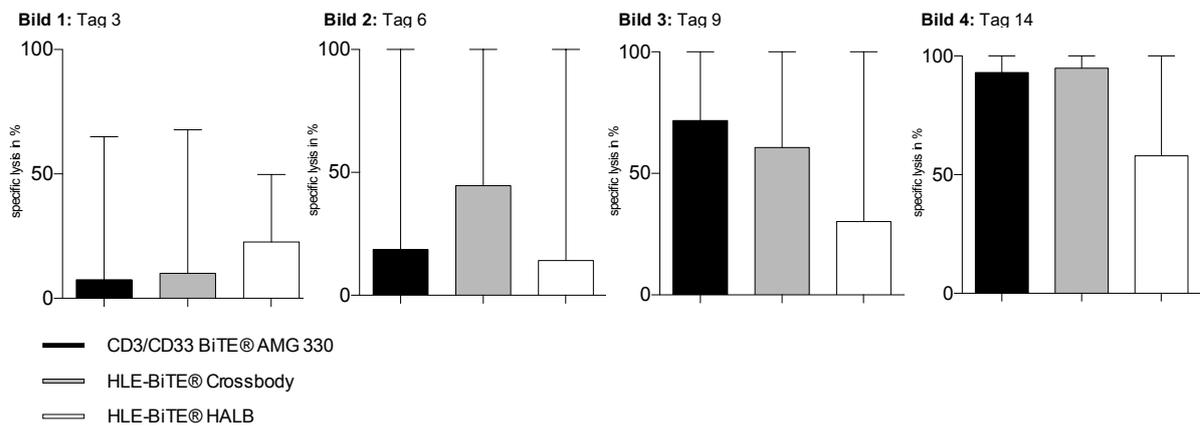


Abbildung 34: Einfluss von Patientenproben unter *in vitro*-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median und Range. Bild 1 -4 zeigen die jeweiligen Messwerte von Tag 3, 6, 9 und 14. n=7

V Diskussion

1 Einfluss von Substanzen auf Target – ein Überblick über mögliche Therapiekombinationen

Im Rahmen der Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen wird vermehrt auf mögliche Kombinationstherapien zur verbesserten Effektivität gesetzt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und deren Wirkung auf die *in vitro* Proliferation von T-Zellen und der *in vitro* T-Zell-vermittelten Lyse von CD33+ AML-Blasten untersucht. Ziel der Kombinationen ist eine prognostisch günstige Ausgangslage für die antikörperbasierte Immuntherapie zu kreieren.

Zum einen kann man vordefinierte Medikamente einsetzen, die die Expression des Oberflächenmarkers der Zelle erhöhen, um mehr Bindungsmöglichkeiten für den einzusetzenden Antikörper zu schaffen. Im Gegensatz dazu sollten Medikamente vermieden werden, die die Expression dieses Oberflächenmarkers vermindern. In dieser Doktorarbeit wurde die mögliche *in vitro* Hoch- und Niederregulation der Oberflächenmarkern CD33, CD157 und CD123 durch die Medikamente Lenalidomid, Azacytidine, Decitabine, Dexamethason und Tocilizumab untersucht. CD33 dient als Zielantigen für den CD3/CD33 BiTE®. Gegen die Oberflächenmoleküle CD157 und CD123 sind bereits Antikörper in präklinischer oder klinischer Erprobung. [45, 54-55, 60-61, 63-65, 203]

Eine andere Möglichkeit die Ausgangslage für die antikörperbasierte Immuntherapie zu verbessern, wäre das Schaffen eines günstigeren Verhältnisses von Effektor- zu Zielzellen. Krupka et al, konnten bereits zeigen, dass ein niedriges Verhältnis zu einer verbesserten Effektivität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 bezüglich T-Zell-vermittelter Lyse der CD33+ AML-Blasten führt. [149]

Ein prognostisch günstigeres E/T ratio kann auf zwei möglichen Arten erreicht werden: zum einen über die Reduktion der Zielzell-Last mithilfe zytoreduktiver Medikamente, zum anderen über die Erhöhung der Anzahl bzw. Aktivierung der Effektorzellen mithilfe immunmodulierender bzw. -stimulierender Medikamente.

Als Substanzen wurden in Rahmen dieser Doktorarbeit folgende, im klinischen Alltag häufig angewendeten Chemotherapeutika ausgewählt: Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine. Lenalidomid soll als immunmodulierendes Medikament einerseits eine direkte Antitumoraktivität (nachgewiesen in der Therapie des Multiplen Myeloms und des Follikulären Lymphoms) und zum anderen einen positiven Effekt auf die Aktivierung, Reifung

und Aktivität von T-Zellen haben. Beide Effekte sollen zu einem besseren Effektor-Ziellzellen-Verhältnis führen. Azacytidine und Decitabine sollen als zytoreduktive Substanzen sollen über eine direkte Antitumoraktivität das E/T ratio positiv beeinflussen. [175-176, 204]

In Arbeitsgruppe von Frau Prof. Subklewe wurden zuvor schon folgende zytoreduktiven Chemotherapeutika untersucht: Hydroxyurea und Cytarabine. Hydroxurea zeigte dosisunabhängig eine stabile Reduktion der CD33+ Zellen bei gleichbleibender Aktivierung der T-Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigte Cytarabine ebenfalls eine dosisunabhängige Reduktion der CD2+ T-Zell-Aktivierung, jedoch einer verminderten Lyse der CD33+ AML-Blasten. [143]

1.1 Lenalidomid

Einreihend in diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Lenalidomid, ähnlich wie Hydroxyurea, bei *in vitro* behandelten T-Zellen dosisunabhängig zu keiner Einschränkung der Aktivierung der T-Zellen führt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mit Lenalidomid vorbehandelte T-Zellen, die *in vitro* gemessene T-Zell-vermittelte Lyse von CD33+ AML Blasten nicht einschränkt.

Xie et al. haben durch ein systematisches Review verschiedene Studien zusammengefasst, die bestätigen, dass Lenalidomid eine klinische Aktivität in AML-Patienten hat, wodurch sich der klinische Einsatz des Medikaments bei AML-Patienten rechtfertigt. [144]

Die Wirkung von Lenalidomid auf T-Zellen wurde ebenfalls bereits mehrfach untersucht: Krämer et al. konnten zeigen, dass Lenalidomid im Einsatz bei Multiplem Myelom eine deutlich höhere T-Zell-Antwort induziert als bei einer Kontrollgruppe. Dies wurde durch die Immuntypisierung der T-Zellen bestätigt, in dem gezeigt wurde, dass die CD45RA und CD57 Expression in der Lenalidomid-Gruppe vermindert war. Dies spricht für eine Reifung von unreifen zu funktionsfähigen T-Zellen. [145]

Ebenso zeigten Wang et al., dass Lenalidomid die Funktion von CAR-T-Zellen im Einsatz bei soliden Tumoren, wie Glioblastom oder HER2-positivem Brustkrebs, erhöht. Im Einsatz einer Glioblastom-Zelllinie wurde *in vitro* gezeigt, dass die Lyse der Zielzellen, die Zytokinsekretion und die Proliferation der CD133+ CAR-T-Zellen durch den Einsatz von Lenalidomid gesteigert wurde. Im Beispiel mit der Brustkrebs-Zelllinie wurde lediglich für die Lyse und Zytokinsekretion eine signifikante Erhöhung unter Therapie mit Lenalidomid beobachtet. [146]

Gribben et al. beschrieben, dass Lenalidomid synergistische Effekte im Einsatz mit Rituximab, Dexamethason, Bortezomib und B-Zell-Rezeptor-Inhibitoren hat und neben dem stimulierenden Effekt auf T-Zellen auch auf B-Zellen, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen wirkt. [147]

Augsburger et al. konnte den positiven Effekt von Lenalidomid im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen mit einem neuen T-Zell bispezifischen Antikörper gegen WT1 (Wilms Tumorprotein 1) nachweisen. Die T-Zell induzierte Zytotoxizität durch den WT1-TCB gegen AML-Blasten zeigte sich unter Einsatz von Lenalidomid erhöht. [205]

Diese Resultate können in meinen Ergebnissen nicht reproduziert werden. Gründe hierfür können sein, dass andere Marker gemessen werden müssen oder eine längere Inkubationszeit mit Lenalidomid vorliegen muss, um den T-Zell stimulierenden Effekt zu sehen.

Ebenso zeigte sich in meinen Ergebnissen nach einer Inkubation von 72h von AML-Zelllinien mit Lenalidomid keine signifikante Hoch- oder Runterregulation der Expression von CD33. Lediglich auf den Zelllinien MV4-11 und HL60 konnte, dosisunabhängig, eine erhöhte Expression von CD33 beobachtet werden. Allerdings lag diese bei <25% und ist aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht eindeutig validierbar.

Für die Behandlung der AML werden zurzeit unterschiedliche Antikörperkonstrukte gegen weitere Zielstrukturen, wie CD157 und CD123, untersucht. Um auch hier das Potential einer möglichen Kombinationstherapie zu prüfen, wurde der Einfluss einer *in vitro* Vorbehandlung der Zelllinien mit Lenalidomid auf die Expression dieser weiteren Antigene untersucht:

CD157 zeigte in drei von vier untersuchten Zelllinien keine veränderte Expression unter *in vitro* Vorbehandlung mit Lenalidomid. In der AML-Zelllinie MV4-11 allerdings zeigte sich eine eindeutige Hochregulation um circa 50%. Ob dieser Effekt allerdings von dem genetischen Profil der Zelllinie abhängig ist, muss in einer größer angelegten Untersuchung bestätigt werden. Bisher gibt es hierzu noch keine zu vergleichenden Publikationen.

CD123 zeigte ebenfalls in drei von vier untersuchten Zelllinien keine deutliche Veränderung bzw. sogar eine Tendenz zur Hochregulation der Expression unter der Vorbehandlung mit Lenalidomid. In der AML-Zelllinie MV4-11 zeigte sich allerdings eine Niederregulation. Auch hier muss der Effekt in Abhängigkeit des genetischen Profils bestätigt werden. Bisher gibt es hierzu noch keine zu vergleichenden Publikationen.

1.2 Azacytidine

Im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen bei Lenalidomid führte Azacytidine bei *in vitro* vorbehandelten T-Zellen dosisabhängig sowohl zu einer Einschränkung der Aktivität der T-Zellen als auch zu einer reduzierten T-Zell-vermittelten Lyse von CD33+ AML Blasten unter dem Einsatz des CD3/CD33 BiTE® AMG 330.

Für Azacytidine zeigte sich leider in der Literatur kein eindeutiges Bild, ob und inwiefern das zytoreduktive Medikament auf die T-Zellen wirkt. Zum einen werden positive Berichte im Rahmen des Einsatzes bei hämatologischen Erkrankungen diskutiert, aber genauso gibt es

einige Beschreibungen, in denen Azacytidine – wie auch in dieser Arbeit gezeigt – inhibitorische Effekte auf die T-Zell-Aktivität haben.

Stübig et al. zeigten, dass Azacytidine in einem *in vivo* und *in vitro* Modell hämatologischer Erkrankungen in einer Reduktion der Expression von CD8+ T-Zellen, Sekretion von IFN- γ und Expression von T-Helferzellen-1, aber in einer Erhöhung der CD4+ T-Zellen und T_{reg}-Zellen resultiert. Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Reduktion der zytotoxischen Aktivität. Stübig et al. resultiert hieraus eine starke Inhibition der tumorspezifischen T-Zell-Immunität. [150]

Gang et al. zeigen, dass Azacytidine zu einer erhöhten Sensitivität von Tumorzellen gegenüber T-Zellen führte und zu keiner Reduktion von CD8+ oder CD4+ T-Zellen. [151]

Woher diese unterschiedlichen Resultate kommen, lässt sich auch nach eingehender Studie der Veröffentlichungen nicht eindeutig sagen. Eine Überlegung wäre, dass Azacytidine in niedriger Dosierung einen stimulierenden Effekt auf T-Zellen und in hohen Dosierungen einen reduzierenden Effekt auf die T-Zell-Anzahl haben kann.

In dieser Arbeit konnte keine signifikante Hoch- oder Runterregulation der Expression von CD33 auf der Oberfläche der AML-Blasten in zwei der vier benutzten Zelllinien (Molm-13, HL-60) nach Inkubation für 72 Stunden von Spender-T-Zellen mit Azacytidine. In den AML-Zelllinien Oci-AML3 und MV4-11 zeigte sich jedoch eine dosisabhängige Reduktion der CD33-Expression.

Zudem habe ich auch hier die Expression von zwei weiteren möglichen Targets unter *in vitro* Vorbehandlung mit Azacytidine untersucht:

Auch bei Azacytidine, zeigte sich analog zu Lenalidomid, nur ein geringfügiger bis kein Einfluss auf die Expression von CD157 auf den verwendeten AML-Zelllinien. Auf die Expression von CD123 konnte hingegen, mit Ausnahme der Zelllinie HL60, eine dosisabhängige Reduktion der Expression unter der Vorbehandlung mit Azacytidine beobachtet werden.

In diesem Zusammenhang kann darauf geschlossen werden, dass Azacytidine als Chemotherapeutikum im Rahmen einer Vorbehandlung oder in Kombination mit dem CD3/CD33+ BiTE® AMG 330 nicht ohne weitere Überprüfung zum Einsatz kommen kann, da *in vitro* mehrfach gezeigt wurde, dass sowohl die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung als auch die T-Zell-vermittelte Immunität gegen die Zielzelle deutlich reduziert wurde. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, benötigt es jedoch weiterführender Untersuchungen mit größeren Fallzahlen.

Auch das Target CD123 zeigte Hinweise auf eine beeinträchtigende dosisabhängige Niederregulation unter Behandlung mit Azacytidine. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen in meiner Dissertation lässt sich dazu aber keine abschließende Schlussfolgerung ziehen. Den

Einsatz von CD123-Antikörpern in Kombination mit Azacytidine sollte mittels höheren Fallzahlen noch tiefergehend untersucht werden.

Lediglich CD157 zeigte keinen Hinweis auf eine beeinträchtigende Runterregulation unter *in vitro* Behandlung mit Azacytidine, sondern zeigte sogar Tendenzen, dass der Oberflächenmarker hochreguliert wird. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse kann der Einsatz von Azacytidine in Kombination mit einem CD157-Antikörper diskutiert werden.

1.3 Decitabine

Decitabine führte bei *in vitro* behandelten T-Zellen dosisabhängig zu einer Einschränkung der Aktivierung der T-Zellen. In der kategorischen Darstellung lässt sich eine dosisabhängige Reduktion der T-Zell-vermittelten Lyse der CD33+ AML-Blasten abzeichnen, die sich allerdings in der metrischen Darstellung mittels linearer Regressionsanalyse als nicht signifikant herausstellt.

Für Decitabine zeigt sich ähnlich wie bei Azacytidine in der Literatur leider kein eindeutiges Bild, ob und inwiefern das zytoreduktive Medikament auf die T-Zellen wirkt. Zum einen werden positive Berichte im Rahmen des Einsatzes in hämatologischen Erkrankungen diskutiert, aber genauso gibt es einige Beschreibungen in denen Decitabine – wie auch in dieser Arbeit gezeigt – inhibitorische Effekte auf die T-Zell-Aktivität haben. [153-162, 206]

Wang et al. zeigten im Rahmen der Untersuchung des Einsatzes von Decitabine bei der Behandlung von Multipler Sklerose, dass die T-Zell-Proliferation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch hochdosiertes Decitabine inhibiert wird. Als Grund wird die Expression von TET2 genannt, einer DNA-Dioxygenase, welche die Expression von verschiedener Zellzyklus-Inhibitoren reguliert. [162]

Niu et al. zeigten den inhibierenden Effekt von Decitabine auf eine Subgruppe von T-Zellen, welche T-Zell-Rezeptoren bestehend aus γ - und σ -Ketten exprimiert. [153]

Kopp et al. zeigten den negativen Effekt von Decitabine auf die Natürlichen Killerzellen resultierend in geringerer Viabilität und Funktion. Dies sei allerdings erst bei höheren Dosierungen aufgetreten. [160]

Kehrmann et al. beschreiben, dass Decitabine die Reifung von T_{reg}-Zellen fördert und somit in einer erhöhten Expression von IL10 und reduzierten Proliferation der T-Zellen resultiert. [161]

Ähnliche Ergebnisse wie bei Kehrmann et al. sind in dieser Arbeit nicht abgebildet aber auch diese zeigen, dass Decitabine einen negativen Einfluss haben kann. Im Rahmen der Therapie mit Blinatumomab wurde bereits durch Duell et al. der negative Effekt von T_{reg}-Zellen auf die Therapieeffektivität gezeigt. [206]

Im Gegensatz hierzu wurde durch einige Studien gezeigt, dass Decitabine über die vermehrte Expression von Proteinen, die für die Immunantwort wichtige Rollen spielen (death receptor FAS, MHC-I), die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Immunantworten erhöht. [154-159]

Auch You et al. konnten darstellen, dass Decitabine den Effekt von Anti-CD123-CAR-T-Zellen *in vitro* und *in vivo* verstärkte. [164]

Woher diese Diskrepanz in den Ergebnissen führt, lässt sich auch durch eingehende Literaturrecherche nicht genau beschreiben. Eine Überlegung wäre, dass Decitabine in niedriger Dosierung einen stimulierenden Effekt auf T-Zellen und in hohen Dosierungen einen reduzierenden Effekt auf die T-Zell-Anzahl haben kann.

In weiterer Folge zeigte sich auch keine signifikante Hoch- oder Runterregulation der Expression von CD33 auf der Oberfläche der AML-Blasten in drei der vier benutzten Zelllinien (Molm-13, MV4-11, HL-60). In der AML-Zelllinie Oci-AML3 zeigte sich jedoch eine leichte Tendenz zur Reduktion der CD33-Expression. Es gibt bisher keine vergleichbare Publikation, die die Expression von CD33 unter Therapie mit Decitabine darstellt.

CD157 zeigte ebenfalls keine veränderte Expression unter *in vitro* Vorbehandlung mit Decitabine. Bisher gibt es hierzu noch keine zu vergleichenden Publikationen. Im Gegensatz hierzu zeigte CD123 in zwei von vier untersuchten Zelllinien eine dosisabhängige Reduktion der Expression unter der *in vitro* Vorbehandlung mit Decitabine. In der AML-Zelllinie MV4-11 und HL-60 zeigte sich keine Niederregulation.

In diesem Zusammenhang lassen meine Ergebnisse der *in vitro* Experimente darauf schließen, dass Decitabine als Chemotherapeutikum im Rahmen einer Vorbehandlung oder in Kombination mit dem CD3/CD33+ BiTE® AMG 330 nicht ohne weitere Überprüfung zum Einsatz kommen kann, da *in vitro* mehrfach gezeigt wurde, dass sowohl die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung als auch die T-Zell-basierte Zytotoxizität gegen die Zielzelle deutlich reduziert werden kann. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, würde ich jedoch die weiterführende Untersuchung mittels größerer Fallzahlen empfehlen.

Auch das Target CD123 zeigte Hinweis auf eine beeinträchtigende dosisabhängige Niederregulation unter Behandlung mit Decitabine. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen in meiner Dissertation lässt sich dazu aber keine abschließende Schlussfolgerung ziehen. Den Einsatz von CD123-Antikörpern in Kombination mit Decitabine sollte noch tiefergehend untersucht werden.

Lediglich CD157 zeigen keinen Hinweis auf eine beeinträchtigende Runterregulation unter Behandlung mit Decitabine.

1.4 Dexamethason und Tocilizumab

Dexamethason und Tocilizumab werden im Rahmen der antikörperbasierten Immuntherapie zum Management des CRS-Syndroms eingesetzt. Im nächsten Kapitel habe ich die Wirkung von Dexamethason und Tocilizumab auf die *in vitro* Effektivität des CD3/CD33 BiTE® untersucht. In diesem Abschnitt möchte ich lediglich auf den Einfluss von Dexamethason und Tocilizumab auf die Expression der Oberflächenmarker CD33, CD123 und CD157 eingehen. Die immunmodulierende Wirkung wird in einem späteren Zusammenhang mit CRS diskutiert.

Nach Inkubation mit Dexamethason zeigte sich keine signifikante Hoch- oder Niederregulation der Expression von CD33 auf der Oberfläche der AML-Blasten in zwei der vier benutzten Zelllinien (MV4-11, HL-60). Eine leichte Niederregulation konnte in den Zelllinien Oci-AML3 und Molm-13 beobachtet werden. Diese Niederregulation kann allerdings durch die niedrige Fallzahl nicht eindeutig objektiviert werden. Hierzu gibt es keine vergleichbare Publikation.

CD157 zeigte nach Behandlung mit Dexamethason ebenfalls wie CD33 keine signifikante Hoch- oder Niederregulation der Expression auf der Oberfläche der AML-Blasten in zwei der vier benutzten Zelllinien (MV4-11, HL-60). Eine leichte Niederregulation konnte jedoch auch in den Zelllinien, Oci-AML3 und Molm-13 beobachtet werden. Diese Niederregulation kann allerdings durch die niedrige Fallzahl nicht eindeutig objektiviert werden. Bisher gibt es hierzu noch keine zu vergleichenden Publikationen.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich in meinen Ergebnissen nach Inkubation mit Dexamethason kein Hinweis auf eine Hoch- oder Niederregulation von CD123. Bisher gibt es hierzu noch keine zu vergleichenden Publikationen. Bisher wurde lediglich durch Duperrier et al. gezeigt, dass durch mit Dexamethason vorbehandelte Dendritische Zellen die Expression von CD123 angeregt wird. [165]

Bei Tocilizumab zeigte sich in allen Zelllinien keine signifikante Hoch- oder Niederregulation weder in der Expression von CD33, CD157 oder CD123 auf der Oberfläche der AML-Blasten. Die angedeutete Niederregulation von CD123 in den Zelllinien Molm-13 und MV4-11 lässt sich vermutlich als Artefakt aufgrund der niedrigen Fallzahl erklären. In keinem der Fälle gibt es vergleichbare bereits veröffentlichte Publikationen.

In diesem Zusammenhang lassen meine Ergebnisse der *in vitro* Experimente darauf schließen, dass sowohl Dexamethason als auch Tocilizumab im Einsatz im Rahmen einer Therapie mit dem CD3/CD33+ BiTE® AMG 330 oder Antikörper, die gegen CD123 oder CD157 gerichtet sind, keine Auswirkung auf das Expressionsprofil der Targets der Zielzelle hat. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, würde ich jedoch die weiterführende Untersuchung mittels größerer Fallzahlen empfehlen.

2 Management des CRS und die Auswirkung auf die antikörperbasierte Immuntherapie

Tocilizumab, ein Anti-IL6-Rezeptor-Antikörper, zeigte *ex vivo* in Patientenproben keinen Hinweis auf die Beeinflussung der Effektivität des CD3/CD33 BiTE®. In Co-Kultur Experimenten über sechs Tage zeigten sich sowohl bei der Aktivierung der T-Zellen als auch bei der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen CD33+ AML-Blasten, keine Unterschiede im Vergleich zur Verwendung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 ohne Tocilizumab.

Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zytokinausschüttung von IFN- γ , TNF- α , IL10, IL2, IL4 und IL6. Die angedeutete Erhöhung von freiem IL6 resultiert daraus, dass Tocilizumab an den IL6-Rezeptor bindet und somit die Bindung von IL6 an diesen verhindert. Die freie IL6 Konzentration steigt also unter Therapie mit Tocilizumab im Gegensatz zu gebundenem und somit effektivem IL6. [166]

Da Tocilizumab beeindruckende Ergebnisse sowohl im Rahmen des ursprünglichen Einsatzes bei Rheumatoider Arthritis als auch im Rahmen der Therapie mit CRS zeigte, wird der Einsatz von Tocilizumab im Rahmen von SIRS, MAS oder Lymphohistiozytose diskutiert. [167]

Im Gegensatz hierzu zeigte Dexamethason *in vitro* eine deutliche Reduktion der Effektivität von CD3/CD33 BiTE® AMG 330 in Patientenproben im Vergleich zur alleinigen Gabe des bispezifischen Antikörpers. Die beeinträchtigende Wirkung zeigte sich vor allem in der deutlich verminderten Aktivierung der T-Zellen.

Sowohl IFN- γ , TNF- α , IL2 und IL6 zeigten eine deutlich geringere Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelnden Kontrolle und der Vergleichsgruppe unter Einsatz von Tocilizumab. Lediglich IL4 zeigte eine vergleichbare Ausschüttung. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Expression von IL10 sogar leicht erhöht. Rodrigues de Almeida et al. zeigte bereits im Rahmen der Therapie bei Systemischer Sklerose, dass Dexamethason die Produktion von IL2, IL4, IL6, IL10, IL17a, TNF- α und IFN- γ von sowohl erkrankten als auch gesunden PBMCs beeinträchtigt. [168]

Chen et al. zeigten hierzu bereits, dass der Einsatz von Tocilizumab bei eingetretenem CRS im Rahmen einer CAR-T-Zell-Therapie zu empfehlen ist. Bei Patienten, die unter Therapie mit Tocilizumab weiterhin unter CRS litten, wurde niedrigdosiertes Dexamethason unterstützend angewendet. [169]

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit denen von Kauer et al., welche *in vitro* im Bezug auf ALL und Prostatakrebs ähnliche Resultate beobachteten. Kauer et al. sprechen sich gegen den Einsatz von Dexamethason, jedoch für den frühen prophylaktischen Einsatz von Tocilizumab aus. Dexamethason habe die Wirkung sowohl von dem bispezifischen CD3/PSMA-Antikörper als auch von Blinatumomab, einem bispezifischen CD3/CD19 BiTE®, signifikant reduziert – im Gegensatz zu Tocilizumab. [170]

In der Zusammenschau lässt sich eine deutliche Empfehlung geben, dass die prophylaktische Gabe von Dexamethason im Rahmen der Studienprotokolle nicht bedenkenlos einzusetzen ist, da die *in vitro* Ergebnisse eine deutliche Reduktion der Effektivität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 zur Folge hatten. Im Gegensatz dazu zeigte Tocilizumab keine negative Wirkung auf den bispezifischen Antikörper bei gleicher klinischer Aktivität gegen CRS und ist Dexamethason in diesem Einsatzgebiet vorzuziehen.

3 Ausblick: Aktuelle Ansätze zur Verlängerung der Halbwertszeit bei BiTE®-Antikörperkonstrukten

Zur Verlängerung der Halbwertszeit des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 hat AMGEN zwei Konstrukte entwickelt, die die Halbwertszeit des bispezifischen Antikörperkonstrukts verlängern. Ich habe in dieser Arbeit diese Konstrukte auf ihre Funktion überprüft.

Der HLE-BiTE® Crossbody hat nach Fc-Engineering eine DART-ähnliche Struktur und zeigte *in vitro* gegen Patientenproben eine absolut vergleichbare Funktion wie der CD3/CD33 BiTE® AMG 330. Sowohl die *in vitro* Aktivierung der T-Zellen als auch die *in vitro* T-Zell-vermittelte Zytotoxizität zeigte keine Beeinträchtigung unter dem Einsatz des HLE-BiTE® Crossbody.

Auch der HLE-BiTE® HALB, ein Antikörper-Albumin-Konstrukt, zeigte im *in vitro* Experiment eine vergleichbare Aktivierung der T-Zellen und der T-Zell vermittelten Lyse der CD33+ AML-Blasten zur Kontrollgruppe. Im direkten Vergleich mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 und dem HLE-BiTE® Crossbody zeigte der HLE-BiTE® HALB jedoch eine geringere Funktionsfähigkeit.

Für ALL mit dem Target CD19 haben Lorenczewski et al. bereits ebenfalls den halbwegszeitverlängernden CD3/CD19 HLE-BiTE® getestet und kamen *in vitro* und *in vivo* zum Ergebnis, dass die Effektivität der BiTE®-Technologie nach Fc-Engineering nicht beeinträchtigt ist. [172]

Arvedson et al. haben den HLE-BiTE® Crossbody und den HLE-BiTE® HALB in einem Mausmodell *in vivo* getestet und konnten im Vergleich zum CD3/CD33 BiTE® AMG 330 eine Verlängerung der Halbwertszeit von circa 6 auf 44-167 Stunden beobachten. Zudem zeigten sie kongruent zu meinen Ergebnissen, dass der HLE-BiTE® Crossbody sowohl in der Aktivierung der T-Zellen als auch in der T-Zellvermittelten Lyse der CD33+ AML-Blasten vergleichbar zu dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 war. Auch hier konnte festgestellt werden, dass der HLE-BiTE® HALB nicht dieselbe Effektivität ergab. [173]

Die Ursache für die geringere Effektivität des HLE-BiTE® HALB lässt sich anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht überprüfen. In der Literatur wird Albumin häufig zur Konstruktion von halbwegszeitverlängernden Konstrukten beschrieben, jedoch findet sich keine direkte Überprüfung, ob die Funktionsfähigkeit des Antikörpers oder BiTE® durch die Bindung an

Albumin eingeschränkt ist. Lediglich Hopp et al. beschreibt einen mit Albumin modifizierten Diabody, der in der Effektivität der Bindung an Targets wohl nicht beeinträchtigt ist. Jedoch sei eine Reduktion der T-Zell Aktivierung sichtbar geworden. [207]

Amgen hat in diesem Zusammenhang die Technologie des HLE-BiTE® Crossbody nicht nur für AML mit dem Target CD33 sondern auch für weitere Erkrankungen adaptiert und entwickelt halbwertszeitverlängernde BiTE®-Konstrukte gegen folgende Targets: BCMA, CD19, CLDN18.2, DLL3, FLT3, MUC17 und PSMA. [171]

VI Zusammenfassung

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass eine *in vitro* Vorbehandlung von gesunden Spender-T-Zellen mit Lenalidomid dosisunabhängig keinen negativen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit und Effektivität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 hat. Weder auf die Proliferation von T-Zellen noch auf die Reduktion der CD33+ AML-Blasten. In der T-Zell vermittelten spezifischen Lyse konnte sogar ein positiver Effekt unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden.

Im Gegensatz hierzu zeigten Azacytidine und Decitabine im selben *in vitro* Versuchsaufbau einen dosisabhängigen negativen Effekt auf die Funktionalität des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 sowohl bezogen auf die Proliferation von T-Zellen als auch auf die T-Zell vermittelte Lyse der CD33+ T-Zellen.

Ebenso wurde die Oberflächenexpression von CD33, CD157 und CD123 durch den Einfluss von Lenalidomid, Azacytidine, Decitabine, Dexamethason und Tocilizumab ermittelt. Eine Reduktion in der Expression von CD33 zeigte Azacytidine, Dexamethason und Decitabine. Eine Reduktion in der Expression von CD157 konnte bei Dexamethason gezeigt werden. Eine Reduktion der Expression von CD123 konnte unter Vorbehandlung sowohl durch Azacytidine, Decitabine als auch Tocilizumab beobachtet werden. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen müssen diese Tendenzen noch weiter überprüft werden.

Im Vergleich inwiefern Dexamethason oder der IL6-Rezeptor-Antikörper, Tocilizumab, im Einsatz eines CRS die *in vitro* Effektivität der antikörperbasierten Tumorzytotoxizität beeinflussen, resultierten meine Ergebnisse eindeutig in der Empfehlung für den Einsatz von Tocilizumab. Im Vergleich lässt sich sowohl für die *in vitro* Proliferation von T-Zellen als auch in der Zytokinausschüttung zeigen, dass Tocilizumab bei gleicher klinischer Effektivität in der Therapie des CRS deutlich weniger negativen Einfluss auf die *in vitro* Funktion des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 hatte.

Zusammenfassend sollte der Einsatz von sowohl Azacytidine, Decitabine und Dexamethason im Zusammenhang mit einer antikörperbasierten Immuntherapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 genauestens abgewogen werden, da die *in vitro* vorgelegten Daten eine deutlich beeinträchtigte Wirksamkeit der Antikörpertherapie unter Einfluss der oben genannten Medikamente zeigten. Da für diese Medikamente aber klinisch erprobte und effektive Alternativen vorhanden sind, sollte in Zukunft eher auf diese zurückgegriffen werden.

Als Exkurs habe ich zudem halbwertszeitverlängernde Konstruktmodifikationen des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 auf ihre *in vitro* Effektivität getestet. Beide Konstrukte zeigten ähnliche Effektivität, wobei der HLE-BiTE® HALB bei genauerer Datenbetrachtung die Tendenz zu einer etwas geringeren Proliferation der T-Zellen als auch der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität zeigte.

VII Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt. Stand Nov. 2020. Link:
<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/286584/umfrage/zahl-der-krebstodesfaelle-nach-krebsart-weltweit/>
- [2] Zentrum für Krebsdatenregister. Robert-Koch-Institut. Stand Nov. 2020 Link:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_inhalt.html
- [3] Braess, J.; Schneider F.; Buske C., Spiekermann, K., Adorf, D., Christ, O., Heilmeier, B., Subklewe, M., Schmid, C., Fritsch, S., Waterhouse, C. Akut Myeloische Leukämie. Manual Leukämien. Tumorzentrum München. W. Zuckschwerdt Verlag München. 2009
- [4] Döhner H., Esey, E. J., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Löwenberg, B., Bloomfield, C. D., European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia NET. *Blood*; January 21, 2010, 115.
- [5] Winer, E. S.; Stone, R. M. Novel therapy In *Acute Myeloid Leuemia: moving toward targeted approaches; Therapeutic Advances in Hematology*. 2019; 10:2040620719860645
- [6] Lagunas-Rangel, F.A.; Chávez-Valencia, V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Me. Oncol; Mai*, 2017, 34:114
- [7] Hackanson, B.; Daskalakis, M.; Review Decitabine; *Recent Results Cancer Research*. 2014; 2012:269-97
- [8] Hollenbach, P. W., Nguyen, A. N., Brad, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., Krushel, L., Aukermann, S. L., Heise, C., MAcBeth, K. J.; A Comparison of Azacitidine and Decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *Plos One*. Februar 2010, Volume 5, Issue 2, e9001
- [9] San José-Enériz, E., Gimenez-Camino, N., Agirre, X., Prosper, F.; HDAC-Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*, November 2019, 13;11:1794
- [10] Daver, N., Boddur, P., Garcia-Manero, G., Singh Yadav, S., Sharma, P., Allison, J., Kantarjian, H.; Hypomethylating agents in combination with immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. Mai 2018. 32(5): 1094-1105
- [11] Van Acker, H. H., Versteven, M., Lichtenegger, F. S., Roex, G., Campillo-Davo, D., Lion, E., Subklewe, M., Van Tendeloo, V. F., Bernemann, Z. N., Anguille, S.; Dendritic Cell-based Immunotherapy of Acute myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Medicine*. Mai 2019. 8(5):579
- [12] Lichtenegger, F. S., Krupka, C., Haunber, S., Köhnke, T., Subklewe, M.; Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*. 2017; 10:142
- [13] Turtle, C. J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Gooley, T. A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T. M., Robinson, E., Steevens, N. N., Chaney, C., Soma, L., Chen, X., Yeung, C., Wood, B., Li, D., Cao, J., Heimfeld, S., Jensen, M. C., Riddell, S. R., Maloney, D. G. CD19 CAR-Tcells of defined Cd4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016. Jun 1; 126(6):2123-38.
- [14] Peters, C.; Brown, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports*. August 2015 35(4):e00225
- [15] Petersdorf, S. J., Kopecky, K. J., Slovak, M., Willman, C., Nevill, T., Brandwein, J., Larson, R. A., Erba, H. P., Stiff, P. J., Stuart, R. K., Walter, R. B., Tallmann, M. S., Stenkre, L., Appelbaum, F. R.; A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. Juni 2014. Volume 121, Nummer 24
- [16] Walter, R. B., Appelbaum, F. R., Estey, E. J., Bernstein, I. D.; Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* Juni 2012.
- [17] Castaigne, S., Pauras, C., Terré C., Raffoux, E., Bordessoule, D., Bastie, J.-N., Legrand, O., Thomas, X., Turlure, P., Reman, O., de Revel, T., Gastaud, L., de Gunzburg, N., Contentin, N., Henry, E., Marolleau, J.-P., Aljijakli, A., Rousselot, P., Fenaux, P., Preudhomme, C., Chevret, S., Dombret, H., Acute Leukemia French Association. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomized, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. April 2012, Volume 379

- [18] Sutherland, M. S. K., Walter, R. B., Jeffrey, S. C., Burke, P. J., Yu, C., Kostner, H., Stone, I., Ryan, M. C., Sussman, D., Lyon, R. P., Zeng, W., Harrington, K. H., Klussman, K., Westendorf, L., Meyer, D., Bernstein, I. D., Senter, P. D., Benjamin, D. R., Drachman, G., McEarchern, J. A.; SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML. *Blood*. August 2013.
- [19] Assi, R., Kantarjian, H., Ravandi, F., Daver, N.; Immune therapies in acute myeloid leukemia: a focus on monoclonal antibodies and immune checkpoint inhibitors. *Current opinion in hematology*. March 2018.
- [20] Fu, L., Sutherland, M. K., Yu, C., Walter, R. B., Westendorf, L., Valliere-Douglass, J., Pan, L., Cronkite, A., Sussman, D., Klussman, K., Ulrich, M., Anderson, M. E., Stone, I. J., Zeng, W., Jonas, M., Lewis, T. S., Goswami, M., Wang, S. A., Senter, P. D., Law, C.-L., Feldman, E. J., Benjamin, D. R.; Characterization of SGN-CD123A, a potent CD123-directed antibody-drug conjugate for Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*. Februar 2018.
- [21] Borthakur, G., Rosenblum, M. G., Ralpaz, M., Daver, N., Ravandi, F., Faderl, S., Freireich, E. J., Kadia, T., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Cortes, J. E.; Phase 1 study of an anti-CD33 immunotoxin, humanized monoclonal antibody M195 conjugated to recombinant gelonin (HUM-195/rCEL) in patients with advanced myeloid malignancies. *Haematologica*. Februar 2013.
- [22] Schwartz, M. A., Lovett, D. R., Redner, A., Finn, R. D., Graham, M. C., Divgi, C. R., Dantis, L., Gee, T. S., Andreeff, M., Old, L. J.; Dose-escalation trial of M195 labeled with iodine 131 for cytoreduction and marrow ablation in relapsed or refractory myeloid. *Journal of Clinical oncology* Februar 1993.
- [23] Shang, V.; Zhou, F. Current Advances in Immunotherapy for Acute Leukemia: an overview of antibody, chimeric antigen receptor, immune checkpoint and natural killer. *Frontiers in Oncology*. September 2019.
- [24] Ehninger, A., Kramer, M., Röllig, C., Thiede, C., Bornhäuser, M., von Bonin, M., Wermke, M., Feldmann, A., Bachmann, M., Ehninger, G., Oelschlägel, U.; Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*. Juni 2013
- [25] Stanchina, M., Soong, D., Zheng-Lin, B., Watts, J. M., Taylor, J.; Advances in Acute Myeloid Leukemia: Recently approved Therapies and Drugs in Development. *Cancers (Basel)*. November 2020.
- [26] Stein, E. M.; Tallman, M. S. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood*. Januar 2016
- [27] Perl, A. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Blood advances*. November 2017.
- [28] Park, S. Cho, B. S.; Kim, H.-J. New agents in acute myeloid leukemia. *Blood Research*. Juli 2020
- [29] Guy, D; Uy, G. J. Bispecific antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia. *Current Hematologic Malignancy Report*. Dezember 2018.
- [30] Saultz, J. N.; Garzon, R. Acute Myeloid Leukemia: A concise review. *Journal of Clinical Medicine*. März 2016.
- [31] Lambert, J., Pautas, C., Terré, C., Raffoux, E., Turlure, P., Caillot, D., Legrand, O., Thomas, X., Gardin, C., Gogat-Marchant, K., Rubin, S. D., Benner, R. J., Bousset, P., Preudhomme, C., Chevret, S., Dombret, H., Castaigne, S.; Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label phase III ALFA 0701 trial. *Haematologica* 2019.
- [32] Zheng, B., Yu, S.-F., Del Rosario, G., Leong, S. R., Lee, G. Y., Vij, R., Chiu, C., Liang, W.-C., Wu, Y., Chalouni, C., Sadowsky, J., Clark, V., Hendricks, A., Achilles Poon, K., Chu, W., Pillow, T., Schutten, M. M., Flygare, J., Polson, A. G.; An anti-CLL-1 antibody-drug conjugate for the treatment of acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2018
- [33] Sergeeva, A., He, H., Ruisaard, K., John, L. S., Alatrash, G., Clise-Dwyer, K., Li, D., Patenia, R., Hong, R., Shukhumalachandra, P., You, M. J., Gagea, M., Ma, Q., Molldrem, J. J.; Activity of 8Fa, a T-cell receptor like anti-PR1/HLA-A2 antibody, against primary human AML in vivo. *Leukemia*. 2016
- [34] Kampen, K. R., Scherpen, F. J. G., Mahmud, H., Ter Elst, A., Mulder, A. B., Guryev, C., Verhagen, H. J. M. P., Keersmaecker, K. D., Smit, L., Kornblau, S. M., De Bont, E. S. J. M. VEGF-C antibody therapy drives differentiation of AML. *Cancer Research*. 2018.
- [35] Leong, S. R., Sukumaran, S., Hristopoulos, M., Totpal, K., Stainton, S., Lu, E., Wong, A., Tam, L., Newman, R., Vuilleminot, B. R., Ellerman, D., Gu, Ch., Mathieu, M., Dennis, M. S., Nguyen, A., Zheng, B., Zhang, C., Lee, G., Chu, Y.-W., Prell, R. A., Lin, K., Laing, S. T., Polson, A. G.; An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* 2017.

- [36] Stein, E. M., Garcia-Manero G., Rizzieri, D. A., Savona, M., Tibes, R., Altman, J. K., Jongen-Lavrencic, M., Döhner, H., Armstrong, S., Pollock, R. M., Waters, N. J., Legler, M., Thomason, B., Daigle S., McDonald, A., Campbell, C., Olhava, E., Hedrick, E. E., Lowenberg, B, Copeland, R. A., Tallman, M. S.; The DOT1L Inhibitor EPZ-5676: Safety and Acitivity in relapsed/refractory patients with MLL-rearranged Leukemia. *Blood* 2014.
- [37] Konopleva M, Pollyea D.A., Potluri, J., Chyla, B. J., Busman, T. A., McKeegan, E., Salem, A. H., Zhu, M., Ricker, J. L., Blum, W., Dinardo, C. D., Dunbar, M., Kirby, R., Falotico, N., Levenson, J. D., Humerickhouse, R. A., Mabry, M., Stone, R. M., Kantarjian, H. M., Letai, A. G.; A phase 2 Study of ABT-19 (GDC-0199) in Patients with acute myelogenous Leukemia. *Blood* 2013. Abstract 118
- [38] Perez P, Hoffman R. W., Shaw, S. Bluestone, J.A., Segal, D. M. Spefiic targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature* 1985
- [39] Staerz, U. D. Kanagawa O., Bevan M. J. Hybrid Antibodies can target sites for Attack by T-Cells. *Nature* 1985
- [40] Brinkmann, U., Kontermann, R. E. The making of bispecific antibodies. *MABS* 2017
- [41] Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., Betenbaugh, M. J. Design and Production of bispecific antibodies. *Antibodies (Basel)*. September 2019.
- [42] Kontermann, R. E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011.
- [43] Herrmann, H.; Sadovnik, I.; Eisenwort, G.; Rüllicke, Th.; Blatt, K; Herndlhofer, S.; Willmann, M., Stefanzi, G.; Baumgartner, S.; Greiner, G.; Schulenburg, A.; Mueller, N.; Rabitsch, W.; Bilban, M.; Hoermann, G.; Streubel, B.; Vallera, D. A.; Sperr, W. R.; Valent, P. Delineation of target expression profiles in CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ stem and progenitor cells in AML and CML. *Blood Advances*. Oktober 2020.
- [44] Williams, B. A., Law, A.; Hunyadkurti, J.; Desilets, S.; Leyton, J.; Keating, A. Antibody therapies for acute myeloid leukemia: unconjugated, toxin-conjugated, radio-conjugated and multivalent formats. *Journal of clinical medicine*. August 2019.
- [45] BD Biosciences. Stand Dezember 2020. Link: <https://www.bdbiosciences.com/en-eu>
- [46] Gomes-Silva, D., Atilla, E., Atilla, P.A., Mo, F., Tashiro, H., Srinivasan, M., Lulla, R., Rouce, R.H., Cabral, J.M.S., Ramos, C.A., Brenner, M. K., Mamonkin, M. *Molecular Therapy*. Januar 2019
- [47] Xu, S., Li, X., Zhang, J., Chen, J. Prognostic Value of CD11b Expression Level for Acute Myeloid leukemia Patients: a meta-analysis. *Plos One*. 2015.
- [48] Bouchet, S., Tang, R., Fava, F., Legrand, O., Bauvois, B. Targeting CD13 (aminopeptidase-N) in turn downregulates ADAM17 by internalization in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. September 2014.
- [49] Schürch, C. M., Therapeutic Antibodies for myeloid neoplasms – Current developments and future directions. *Frontiers in Oncology*. 2018.
- [50] Zheng, W., Medeiros, L. J., Hu, Y., Cortes, J. E., Ravandi-KAshani, F., Kantarjian, H. H., Wang, S. A., CD30 Expression in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. Juni 2013.
- [51] Drent, E., Groen, R.W.J., Noort, W. A., Themeli, M., Lammerts van Bueren, J. J., Parren, P.W.H.I, Kuball, J., Sebestyen, Z., Yuan, H., de Bruijn J., van de Donk, NWCJ. , Martens, A. C. M, Lokhors, H. M., Mutis, T. Preclinical evaluation of CD38 chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica*. Mai 2016.
- [52] Lo, M-Ch, Peterson, L.F., Yan, M., Cong, X., Jin, F., Shia, W., Matsuura S., Ahn, E., Komeno, Y., Ly, M. Ommen, H.B, Chen, I, Hokland, P., Willmann, CL, Ren, B, Thang, DE. Combined gene expression and ANA occupancy profiling identifies potential therapeutic targets of t(8:21) AML. *Blood* 2012.
- [53] Piccione, E.C., Juarez, S., Liu, J, Tseng, S., Ryan CE, Narayanan, C., Wang, L., Weiskopf K, Majeti, R. A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selevicely binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells. *MABS*. September 2015.
- [54] Valent, P., Sadovnik, I, Eisenwort, G., Bauer, K., Herrmann, H., Gleixner, K. V., Schulenburg, A., Rabitsch, W., Sperr, W. R., Wolft, D. Immunotherapy based targeting and elimination of leukemic stem cells in AMI and CML. *International Journal of Melecular Sciences*. September 2019.
- [55] Valent, P, Bauer, K., Sadovnik, I., Smmilijkovic, D., Ivanov, D., Herrmann, H., Filik, Y. Eisenwort, G., Sperr, W. R., Rabitsch, W. Cell-based and antibody-mediated immunotherapies directed against leukemic stem cells in acute myeloid leukemia: perspectives and open issues. *Stemm cells translational medicine*. November 2020.

- [56] Georgiev, H., Ravens, I., Papadogianni, G., Bernhardt, G. Coming of Ages: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 2018.
- [57] Dourado, K. M. C., Baik, J., Oliveira, V. K. P., Beltrame, M., Yamamoto, A., Theuer, C. P., Figueiredo, C. A. V., Verneris, M. R., Perlingeiro, R. C. R. Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. *Blood*. Mai 2017.
- [58] Xu, J., Zheng, J., Fu, X., Wu, W., Tao, L., Li, D., Lin, D. Inhibition of N822K T>A mutation-induced constitutive c-KIT activation in AML cells triggers apoptotic and autophagic pathways leading to death. *International Journal of Medical Sciences*. 2019.
- [59] Jeo, S-K., Noh, E-K., Kim, J. Y, Jeong, Y. K., Jo, J-C., Choi, Y., Koh, S, Baek, J. H., Min, Y. J., Kim, H. Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death. *Scientific Reports by Nature research*. 2017.
- [60] Mardiros, A., Santos, C. D., McDonald, T., Brown, C. E., Wang, X., Budde, L. E, Hoffman, L., Aguilar, B., Chang, W-C., Bretzlaff, W., Chang, B., Jonnalagadda, M., Starr, R., Ostberg, J. R., Jensen, M. C., Bhatia, R., Forman, S. J. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*. October 2013.
- [61] Mani, R., Goswami, S., Gopalakrishnan, B., Ramaswamy, R., WAsmuth, R., Tran, M., Mo, X, Gordon, A., Bucci, D., Lucas, D. M., Mims, A., Brooks, C., Dorrance, A., Walker, A., Blum, W., Byrd, J. C., Lozanski, G, Vasu, S., Muthusamy, N. *Haematologica*. August 2018.
- [62] Daver, N., Schlenk, R. F., Russell, N. H., Levis, M. J. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019.
- [63] Yakymic, Y., Augeri, S., Fissolo, G., Peola, S., Bracci, C., Binaschi, M., Bellarosa, D., Pellacani, A., Ferrero, E., Ortolan, E., Funaro, A. CD157: from myeloid cell differentiation marker to therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cells*. Dezember 2019.
- [64] Krupka, C., Lichtenegger, F. S., Köhnke, Th., Bögeholz, J., Bücklein, V., Roiss, M., Altmann, T., Do, T. U., Dusek, R., Wilson, K., Bisht, A., Terrett, J., Aud, D., Pombo-Villar, E., Rohlf, C. Hiddemann, W., Subklewe, M. Targeting CD157 in AML using a novel Fc-engineered antibody construct. *Oncotarget*. Mai 2017.
- [65] Cuesta-Mateos, C., Alcaraz-Serna, A., Somovilla-Crespo, B., Munoz-Calleja, C. Monoclonal antibody therapies for hematological malignancies: not just lineage-specific targets. *Frontiers in Immunology*. 2017.
- [66] London, M., Gallo, E. Critical role of EphA3 in cancer and current state of EphA3 drug therapeutics. *Molecular Biology Reports*. Juli 2020.
- [67] Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y., Grupp, S. A. Grading of cytokine release syndrome associated with the car t cell therapy. *Journal of hematology and oncology*. 2018.
- [68] Amsellem, S., Pflumio, F., Bardinnet, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P-H., Dubart-Kupperschmitt, A., Fichelson, S. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nature medicine*. 2003 Nov;9(11):1423-7. Doi:10.1038/nm953
- [69] Chomel, J.-C., Bonnet, M-K., Sorel, N., Bertrand, A., Meunier, M.-C., Fichelson, S., Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Guilhot, F., Turhan, A. G. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood*. 2011 Sep 29; 118(13): 3657-3660
- [70] Funayama, K., Shimane, M., Nomura, H., Asano, S. An evidence for adhesion-mediated acquisition of acute myeloid leukemic stem cell-like immaturities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 392, Issue 3, 12 February 2010, Pages 271-276
- [71] Herrmann, M., Krupka, C., Dieser, K., Brauchle, B., Marcinek, A., Wagner, A. O., Rataj, F., Mocikat, R., Metzeler, K. H., Spiekermann, K., Kobold, S., Fenn, N. C., Hopfner, K.-P., Subklewe, M. Bifunctional PD-1 x alphaCD3 x alpha CD33 fusion protein reverses adaptive immune escape in acute myeloid leukemia. *Blood*. 6. Dezember 2018. Volume 132, Number 23.
- [72] Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M. R., Warlick, E., Gleason, M. K., Ross, J. A., Luo, X., Weisdorf, D. J., Walcheck, B., Vallera, D. A. Miller, J. S. Targeting Natural Killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16x33 bispecific killer cell engager (BiKE) and ADAM17 inhibition
- [73] Vallera, D. A., Felices, M., McElmurry, R., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J. U., Zhang, B., Lenvik, A. J. L., Panoskaltsis-Mortari, A., Verneris, M. R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D. J., Blazar, B. R., Miller, J. S. IL-15 trispecific killer engagers (TriKEs) make natural killer cells specific to CD33+ targets while also inducing persistence,

- in vivo expansion and enhanced function. *Clinical Cancer Research*. 2016 Juli 15; 22(14): 3440-3450. Doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2710
- [74] Arvindam, U. S., van Hauten, P. M. M., Schirm, D., Schaap, N., Hobo, W., Blazar, B. R., Vallera, D. A., Dolstra, H., Felices, M., Miller, J. S. A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killin of AML cells. *Leukemia* 2020.
- [75] Xie, C.-H., Wei, M., Yang, F.-Y., Wu, F.-Z., Chen, L., Wang, J.-K., Liu, Q., Huang, J.-X. Efficacy and safety of lenalidomide for the treatment of acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Management and Research*. 2018:10
- [76] Anguille, S., Van de velde, A. L., Smits, E. L., Van Tendeloo, V. F., Juliusson, G., Cools, N., Nijs, G., Stein, B., Lion, E., Van Driessche, A., Vandenbosch, I., Verlinden, A., Gadisseur, A. P., Schroyens, W. A., Muylle, L., Vermeulen, K., Maes, M.-B., Deiteren, K., Malfait, R., Gostick, E., Lammens, M., Couttenye, M. M., Jorens, P., Goossens, H., Price, D. A., Ladell, K., Oka, Y., Fujiki, F., Oji, Y., Sugiyama, H., Bernemann Z. N. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood* 2017. Oct 12; 130(15): 1713-1721
- [77] Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. Bethesda, MD: National Cancer Institute: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/browse_csr.php?sectionSEL=13&pageSEL=sect_13_table.16 Stand: 03. Dezember 2020.
- [78] Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, Ch., Prior, T. W., Döhner, K., Marucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J. Schlenk, R. F., Ganser, A. Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R.A., Döhner, H. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017 August 03; 377(5): 454-464. Doi:10.1056/NEJMoa1614359
- [79] Stone, R. M. What FLT3 inhibitor holds the greatest promise?. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* 2018; 31:401-404
- [80] Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., Takeshita, A., Saito, K., Hasegawa, S., Shimodaira, S., Tamura, J., Shimazaki, C., Matsue, K., Kobayashi, H., Arima, N., Suzuki, R., Morishita, H., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R. and Leukemia Study Group of the ministry of Health and Welfare. *Leukemia*. 1997 11, 1447-1452
- [81] Garg, M., Nagata, Y., Kanojia, D., Mayakonda, A., Yoshida, K., Keloth, S. H., Zang, Z. J., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Ding, L.-W., Alpermann, T., Sun, Q.-Y., Link, D.-C., Chien, W., Madan, V., Liu, L.-Z., Tan, K.-T., Sampath, A., Venkatesan, S., Inokuchi, K., Wakita, S., Yamaguchi, H., Chng, W. J., Yin Kham, S.-K., Eng-Juh Yeoh, A., Sanada, M., Schiller, J., Kreuzer, K.-A., Kornblau, S. M., Kanarijan, H. M., Haferlach, T., Lill, M., Kuo, M.-C., Shih, L.-Y., Blau, I.-W., Blau, O., Yang, H., Ogawa, S., Koeffler, H. P. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse.
- [82] Levis, M., Shi, W., Chang, K., Laing, C., Pollner, R., Gocke, C., Adams, E., Berisha, F., Lameh, J., Lesegetrain, A. FLT3 inhibitors added to induction therapy induce deeper remissions. *Blood*. 2020, 135 (1):75-78
- [83] Schiller, J. G., Tallmann, M. S., Goldberg, S. L., Perl, A. E., Marie, J.-P., Martinelli, G., Larson, R. A., Russel, N., Trone, D., Gammon, G., Levis, M. J., Cortes, J. E. Final Results of a randomized phase 2 study showing the clinical benefit of quizartinib (AC220) in patients with FLT3-ITD positive relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 32, Nr. 15. Mai 20, 2014 7100-7100.
- [84] Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., Ellerton, J., Larson, R. A., Schiffer, C. A., Holland, J. F. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia Group B. *Journal of Clinical Oncology*. 2002. Mai 15;20(10):2429-40.
- [85] Wijermans, P., Lübbert, M., Verhoef, G., Bosly, A., Ravoet, C, Andre, M, Ferrant, A. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2000 March; 18(5):956-62
- [86] Issa, J.-P. J., Garcia-Manero, G., Giles, F. J., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C. S., Cortes, J., Kantarjian H. M. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004 March 1;103(5):1635-40
- [87] Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlknecht, U., Lyko, F. Azacytidine causes complex DANN methylation responses in myeloid leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*. September 2009, Volume 7, Issue 9

- [88] Flotho, C., Clas, R., Batz, C., Schneider, M, Sandrock, I., Ihde, S., Plass, C., Niemeyer, C. M., Lübbert, M. The DNA methyltransferase inhibitors azacytidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 23, 1019-1028. 2009
- [89] Roboz, G. J., DiNardo, C. D., Stein, E. M, de Botton, S., Mims, A. S., Prince, G. T., Altmann, J. K, Arellano, M. L., Donnellan, W., Erba, H. P., Mannis, G. N, Pollyea, D. A., Stein, A. S., Uy, G. L., Watts, J. M., Fathi, A. T., Kantarjian, H. M., Tallman, M. S., Choe, S., Dai, D., Fan, B., Wang, H., Zhang, V., Yen, K. E., Kapsalis, S. M., Hickman, D., Liu, H., Agresta, S. V., Wu, B., Attar, E. C., Stone, R. M. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood*. 2020. Feb 13;135(7):463-471.
- [90] Kantarjian, H. M, Roboz, G. J., Kropf, P. L., Yee, K. W. L., O'Connell, C. L., Tibes, R., Walsh, K. J., Podoltsev, N. A., Griffiths, E. A., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Rizzieri, D., Stock, W., Savona, M. R., Rosenblat, T. L., Berdeja, J. G, Ravandi, F., Rock, E. P., Hao, Y., Azab, M., Issa, J.-P. J. Guadecitabine (SGI-110) in treatment-naïve patients with acute myeloid leukaemia: phase 2 results from a multicenter, randomized phase ½ trial. *The Lancet Oncology*. 2017 Oct;18(10)1317-1326.
- [91] Issa, J-P. J., Roboz, G., Rizzieri, D., Jabbour, E., Stock, W., O'Connell, C., Yee, K., Tibes, R., Griffiths, E. A., Walsh, K., Daver, N., Chung, W., Naim, S., Taverna, P., Oganessian, A., Hao, Y., Lowder, J. N., Azab, M, Kantarjian, H. *The Lancet Oncology*. 2015, Sept; 16(9):1099-1110.
- [92] Medeiros, B. C., McCaul, K., Kambhampati, S., Pollyea, D. A., Kumar, R., Silverman, L. R., Kew, A., Saini, L., Beach, C. L., Vij, R., Wang, X., Zhong, J., Gale, R. P. Randomized study of continuous high-dose lenalidomide, sequential azacytidine and lenalidomide or azacytidine in persons 65 years and over with newly-diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018 Jan;103(1):101-106
- [93] Pollyea, D. A., Zehnder, J., Coutre, S., Gotlib, J. R., Gallegos, L., Abdel-Wahab, O., Greenberg, P., Zhang, B., Liedtke, M., Berube, C., Levine, R., Mitchell, B. S., Medeiros, B. C. Sequential azacytidine plus lenalidomide combination for elderly patients with untreated acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2013 Apr; 98(4): 591-596
- [94] Waitkus, M. S., Diplas, B., Yan, H. Biological role and therapeutic potential of IDH mutations in cancer. *Cancer Cell*. 2018. Aug 13; 34(2): 186-195.
- [95] Stein, E. M., DiNardo, C. D., Pollyea, D. A., Fathi, A. T., Roboz, G. J., Altman, J. K., Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Levine, R., Flinn, I. W., Kantarjian, H. M., Collins, R., Patel, M. R., Frankel, A. E. Sten, A., Sekeres, M. A., Swords, R. T., Medeiros, B. C., Willekens, C., Vyas, P. Tosolini, A., Xu, Q., Knight, R. D., Yen, K. E., Agresta, S., de Botton, S., Tallmann, M. S. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017 August 10; 130(6):722-731
- [96] DiNardo, C. D., Stein, E. M., de Botton, S., Roboz, G. J., Altman, J. K., Mims, A. S., Swords, R., Collins, R. H., Mannis, G. N., Pollyea, D. A., Donnellan, W., Fathi, A. T., Pigneux, A., Erba, H. P., Prince, G. T., Stein, A. S., Uy, G. L., Foran, J. M., Traer, E., Stuart, R. K., Arellano, M. L., Slack, J. L., Sekeres, M. A., Willekens, C., Chloe, S., Wang, H., Zhang, V., Yen, K. E., Kapsalis, S. M., Yang, H., Dai, D., Fan, B., Goldwasser, M., Liu, H., Agresta, S., Wu, B., Attar, E. C., Tallman, M. S., Stone, R. M., Kantarjian, H. M. Durable Remissions with Ivosdenib n IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *The New England journal of medicine*. 2018; 378:2386-2398
- [97] Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.-Z., Radmacher, M. D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K. B., Whitman, S. P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K. H., Powell, B. L., Carter, T. H., Kolitz, J. E., Wetzler, M., Carroll, A. J., Baer, M. R., Caligiuri, M. A., Larson, R. A., Bloomfield, C. D., IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group b study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 May 10;28(14):2348-55
- [98] Yen, K., Travins, J., Wang, F., David, M. D., Artin, E., Straley, K., Padyana, A., Gross, S., DeLaBarre, B., Tobin, E., Chen, Y., Nagarja, R., Choe, S., Jin, L., Konteatis, Z., Cianchetta, G., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Quivoron, C., Poplon, P., Bawa, O., Saada, V., Paci, A., Broutin, S., Bernard, O. A., de Botton, S., Marteyn, B. S., Pilichowska, M., Xu, Y. X., Fang, C., Jiang, F., Wei, W., Jin, S., Silverman, L., Liu, W., Yang, H., Dang, L., Dorsch, M., Penard-Lacronique, V., Biller, S. A., Su, S.-S. M. AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic IDH2 mutations. *Cancer Discovery*. 2017 May;7(5):478-493
- [99] Lim, W.-S., Tardi, P. G., Dos Santos, N., Xie, X., Fan, M., Liboiron, B. D., Huang, X., Harasym, T. O., Bermudes, D., Mayer, L. D. Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation in bone marrow xenografts. *Leukemia Research*. 2010 Sep;34(9):1214-23

- [100] Tardi, P., Johnstone, S., Harasym, N., Xie, S., Harasym, ., Zisman, N., Harvie, P., Bermudes, D., Mayer, L. In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leukemia Research*. 2009 Jan;33(1):129-39
- [101] Feldman, E. J., Lancet, J. E., Kolitz, J. E., Ritchie, E. K., Roboz, G. J., List, A. F., Allen, S. L., Asatiani, E., Mayer, L. D., Swenson, C., Louie, A. C. First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Mar 10;29(8):9979-85
- [102] Mayer, L. D., Tardi, P., Louie, A. C. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *International Journal of Nanomedicine*. 2019; 14:2819-3830
- [103] Lancet, J. E., Uy, G. L., Cortes, J. E., Newell, L. F., Lin, T. L., Ritchie, E. K., Stuart, R. K., Strickland, S. A., Hogge, D., Solomon, S. R., Stone, R. M., Bixby, D. L., Kolitz, J. E., Schiller, G. J., Wieduwilt, M. J., Ryan, D. H., Hoering, A., Banerjee, K., Chiarella, M., Louie, A. C., Medeiros, B. C. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2018. Sep 10;36(26):2684-2692
- [104] Konopleva, M., Pollyea, D. A., Potluri, J., Chyla, B. J., Busman, T., McKeegan, E., Salem, A., Zhu, M., Ricker, J. L., Blum, W., DiNardo, C. D., Dunbar, M., Kirby, R., Falotico, N., Levenson, J. D., Humerickhouse, R. A., Mabry, M., Stone, R. M., Kantarjian, H. M., Letai, A. G. A phase 2 study of ABT-199 (GDC-0199) in patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Blood* 2014; 124 (21):118
- [105] Chan, S. M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M. R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W.-J., Zhao, F., Medeiros, B. C., Tyvoll, D. A., Majeti, R. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nature Medicine*. 2015 Feb;21(2):178-84
- [106] Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Davton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., Mason, K. D., Mitten, M. J., Nimme, r P. M., Oleksijew, A., Park, C. H., Park, C.-M., Phillips, D. C., Roberts, A. W., Sampath, D., Seymour, J. F., Smith, M. L., Sullivan, G. M., Tahir, S. K., Tse, C., Wendt, M. D., Xiao, Y., Xue, J. C., Zhang, H., Humerickhouse, R. A., Rosenberg, S. H., Elmore, S. W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*. 2013 Feb;19(2):202-8
- [107] Konopleva, M., Pollyea, D. A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busan, T., McKeegan, E., Salem, A. H., Zhu, M., Ricker, J. L., Blum, W., DiNardo, C. D., Kadia, T., Dunbar, M., Kirby, R., Falotico, N., Levenson, J., Humerickhouse, R., Mabry, M., Stone, R. M., Kantarjian, H., Letai, A. Efficacy and biological correlates of response in a phase II Study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Cancer Discovery*. 2016 Oct;6(10):1106-1117
- [108] Kühn, M. W. M., Hadler, M. J., Daigle, S. R., Koche, R. P., Krivtsov, A. V., Olhava, E. J., Caligiuri, M. A., Huang, G., Bradner, J. E., Pollock, R. M., Armstrong, S. A. MLL partial tandem duplication leukemia cells are sensitive to small molecule DOT1L inhibition. *Haematologica*. Vol.100 No. 5 2015: Mai, 2015.
- [109] Daigle, S. R., Olhava, E. J., Therkelsen, C. A., Majer, C. R., Sneeringer, C. J., Song, J., Johnston, L. D., Porter Scott, M., Smith, J. J., Xiao, Y., Jin, L., Kuntz, K. W., Chesworth, R., Moyer, M. P., Bernt, K. M., Tseng, J.-C., Kung, A. L., Armstrong, S. A., Copeland, R. A., Richon, V. M., Pollock, R. M. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell*. 2011 Juli 12;20(1):53-65
- [110] Stein, E. M., Garcia-Manero, G., Rizzieri, D. A., Tibes, R., Berdeja, J. G., Jongen-Lavrencic, M., Altman, J. K., Dohner, H., Thomson, B., Blakemore, S. J., Daigle, S., Fine, G., Waters, N. J., Krivstov, A. V., Koche, R., Armstrong, S. A., Ho, P. T., Lowenberg, B., Tallman, M. S. A phase 1 Study of the DOT1L inhibitor, pinometostat (EPZ-5676) in adults with relapsed or refractory leukemia: safety, clinical activity, exposure and target inhibition. *Blood* 2015; 126 (23):2547
- [111] Shukla, N., Wetmore, C., O'Brien, M. M., Silverman, L. B., Brown, P., Cooper, T. M., Thomson, B., Blakemore, S. J., Daigle, S., Suttle, B., Waters, N. J., Krivstov, A. V., Armstrong, S. A., Ho, P. T., Gore, L. Final Report of phase 1 study of the DOT1L inhibitor, pinometostat (EPZ-5676) in children with relapsed or refractory MLL-r acute leukemia. *Blood* 2016. 128(22):2780.
- [112] Fiskus, W., Sharma, S., Shah, B., Portier, B. P., Devaraj, S. G. T., Liu, K., Iyer, S. P., Bearss, D., Bhalla, K. N. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia*. 2014. Nov; 28(11):2155-64

- [113] Fen, Z., Yao, Y., Zhou, C., Chen, F., Wu, F., Wie, L., Liu, W., Dong, S., Redell, M., Mo, Q., Song, Y. Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 2016; 9:24
- [114] Cortes, J. E., Dombret, H., Merchant, A., Tauchi, T., DiRienzo, C. G., Sleight, B., Zhang, X., Leip, E. P. Shaik, N., Bell, T., Ghan, G., Sekeres, M. A. Glasdegib plus intensive/nonintensive chemotherapy in untreated acute myeloid leukemia: BRIGHT AML 2019 phase III trials. *Futury Oncology*. 2019 Nov; 15(31):3531-3545
- [115] Stone, R. M., Dohner, H., Ehninger, G., Vlleneuve, M., Teasdale, T., Virkus J. D., Bressler, L. R., Seiler, M. M., Marcucci, G., Larson, R. A., on behalf of all study investigators. CALGB10603 (RATIFY): A randomized phase III study of induction (daunorubicin/cytarabine) and consolidation (high-dose cytarabine) chemotherapy combined with midostaurin or placebo in treatment-naive patients with FLT3 mutated AML. *Journal of Clinical Oncology*. Volume 29, Issue 15.
- [116] Blobel, G. A., Kalota, A., Sanchez, P. V., Carroll, M. Short hairpin RNA screen reveals bromodomain proteins as novel targets in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Sept 13;20(3):287-8
- [117] Berthon, C., Raffoux, E., Thomas, X., Vey, N., Gomez-Roca, C., Yee, K., Taussig, D. C., Rezai, K., Rounrier, C., Herait, P., Kahatt, C., Quesnel, B., Michallet, M., Recher, C., Lokiec, F., Preuhomme, C., Dombret, H. Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *The Lancet Haematology*. 2016 April;3(4):e186-95
- [118] Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S., Bradner, J. E. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468;1067-1073.2010
- [119] Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A. R., Herrmann, H., Sison, E. A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., Taylor, M. J., Johns, C., Chicas, A., Mulloy, J. C., Kogan, S. C., Brown, P., Valent, P., Bradner, J. E., Lowe, S. W., Vakoc, C. R. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*. 478, 524-528. 2011
- [120] Herrmann, H., Blatt, K., Shi, J., Gleixner, K. V., Cerny-REiterer, S., Müllauer, L., Vakoc, C. R., Sperr, W. R., Horny, H.-P., Bradner, J. E., Zuber, J., Valent, P. Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2012. Dec;3(12):1588-99
- [121] Kojima, K., Kornblau, S. M., Ruvolo, V., Dilip, A., duvuri, S., Davis, R. E., Zhang, M., Wang, Z., Coombes, K. R., Zhang, N., Qiu, Y. H., Burks, J. K., Kantarjian, H., Shacham, S., Kauffman, M., Andreef, M. Prognostic impact and targeting of CRM1 in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 May 16;121(20):166-74
- [122] Ranganathan, P., Yu, X., Na, C., Santhanam, R., Shacham, S., Kauffman, M., Walker, A., Klisovic, R., Blum, W., Caligiui, M., Croce, C. M., Marcucci, G., Garzon, R. Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 August 30;120(9):1765-73
- [123] Etchin, J., Sun, Q., Kentsis, A., Farmer, A., Zhang, Z. C., Sanda, T., Mansour, M. R., Barcelo, C., McCauley, D., Kauffman, M., Shacham, S., Christie A. L., Kung, A. L., Rodig, S. J., Chook, Y. M., Look, A. T. Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells. *Leukemia*. 2013. Januar;27(1):66-74
- [124] Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012. April; 12(4):252-264
- [125] Chen, L., Flies, D. B. Molecular mechanisms of T-cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013, 13;227-242
- [126] Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Ftz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., wood, C. R., Honjo, T. Engagement of th PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000. Oct 2; 192(7):1027-1034
- [127] Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tanee, A. Azuma, M., Saito, T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *Journal of Experimental Medicine*. 2012. Juni 4;209(6):1201-17
- [128] Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., Chen, L. *Nature Medicine*. 2020. Aug;8(8):793-800
- [129] Alatrash, G., Daver, N., Mittendorf, E. A. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacological Reviews*. 2016. Oct;68(4):1014-1025

- [130] Berger, R., Rotem-Yehudar, R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Shimoni, A., Nagler, A. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1 in patients with advanced hematologic malignancies. *Clinical Cancer Research*. 2008. May 15;14(10):3044-51
- [131] Fevery, S., Billiau, A. D., Sprangers, B., Rutgeerts, O., Lenaerts, C., Goebels, J., Landuyt, W., Kasran, A., Boon, L., Sagaert, X., Wolf-Peeters, C., waer, M., Vandenberghe, P. CTLA-4 blockade in murine bone marrow chimeras induces a host-derived antileukemic effect without graft-versus-host disease. *Leukemia* 21, 1451-1459. 2007
- [132] Pyzer, A. R., Avigan, D. E., Rosenblatt, J. Clinical trials of dendritic cell-based cancer vaccines in hematologic malignancies. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2014; 10(11):3125-31
- [133] Lichtenegger, F. S., Deiser, K., Rothe, M., Schnrofeil, F. M., Krupka, C., Augsberger, C., Köhnke, T., Nücklein, V. L., Altmann, T., Moosmann, A., Brüggemann, M., Heemskerk, M. H. M., Wittmann, G., Wagner, B., Hiddemann, W., Bigalke, I., Kvalheim, G., Subklewe, M. Induction of antigen-specific T-cell responses through dendritic cell vaccination in AML: results of a phase I/II trial and ex vivo enhancement by checkpoint blockade. *Blood*. 2016. 128(22):764
- [134] Beck, B., Dörfel, D., Lichtenegger, F. S., Geiger, C., Lysann, L., Merk, M., Schendel, D. J., Subklewe, M. Effects of TLR agonists on maturation and function of 3-day dendritic cells from AML patients in complete remission. *Journal of Translational Medicine*. 2011; 151
- [135] Lichtenegger, F. S., Mueller, K., Otte, B., Beck, B., Hiddemann, W., Schendel, D. J., Subklewe, M. CD86 and IL-12p70 are key players for T-helper 1 polarization and natural killer cell activation by toll-like receptor-induced dendritic cells.
- [136] Subklewe, M., Geiger, C., Lichtenegger, F. S., Javorovic, M., Kvalheim, G., Schendel, D. J., Bigalke, I. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2014. Oct; 63(10):1093-103
- [137] O'Hear, C., Heiber, J. F., Schubert, I., Fey, G., Geiger, T. L. Anti-CD33 chimeric antigen receptor targeting of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 20115. Mar; 100(3):336-44
- [138] Pizzitola, I., Anjos-Afonso, F., Rouault-Pierre, K., Lassailly, F., Tettamanti, S., Spinelli, O., Biondi, A., Bagi, E., Bonnet, D. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 2014. Aug; 28(8):1596-605
- [139] Guzman, M. I., Sugita, M., Zong, H., Ewing-Crystal, N., Trujillo-Alonso, V., Mencia-Trinchant, N., Lam, L., Cruz, N. M., Galetto, R., Gouble, A., Hassane, D. C., Smith, J., Roboz, G. J. Allogeneic Tcr α /beta deficient CAR T-cells targeting CD123 prolong overall survival of AML patient-driven xenografts. *Blood* 2016. 128(22):765
- [140] Kenderian, S. S., Ruella, M., Sestova, O., Klichinsky, M., Kim, M. Y., Soderquist, C., Bagg, A., Singh, R., Richardson, C., Young, R. M., June, C. H., Gill, S. I. Leukemia stem cells are characterized by CLEC12A Expression and chemotherapy refractoriness that can be overcome by targeting with chimeric antigen receptor T cells. *Blood* 2016. 128(22):766
- [141] Kim, M. Y., Yu, K.-R., Kenderian, S. S., Ruella, M., Chen, S., Shin, T.-H., Aljanahi, A. A., Schreeder, D., Klichinsky, M., Sestova, O., Kolowski, M. S., Cummins, K. D., Shan, X., Sestov, M., Bagg, A., Morrissette, J. J. D., Sekhri, P., Lazzarotto, C. R., Calvo, K. R., Kuhns, D. B., Donahue, R. E., Behbehani, G. K., Tsai, S. Q., Dunbar, C. E., Gill, S. Genetic inactivation of Cd33 in hematopoietic stem cells to enable CAR T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Cell*. 2018. May 31;173(6):1439-1453
- [142] Wang, J., Chen, S., Xiao, W., Li, W., Wang, L., Yang, S., Wang, W., Xu, L., Liao, S., Liu, W., Wang, Y., Liu, N., Zhang, J., Xia, X., Kang, T., Chen, G., Cai, X., Yang, H., Zhang, X., Lu, Y., Penghui, Z. CAR-T-cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*. 2018. Jan 10; 11(1):7
- [143] Brauneck, Franziska (2019). Antikörper-basierte Immuntherapie in der AML: Einfluss zytoreduktiver Substanzen auf die CD33/CD3 BiTE[®]-vermittelte Zytotoxizität und Analyse der Expression von ILT3, CD244 und CD48 auf CD33 positiven AML-Zellen. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.
- [144] Xie, C.-H.; Wie, M., Yang, F.-Y., Wu, F.-Z., Chen, L., Wang, J.-K., Liu, Q., Huang, J.-X.; Efficacy and safety of lenalidomide for the treatment of acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Management Research*. 2018, September 18;10:3637-3648
- [145] Krämer, I., Engelhardt, M., Fichtner, S., Neuber, B., Medenhoff, S., Bertsch, U., Hillengass, J., Raab, M.-S., Hose, D., Ho, A. D., Goldschmidt, H., Hundemer, M.; Lenalidomide enhances myeloma-specific T-cell responses in vivo and in vitro.

- [146] Wang, Z., Zhou, G., Risu, N., Fu, J., Zou, Y., Tang, J., Li, L., Liu, J., Liu, Q., Zhu, X.; Lenalidomide enhances CAR-T cell acitivity against solid tumor cells. *Cell Transplant.* Jan-Dec 2020;29:963689720920825.
- [147] Gribben, J. G., Fowler, N., Morschhauser, F.; Mechanisms of action of lenalidomide in B-cell non-hodgkin Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2015 September 1; 33(25):2803-11
- [148] Lapenta, C., Donaati, S., Spadaro, F., Lattanzi, L., Urbani, F., Macchia, I., Sestili, P., Spada, M., Cox, M. C., Belardelli, F., Santini, S. M.; Lenalidomide improves the therapeutic effect of an interferon-alpha-dendritic cell-based lymphoma vaccine. *Cancer Immunology Immunotherapy.* 2019 November;68(11):1791-1804
- [149] Krupka, C., Kufer, P., Kischel, R., Zugmaier, G., Bögeholz, J., Köhnke, T., Lichtenegger, F. S., Schneider, S., Metzeler, K. H., Fiegl, M., Spiekermann, K., Baeuerle, P. A., Hiddemann, W., Riethmüller, G., Subklewe, M. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood.* 2014 Januar 26;123(3):356-65
- [150] Stübiger, T., Badbaran, A., Luetkens, T., Hildebrandt, Y., Atanackovic, D., Binder, T. M. C., Fehse, B., Kröger, N.; 5-azacytidine promotes an inhibitory T-cell phenotype and impairs immune mediated antileukemic activity. *Mediators of Inflammation.* 2014; 2014:418292
- [151] Gang, A. O., Frosig, T. M., Brimnes, M. K., Lyngaa, R., Treppendahl, M. B., Gornbaek, K., Dufva, I. H., Straten, P. T., Hadrup, S. R.; 5-azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer Journal.* 2014 March 28;4(3):e197
- [152] Constantini, B., Kordasti, S. Y., Kulasekaraj, A. G., Jieang, J., Seidl, T., Abellan, P. P., Mohamedali, A., Thomas, N. S. B., Farzaneh, F., Mufti, G. J. The effects fo 5-azayttidine on the function and number of regulatory T-cells and T-effectors in Myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2013 Aug,98(8):1196-205
- [153] Niu, C., Li, M., Zhu, S., Chen, Y., Zhou, L., Xu, D., Li, W., Cui, J., Liu, Y., Chen, J.; Decitabine inhibits gamma delta T cell cytotoxicity by promoting KIR2DL2/3 expression. *Frontiers in Immunology.* 2018; 9:617
- [154] Zhang, Z., He, Q., Tao, Y., Guo, J., Xu, F., Wu L. Y., Z. Y.-S., Wu, D., Zhou, L.-Y., Su, J.-Y., Song, L.-X., Xiao, C., Li, X., Chang, C.-K., Decitabine treamtent sensitizes tumor cells to T-cell-mediated cytotoxicity in patients with myelodysplastic syndromes. *American Journal of translational Research.* 2017; 9(2):454-465
- [155] Son, C.-H., Lee, H.-R., Koh, E. -K., Shin, D.-Y., Bae, J.-H., Yang, K., Park, Y.-S.; Combination treatment with decitabine and ionizing radation enhances tumor cells susceptibilty of T cells. *Scientific Repors. Nature Research.* 2016; 6:32470
- [156] Li, B., Zhu, X., Sun, L., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Ye, Z.; Induction of a specific CD8+ T-cell response to cancer/testis antigens y demethylating pre-treatmnet against osteosarcoma. *Ocotarget.* 2014 Nov; 5(21):10791-10802
- [157] Riccadonna, C., Maroun, C. Y., Vuillefroy de Silly, R., Boehler, M., Tardon, M. C., Jeliger, S., Taverna, P., Barba, L., Marinari, E., Pellegatta,, S., Basso E. Y., Martinvalet, D., Dietrich, P.-Y., Walter, P. R.; Decitabine treatment of glioma-initiatin gcells enhances immune recognition dnd killing. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0162105
- [158] Lucarini, V., Buccione, C., Ziccheddu, G., Peschiaroli, F., Sestili, P., Puglisi, R., Mattia, G., Zanetti, C., Parolini, I., Bracci, L., Macchia, I., Rossi, A., D'urso, M. T., Macchia, D., Spada, M., De Ninno, A., Geradino, A., Mozetic, P., Trombetta, M., Rainer, A., Businaro, L., Schiavoni, G., Mattei, F. Combinin type I interferons and 5-aza-2'-Deoxycytidine to improve anti-tumor response against melanoma. *Journal of investigative Dermatology.* 2017 Jan;137(1):159-169
- [159] Héninger, E., Krueger, T. E. G., Lang, J. M.; Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6:29
- [160] Kopp, L. M., Ray, A., Denman, C. J., Senyukov, V. S., Somanchi, S. S., Zhu, S., Lee, D. L. Decitabine has bisphasic effect on natural killer cell viability, phenotype and function under proliferative conditions. *Molecular Immunology.* 2013 Jul;54(3-4):296-301
- [161] Kehrmann, J., Tatura, R., Zeschngk, M., Probst-Kepper, M., Geffers, R., Steinmann, J., Buer, J. Impact of 5-aza-2'-deoxycytidine and epigallocatechin-3-gallate for ainduction of human regulatory T cells. *Immunologyy.* 2014 Jul; 142(3):384-395
- [162] Wang, X., Wang, J., Yu, Y., Ma, T., Chen, P., Zhou, B., Tao, R. Decitabine inhibits T cell proliferation via a novel TET2 dependent mechanism an dexerts potent protective effect in mouse auto- and allo-immunity models. *Oncotarget.* 2017 Aug 22;8(34):56802-56815

- [163] Vasu, S., He, S., Cheney, C., Gopalakrishnan, B., Mani, R., Lozanski, G., Mo, X., Groh, V., Wthiman, S. P., Konopitzky, R., Kössl, C., Bucci, D., Lucas, D. M., Yu, J., Caligirui, M. A., Blum, W., Adam, P. J., Borges, E., Rueter, B., Heider, K.-H., Marcucci, G., Muthusamy, N.; Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood*. 2016 Jun 9;127(23):2879-89
- [164] You, L., Han, Q., Zhu, L., Zhu, Y., Bao, C., Yang, C., Lei, W., Qian, W. Decitabine-mediated epigenetic reprogramming enhances anti-leukemia efficacy of CD123-targeted chimeric antigen receptor T-cells. *Frontiers in Immunology*. 2020 Aug 18;11:1787
- [165] Duperrier, K., Velten, F. W., Bohlender, J., Demory, A., Metharom, P., Goerdt, S. immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes. *Molecular Immunology*. 2005 Aug;42(12):1531-40
- [166] Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. Interleukin (IL-6) immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018 ASug; 10(8):a028456
- [167] Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 2016 Jul; 8(8):959-70
- [168] Rodrigues de Almeida, A., Tavares Dantas, A., Pereira, M. C., Ferraz Cordeiro, M., Guimaraes Goncalves, R. S., Barreto de Melo Rego, M. J., Da Rocha Pitta, I., Pinto Duarte A. L. B., Da Rocha Pitta, M. G. Dexamethasone inhibits cytokine production in PBMC from systemic sclerosis patients. *Inflammopharmacology*. 2019 Aug; 27(4):723:730
- [169] Chen, H., Wang, F., Zhang, P., Z. Y., Chen, Y., Fan, X., Cao, X., Liu, J., Yang, Y., Wang, B., Lei, B., Gu, L., Bai, J., Wie, L., Zhang, R., Zhuang, Q., Zhang, W., Zhao, W., He, A. Management of cytokine release syndrome related to CAR-T cell therapy. *Frontiers of Medicine* 13, 610-617(2019)
- [170] Kauer, J., Hörner, S., Osburg, L., Müller, S., Märklin, M., Heitmann, J. S., Zekri, L., Rammensee, H.-G., Salih, H. R., Jung, G. Tocilizumab, but not dexamethasone, prevents CRS without affecting antitumor activity of bispecific antibodies. *Journal for Immunotherapy of cancer*. 2020; 8(1):e000621
- [171] Amgen Inc. Stand Dezember 2020. Link: <https://www.amgenoncology.com/modalities/hlebite.html>.
- [172] Lorenczewski G., Friedrich, M., Kischel, R., Dahlhoff, C., Anlahr, J., Balazs, M., Rock, D., Boyle, M. C., Goldstein R., Coxon, A., Chapman-Arvedson, T. Generation of a half-life extended anti-CD19 BiTE® antibody construct compatible with once-weekly dosing for treatment of CD19-positive malignancies. 625. *Blood* (2017) 130 (Supplement1):2815
- [173] Arvedson, T. L., Balazs, M., Bogner, P., Black, K., Graham, K., Henn, A., Friedrich, M., Hoffmann, P., Kischel, R., Kufer, P., Lutterbues, R., Muenz, M., Raum, T., Rattel, B., Rex, K., Rock, D., Thomas, O., Wahl, J., Wolf, A., Coxon, A. Generation of half-life extended anti-CD33 BiTE® antibody constructs compatible with once-weekly dosing [abstract]. In: *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2017;77(13 Suppl):Abstract nr 55. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-55*
- [174] Onkopedia. Leitlinien. AML. Autoren: Röllig, C., Beelen, D. W., Braess, J., Greil, R., Heuser, M., Manz, M. G., Passweg, J., Reinhardt, D., Schlenk, R. F. Fassung: Januar 2021, Stand: Okt. 2021 Link: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html#head-disclosure-conflicts>
- [175] Dacogen. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Janssen Pharmaceutica. Stand: November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dacogen-epar-product-information_de.pdf
- [176] Vidaza. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Celgene Distribution B. V. Pharmazeutischer Unternehmer: Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG. Stand: November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vidaza-epar-summary-public_de.pdf
- [177] Cytarabin. Fachinformation. Hersteller: Accord Healthcare Limited (2018). Stand: November 2021: Links: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dacogen-epar-product-information_de.pdf
- [178] Rydapt. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Novartis Pharma GmbH. Stand: November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/rydapt-epar-product-information_en.pdf

- [179] Mylotarg. Fachinformation. Hersteller: Pfizer Europe MA EEIG (2020). Stand: November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/rydapt-epar-product-information_en.pdf
- [180] Venclyxto. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG. Stand: November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/venclyxto-epar-product-information_de.pdf
- [181] Daurismo. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Pfizer Europe MA EEIG. Stand November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/daurismo-epar-product-information_de.pdf
- [182] Xospata. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Astellas Pharma Europe B.V. Stand November 2021: Link: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xospata-epar-product-information_en.pdf
- [183] Tibsovo. Produktinformation. Hersteller: Agios Pharmaceuticals, Inc. (2019). Stand November 2021. Link: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211192s001lbl.pdf
- [184] Melphalan. Fachinformation. Hersteller: Ratiopharm GmbH (2019). Stand November 2021. Link: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Melphalan-ratiopharm%2050%20mg%20Pulver%20und%20Losungsmittel%20zur%20Herstellung%20einer%20Injektions-%20bzw.%20Infusionslosung%20-%204.pdf?pzn=14287910>
- [185] Vesanoid. Fachinformation. Hersteller: Cheplapharm Arzneimittel GmbH (2017). Stand: November 2021. Link: <https://www.apotheken-umschau.de/medikamente/beipackzettel/vesanoid-10-mg-weichkapseln-756696.html>
- [186] Trisenox. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Teva Pharmaceuticals Europe B. V. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/trisenox-epar-product-information_de.pdf
- [187] Daunoblastin. Fachinformation. Hersteller: Pfizer Pharma GmbH (2021). Stand November 2021. Link: <https://www.pfizer.de/sites/default/files/FI-2977.pdf>
- [188] Etoposid. Gebrauchsinformation. Hersteller: Salutas Pharma GmbH, ein Unternehmen der Hexal AG (2010). Stand November 2021. Link: <https://www.gelbe-liste.de/produkte/beipackzettel/Etoposid-400-mg-HEXAL-Konzentrat-zur-Herstellung-einer-Infusionsloesung-20-mg-ml.pdf/c9de4b59-0cbd-442f-8b1f-164d7b87a0e6>
- [189] Siklos. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Delpharm Lille. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/siklos-epar-product-information_de.pdf
- [190] Novantron. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Hexal AG. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/documents/referral/novantrone-article-30-referral-annex-iii_de.pdf
- [191] Xaluprine. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Mias Pharma Limited. Pharmazeutischer Unternehmer: Nova Laboratories Ireland Limited. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/xaluprine-epar-product-information_de.pdf
- [192] Nexavar. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Bayer AG. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nexavar-epar-product-information_de.pdf
- [193] Idhifa. Produktinformation. Hersteller: Celgene Corporation. Stand: November 2021. Link: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/209606s002lbl.pdf
- [194] Zavedos. Fachinformation. Hersteller: Pfizer Pharma GmbH (2021). Stand: November 2021. Link: <https://www.pfizer.de/sites/default/files/6985.pdf>
- [195] Revlimid. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Celgene Distribution B. V., Pharmazeutischer Unternehmer: Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG. Stand: November 2021. Link: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/revlimid-epar-product-information_de.pdf
- [196] Ossenkoppele, G. J., Breems, D. A., Stuessi, G., van Norden, Y., Bargetzi, M., Biemond, B. J., von dem Borne, P. A., Chalandon, Y., Cloos, J., Deeren, D., Fehr, M., Gjertsen, B., Graux, C., Huls, G., Janssen, J. J., J., W., Jaspers., A., Jongen-Lavrencic, M., de Jongh, E., Klein, S. K., van der Klift, M., van Marwijk Kooy, M., Maertens, J., Michaux,

L., van der Poel, M. W. M., van Rhenen, A., Tick, L., Valk, P., Vekemans, M. C., van der Velden, W. J. F. M., de Weerdt, O., Pabst, T., Manz, M., Löwenberg, B.. Lenalidomide added to standard intensive treatment for older patients with AML and high-risk MDS. *Leukemia* 34, 1751-1759. 2020.

[197] Vyxeos. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Jazz Pharmaceuticals Ireland Ltd. Stand: November 2021. Link:

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vyxeos-liposomal>

[198] Schmid, C., Kolb, H.-J. Die allogene Stammzelltransplantation im Therapiekonzept der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klein* 2007;102:317-23 (Nr.4)

[199] Kolb, H.-J., Mittermuller, J., Clemm C., Holle, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;75:555-62)

[200] Horowitz, M., Gale, R., Sondel, P. M., Goldman, J., Kersey J., Kolb H.-J., Rimm, A., Ringdén, O., Rozman, C., Speck, B., Truitt, R., Zwaan, F., Bortin, M. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.

[201] Thol, F. Was ist gesichert in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie? *Internist* 2019. 60:1240-1250

[202] Marijt W. A., Heemskerk M. H., Kloosterboer F., Goulmy, E., Kester, M., van der Hoorn, M., van Luxemburg-Heys, S., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J., van Rood, J., Willemze, R., Falkenburg, J. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens Ha1- or HA-2-specific T-Cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 2003;100:2742-7

[203] Daver, N., Alotaibi, A. S., Bücklein, V., Subklewe, M. T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments. *Leukemia* 2021. 35:1843-1863

[204] Revlimid. Produktinformation. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. Hersteller: Bristol-Myers Squibb Pharma. Stand: April 2022:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjxgqis7sD3AhW6SvEDHWSrBbYQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.ema.europa.eu%2Fdocuments%2Fproduct-information%2Frevlimid-epar-product-information_de.pdf&usg=AOvVaw2nSGjp7oe6SyBxauzAbgRV

[205] Augsberger, C., Hänel, G., Xu, W., Pulko, V., Hanisch, L. J., Augustin, A., Challier, J., Hunt, K., Vick, B., Tovatti, P. E., Krupka, C., Rothe, M., Schönle, A., Sam, J., Lezan, E., Ducret, A., Ortiz-Fraanyuti, Walz, A.-C., Benz, J., Bujotzek, A., Lichtenegger, F. S., Gassner, Ch., Carpy, Al., Lyamichev, V., Patel, J., Konstandin, N., Tunger, A., Schmitz, M., von Bergwelt-Baildon, M. von, Spiekermann, K., Vago, L., Jeremias, I., Marrer-Berger, E., Umana, P., Klien, Ch., Subklewe, M. Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody. *Blood*. 2021 Dec 23;138(25):2655-2669

[206] Duell, J., Dittrich, M., Bedke, T., Mueller, T., Eisele, F., Rosenwald, A., Rasche, L., Hartmann, E., Dandekar, T., Einsele, H., Topp, M. S. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia*. 2017 Pct;31(10):2181-2190

[207] Hopp, J., Hornig, N., Zettlitz, K. A., Schwarz, A., Fuss, N., Müller, D., Kontermann, R. E. The effects of affinity and valency of an albumin-binding domain (ABD) on the half-life of a single-chain antibody-ABD fusion protein. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2010 Nov;23(11):827-34

VIII Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 12: Abbildungsverzeichnis

| Abkürzung | Bezeichnung |
|-----------------|---|
| ADC | Antikörper-Medikamenten-Konjugate |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| BCL | B-Cell-Lymphoma |
| BCMA | B-Zell Maturation Antigen |
| BET | Bromodomain and Extra-terminal motif protein |
| BiKE® | Bispezifischer Killer-Cell-Engager |
| BiTE® | Bispezifischer T-Zell-Engager |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| BZ | B-Zellen |
| c-KIT | Stammzellfaktor-Rezeptor |
| CAR-T-cells | Chimeric antigen receptor T cells |
| CBA | Cytometric Bead Array |
| CCL1 | Human C-type lectin-like molecule-1 |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CiTE® | Checkpoint inhibitory T-Zell-Engager |
| CLDN18.2 | Tight junction molecule claudin 18 isoform 2 |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| CMR | Chromosome Region Maintenance Gen |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CRS | Cytokine Release Syndrome |
| CTLA4 | Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4 |
| DART® | Dual Affinity Re-Targeting-Konstrukte |
| DLL3 | Delta like canonical notch ligand 3 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide |
| DNA/DNS | Deoxyribonucleinsäure |
| DOT | Disruptor of Telomeric Silencing |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| DZ | Dendritische Zellen |
| EPHA-3 | EPO-produzierender humaner Tyrosinkinase-Rezeptor |
| E/T ratio | Effektor-/Targetzellen-Verhältnis |

| Abkürzung | Bezeichnung |
|-----------|--|
| Et al. | Et alia |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FAS | Fas Cell Surface Death receptor |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FLT3 | FMS-like Tyrosine kinase 3 |
| G-CSF | Granzlozyten-Stimulationsfaktor |
| GO | Gemtuzumab-Ozogamicin |
| GZ | Granulozyten |
| HALB | Humanes Albumin |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HER2 | Human epidermal Growth factor receptor 2 |
| HLA-A2 | Human Leukocyte antigen A2 |
| HLE-BiTE® | Half-life-extended BiTE® |
| HSC | Hämatopoetische Stammzellen |
| IDH | Isocitrat-Dehydrogenase |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| ITD | Internal Tandem Duplication |
| KM | Knochenmark |
| LSD | Lysine-specific Demethylase |
| LZ | Lymphozyten |
| MAS | Macrophage Activation Syndrome |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MLL | Mixed line Leukemia |
| MM | Multiple Myelom |
| MUC17 | Membrane-bound Mucin-Gen 17 |
| MZ | Monozyten |
| NBM | Normales Knochenmark |
| NKZ | Natürliche Killerzellen |
| PBD | Pyrrlobenzodiazepine |
| PBMC | Peripheral Blood mononuclear cell |
| PD1 | Programmed Cell-Death Protein |
| PDGFRβ | Platelet Derived Growth Factor Receptor beta |
| PSMA | Prostata-spezifisches Membran-Antigen |
| RB1 | Retinoblastoma Protein1 |
| RNA/RNS | Ribonucleinsäure |

| Abkürzung | Bezeichnung |
|--------------------------|---|
| SIRS | Systemic inflammatory response syndrome |
| SMO | Smoothed Protein |
| PLK1 | Serine/Threonine-Proteinkinase1 |
| Rpm | Round per minutes |
| RT | Raumtemperatur |
| Tim3 | T-Zell Immunoglobulin und Mucin domain-containing protein 3 |
| T _{reg} -Zellen | Regulatorische T-Zellen |

| Abkürzung | Bezeichnung |
|------------------|---|
| TET2 | Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 2 |
| THZ | T-Helfer-Zellen |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TriKE® | Trispezifischerer Killer-Engager |
| TZ | T-Zellen |
| VEGF | Vaskular Endothelial Growth factor |
| WT1 | Wilms Tumor Protein 1 |

IX Anlagen

1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Isolation mononukleärer Zellen aus Knochenmark oder Vollblut | 19 |
| Abbildung 2: Schematische Abbildung der Herstellung eines MS5-Nährboden für AML-Blasten..... | 20 |
| Abbildung 3: Schematische Abbildung des Versuchaufbaus Expression von Oberflächenantigenen durch immunmodulierende und zytoreduktive Substanzen. | 24 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus Expression von Oberflächenantigenen durch Dexamethason oder Tocilizumab | 25 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus Charakterisierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 unter Einfluss von zytoreduktiven und immunmodulierenden Substanzen. | 25 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus: Charakterisierung des CD3/CD33 BiTE® AMG 330 unter Einfluss von Dexamethason oder Tocilizumab. | 26 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus, Charakterisierung des AMG 330 und seiner halbwegszeitverlängerten Konstrukten..... | 27 |
| Abbildung 8: Durchflusszytometrische Auswertung am Beispiel zur Bestimmung der T-Zellen und der CD33+ AML Blasten. Bild A: X-Achse: FSC; Y-Achse: SSC. Bild B: MFI der 7-AAD Färbung; Bild C: Isotypkontrolle; X-Achse: CD33+; Y-Achse: CD2+. Bild D: Gefärbte Probe; X-Achse CD33+; Y-Achse: CD2+ | 27 |
| Abbildung 9: Histogramm der CFSE-Färbung der CD2+ T-Zellen | 27 |
| Abbildung 10: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5. | 29 |
| Abbildung 11: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=13 | 30 |
| Abbildung 12: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Azacytidine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE®AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=3-7..... | 30 |
| Abbildung 13: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Decitabine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD2+ fold change der T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. n=3 | 30 |
| Abbildung 14: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: CD33+ fold change der AML-Blasten. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5. | 31 |
| Abbildung 15: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in verschiedenen E/T ratios. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML Blasten in Prozent. Darstellung mit Median. Bild 1: 1:1 E/T ratio; n=3. Bild 2: 1:3 E/T ratio; n=5. Bild 3: 1:4 E/T ratio; n=5. | 31 |
| Abbildung 16: Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Lenalidomid-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=13..... | 32 |

- Abbildung 17:** Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Azacytidine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=3-7..... 32
- Abbildung 18:** Einfluss nach dreitägiger Inkubation von gesunden Spender-T-Zellen mit HL60-Zellen mit unterschiedlichen Decitabine-Konzentrationen (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-Antikörper (A) auf die Proliferation (Bild 1) bzw. auf die Spezifische Lyse (Bild 2) der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Bild 1: CD33+ fold change der AML-Blasten; Bild 2: Spezifische Lyse in %. Darstellung mit Median und Range. n=3..... 33
- Abbildung 19:** Metrische Darstellung der Messwerte unter linearer Regressionsanalyse. Bild 1: Lenalidomid, n=13; Bild 2: Azacytidine, n=7; Bild 3: Decitabine, n=3. X-Achse: Konzentration der einzelnen Substanzen in µM. Y-Achse: Fold change der CD2+ T-Zellen. 34
- Abbildung 20:** Metrische Darstellung der Messwerte unter linearer Regressionsanalyse. Bild 1: Lenalidomid, n=13; Bild 2: Azacytidine, n=7; Bild 3: Decitabine, n=3. X-Achse: Konzentration der einzelnen Substanzen in µM. Y-Achse: Fold change der CD33+ AML-Blasten. 34
- Abbildung 21:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=9-21. 35
- Abbildung 22:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach 6 Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7 35
- Abbildung 23:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse; Darstellung 1: fold change der CD33+ AML Blasten Y-Achse; Darstellung 2: Population der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. N=9-21. 36
- Abbildung 24:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse; Darstellung 1: fold change der CD33+ AML Blasten Y-Achse; Darstellung 2: Population der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach sechs Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7 36
- Abbildung 25:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: spezifische Lyse der CD33+ AML Blasten in Prozent. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=9-21. 37
- Abbildung 26:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in Prozent. Darstellung mit Median. Bild 1: Messung nach drei Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 2: Messung nach sechs Tagen Inkubation; n=3-7. Bild 3: Messung nach 14 Tagen Inkubation; n=3-7 37
- Abbildung 27:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit Tocilizumab oder Dexamethason (s. Symbolleiste) mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 (B) oder mit dem Kontroll-BiTE® (A) auf die Sekretion von Zytokinen an unterschiedlichen Messzeitpunkten. X-Achse: s. Symbolleiste, gruppiert in Ergebnissen der Messtage 1-6 und 14. Y-Achse: Konzentration der Zytokine in pg/ml. Darstellung mit Median. n=1-4 38
- Abbildung 28:** Einfluss von immunmodulierenden und zytoreduktiven Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD157 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold

- change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3 39
- Abbildung 29:** Einfluss von immunmodulierenden Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD33 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3 40
- Abbildung 30:** Einfluss von immunmodulierenden Substanzen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD123 auf verschiedenen AML-Zelllinien. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der MFI-Ratio in Darstellung mit Median. Die rote Linie stellt den fold change mit dem Wert 1 dar – über dieser Linie hat die Expression zugenommen; unter dieser Linie hat die Expression abgenommen. n=3 41
- Abbildung 31:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB(B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD2+ T-Zellen. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD2+ T-Zellen. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=7 42
- Abbildung 32:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die Proliferation der CD33+ AML-Blasten. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: fold change der CD33+ AML-Blasten. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an vier Messzeitpunkten: Tag 3, 6, 9 und 14. n=7 42
- Abbildung 33:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median und Range. Zusammenfassende Ergebnis an drei Messzeitpunkten: Tag 3, 6 und 14. n=7 43
- Abbildung 34:** Einfluss von Patientenproben unter in vitro-Therapie mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330, HLE-BiTE® Crossbody und HLE-BiTE® HALB (B) oder mit dem jeweiligen Kontroll-BiTE® (A) auf die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. X-Achse: s. Beschreibung der Abbildung und Symbolleiste; Y-Achse: Spezifische Lyse der CD33+ AML-Blasten in %. Darstellung mit Median und Range. Bild 1 -4 zeigen die jeweiligen Messwerte von Tag 3, 6, 9 und 14. n=7 43

2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Eingesetzte Medikamente in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie | 3 |
| Tabelle 2: Definierte und mögliche Targets bei AML..... | 9 |
| Tabelle 3: Medien, Chemikalien, Reagenzien und Zusätze..... | 14 |
| Tabelle 4: Geräte, Zubehör und Computerprogramme | 15 |
| Tabelle 5: Selbsthergestellte Medien und Puffer | 16 |
| Tabelle 6: Kits..... | 16 |
| Tabelle 7: Zelllinien | 17 |
| Tabelle 8: Humanes Zellmaterial | 17 |
| Tabelle 9: Antikörper und weitere Substanzen für Färbungen..... | 18 |
| Tabelle 10: AMG 330 - Bispezifischer BiTE® Antikörper, modifizierte halbwertszeitverlängernde Konstrukte und Negativkontrollen | 18 |
| Tabelle 11: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse..... | 34 |
| Tabelle 12: Abbildungsverzeichnis..... | 68 |

3 Danksagungen

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mit zu dieser Doktorarbeit beigetragen. Hervorheben möchte ich hier natürlich zunächst Prof. Dr. Hiddemann, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, und natürlich seinem Nachfolger Prof Dr. Dr. Michael von Bergwelt, die mir die Möglichkeit gaben, in Ihrer Klinik meiner Promotionstätigkeit nachzugehen.

Danken möchte ich *Amgen Inc.*, die mir die Möglichkeit gaben, mit dem CD3/CD33 BiTE® AMG 330 spannende Forschungsfragen bei einem vielversprechenden Immuntherapeutikum zu stellen und anzuwenden.

Ein weiteres Dankeschön gilt Dr. Roman Lang, der mir mit Hilfe seiner massenspektrometrischen Messungen an einem kritischen Punkt der Doktorarbeit weitergeholfen hat.

Ein großes Dankeschön gilt selbstverständlich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Marion Subklewe, die mich in Ihre Arbeitsgruppe aufnahm und mir verhalf, die Grundlagen der medizinischen Forschung zu erlernen und anzuwenden und mir die Teilnahme an dem Förderungsprojekt des Bayrischen Elitenetzwerkes i-Target ermöglichte.

Dies wäre allerdings ohne die unermüdliche Unterstützung von Frau Dr. biol. Christina Krupka nicht möglich gewesen. Sie hat mit ihrem Fachwissen, Projektmanagement und stets offenem Ohr wesentlich zu dieser Doktorarbeit beigetragen.

Der Laboralltag wäre aber selbstverständlich nicht möglich gewesen ohne all die Menschen in der Arbeitsgruppe: Kerstin Lämmermann, Lavina Pachzelt, Christian Augsburg, Maurine Rothe, Veit Bücklein und viele mehr. Zudem möchte ich den MTRAs aus dem Labor für Leukämediagnostik danken, die für uns die Blut- und Knochenmarkspenden der Patienten aufbereiteten.

Vielen Dank ebenso an alle fleißigen und tapferen gesunden Blutspender, die mir ihr körpereigenes Material zur Isolierung der T-Zellen zur Verfügung gestellt haben.

Unterstützung in allen Lebenslagen haben mir natürlich auch meine langjährige Freundin, Lilian Tschom, und mein Partner, Ralph Graubner, gegeben.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Vater, Dieter Platzer, danken, zunächst dass er in mir schon von klein auf das Interesse an der Forschung weckte und mich darin bedingungslos unterstützte. Nicht nur hat er mir zusammen mit seinem Arbeitskollegen und Familienfreund, Klaus Zorn-Pauly - dem ebenso mein Dank gebührt - bei statistischen Fragestellungen geholfen, sondern steht mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite.

4 Curriculum vitae

5 Publikationen

Poster CIMT 2016: Cytoreductive and Immunomodulatory drugs influence bispecific CD33/CD3 BiTE[®] antibody construct (AMG 330) mediated cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia (AML); Platzer et al.; CIMT Annual Meeting 2016, Mainz

Poster ASH 2016: Steroids Abrogate BiTE[®] Antibody Construct-Mediated Cytotoxicity in Primary AML Cells; Krupka C., Lindl B., Köhnke T., Platzer J., Pachzelt L., Lichtenegger FS., Altmann T., Kufer P., Kischel R., Hiddemann W., Subklewe M.; ASH Annual Meeting 2016, San Diego