

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Identifikation prädiktiver und prognostischer Biomarker für das
Ansprechen von Patienten mit refraktärer oder rezidivierter
Akuter Myeloischer Leukämie auf Therapien mit bispezifischen
T-Zell-Engagern (BiTE®)**

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

vorgelegt von
Jan Wulf

aus
Waiblingen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Marion Subklewe

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Elfriede Nößner

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Sebastian Kobold

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung:	6
Abstract (English):	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
1.1 Akute Myeloische Leukämie.....	13
1.1.1 Epidemiologie.....	13
1.1.2 Diagnostik und Klassifikation.....	14
1.1.3 Prognose	14
1.1.4 Standardtherapie	15
1.1.5 Immuntherapie bei rezidivierter oder refraktärer AML.....	15
1.2 T-Zellen	17
1.2.1 Zytotoxische Anti-Tumor-Aktivität beim Gesunden	18
1.2.2 Immunevasion beim Leukämie-Patienten	18
1.3 Bi-specific T-cell Engager (BiTE®).....	19
1.3.1 Das Oberflächenantigen CD33	20
1.3.2 AMG 330	20
1.3.3 AMG 673	21
2. Fragestellung und Hypothese	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Laborgeräte	23
3.1.2 Computerprogramme	24
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	24
3.1.4 Medien und Chemikalien.....	25
3.1.5 FACS-Antikörper, Isotypkontrollen und Lebend-Tot-Farbstoff	25
3.1.6 Tumorzelllinie MOLM-13	26
3.1.7 Experimentelle bispezifische Antikörper AMG 330r3 DS und cBiTE.....	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Im LMU-Klinikum erhobene Daten	27
3.2.1.1 Patientenrekrutierung und Kollektion von Biomaterial.....	28
3.2.1.2 Erfassung klinischer Daten.....	30
3.2.1.3 Durchflusszytometrie und Immunmonitoring	30
3.2.1.4 Definition von Therapieansprechen.....	35
3.2.2 Im Genzentrum der LMU durchgeführten Arbeiten	36
3.2.2.1 Zellzählung	36
3.2.2.2 Kultivierung von MOLM-13.....	37
3.2.2.3 Gewinnung und Kryokonservierung von PBMC	37

3.2.2.4	Magnetische Isolation von T-Zellen.....	39
3.2.2.5	Färbung der Zellmembran von T-Zellen.....	40
3.2.2.6	BiTE-vermittelte Experimente zur Untersuchung der zytotoxischen und proliferativen Kapazität von Patienten-T-Zellen	41
3.2.2.7	Bead-vermittelte Experimente zur Untersuchung der proliferativen Kapazität von Patienten-T-Zellen.....	42
3.2.2.8	(Antikörper-) Färbungen und durchflusszytometrische Messungen.....	42
3.2.2.9	Cytometric Bead Array (CBA) und Messung mittels Durchflusszytometrie.....	44
3.2.3	Datenverarbeitung und Statistik	45
4.	Ergebnisse	51
4.1	Kohorten-Eigenschaften.....	51
4.2	Therapieansprechen	53
4.3	Ergebnisse aus klinisch erhobenen Daten im Therapieverlauf.....	54
4.3.1	Daten aus der Routine-Hämatologie	54
4.3.2	Effektor- zu Target-Ratio im Knochenmark	57
4.3.3	Daten aus der Routine-Serumchemie	58
4.3.4	Daten aus den im Immunmonitoring mittels BiTE-Panel durchflusszytometrisch erhobenen Messungen.....	59
4.4	Ergebnisse aus experimentell erhobenen Daten	64
4.4.1	BiTE-vermittelte Aktivität von T-Zellen	64
4.4.1.1	Konzentrationsfindung des experimentellen BiTEs.....	64
4.4.1.2	Analyse der Zytotoxizität von T-Zellen	65
4.4.1.3	Analyse der Proliferation von T-Zellen	67
4.4.1.4	Analyse der Zytokin-Konzentrationen in den Medium-Überständen.....	69
4.4.2	Bead-vermittelte Proliferation von T-Zellen	70
5.	Diskussion	72
5.1	Unterschiede bei der Quantifizierung und Charakterisierung von T-Zellen und Myeloblasten vor Therapiestart	73
5.1.1	Responder zeigen vor Therapiestart eine höhere Effektor-zu-Target-Ratio, jedoch nicht erhöhte absolute T-Zell-Zahlen.....	73
5.1.2	Tendenz zur besseren Funktionalität von T-Zellen <i>in vivo</i> von Respondern vor Therapiestart	74
5.1.3	Unspezifische Verteilung von T-Zell-Subsets und Oberflächen-Markern auf T-Zellen vor Therapiestart	75
5.1.4	Quantifizierung von Myeloblasten und Expression von CD33 und PD-L1 auf Myeloblasten vor Therapiestart	75
5.2	Tumorlast und Krankheitsfortschritt vor Therapiestart als prädiktive Biomarker für das Therapieansprechen.....	76
5.3	Veränderungen von T-Zellen und Myeloblasten im Therapieverlauf.....	77
5.3.1	Erhöhte E:T-Ratios im peripheren Blut und Knochenmark bei Respondern <i>in vivo</i> im Therapieverlauf.....	77
5.3.2	Veränderung von T-Zell-Subsets und Oberflächenmarkern auf T-Zellen <i>in vivo</i> im Therapieverlauf	78
5.3.3	Proliferation und Zytotoxizität von T-Zellen <i>in vitro</i> nehmen im Therapieverlauf ab	79
5.3.4	Veränderung von CD33 und PD-L1 auf Myeloblasten <i>in vivo</i> im Therapieverlauf ..	80
5.4	Ausblick: Beeinflussung des Therapieerfolges.....	81
	Literaturverzeichnis.....	84

Anhang: Patienteninformation	89
Danksagung	95
Affidavit	96
Publikationsliste	97

Zusammenfassung:

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) stellt eine bösartige Neubildung in der myeloischen hämatopoetischen Linie dar. Die Standardbehandlung umfasst die Induktionschemotherapie, gefolgt von entweder einer Konsolidierungschemotherapie oder einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Trotz dieser Bemühungen zeigen bis zu 40% der neu diagnostizierten AML-Patienten eine refraktäre Erkrankung gegenüber der Erstbehandlung, ein ähnlicher Prozentsatz der transplantierten AML-Patienten erlebt einen Rückfall während der Remission. Die Immuntherapie erweist sich als vielversprechender Ansatz für diejenigen, die einen Rückfall oder eine refraktäre Erkrankung aufweisen und bietet Hoffnung für Patienten, die sich einer Stammzelltransplantation nicht unterziehen können. Ein Durchbruch in diesem Bereich ist die Entwicklung von bispezifischen T-Zell-Engager (*Bi-specific T-Cell Engager*, BiTE®)-Molekülen. Diese BiTEs, bestehend aus zwei verbundenen Antikörperfragmenten, die sich gegen CD3 und CD33 richten, lenken die T-Zellen des Patienten auf CD33-positive Leukämiezellen um. Sobald sich eine T-Zelle in unmittelbarer Nähe zu einer Leukämiezelle befindet, erfolgt die Aktivierung durch den BiTE, unabhängig von der Präsentation von Tumorantigenen auf den Molekülen des Hauptgewebekompatibilitätskomplexes. Auf diesem Weg können nahezu alle T-Zellen eines Patienten rekrutiert werden. Die Aktivierung einer T-Zelle führt zu Proliferation und Differenzierung, während die Hochregulierung von Perforinen, Granzymen und Zytokinen der T-Zelle Effektorfunktionen verleiht. Durch die Ausschüttung von Perforinen erzeugen T-Zellen Poren in der Zellmembran von Leukämiezellen, durch welche Granzyme eindringen und den Zelltod der leukämischen Zielzellen hervorrufen. Anti-CD3/-CD33 BiTEs wie AMG 330 und dessen Halbwertszeit-verlängerter Abkömmling AMG 673 zeigten in ihren Phase-1-Studien, trotz vielversprechender präklinischer Ergebnisse, signifikante Prozentsätze von nicht-ansprechenden Patienten (*Non-Responder*). In dieser Dissertation sollen die Mechanismen und Unterschiede zwischen den T-Zellen von Therapie-Ansprechern (*Responder*) und Non-Respondern bei der Abtötung von Leukämiezellen aufgedeckt werden. Weiterhin soll nach prädiktiven Biomarkern für ein Therapieansprechen gesucht, sowie potenzielle Behandlungsansätze zur Verbesserung der Responder-Rate aufgezeigt werden. Eine Untergruppe von Patienten aus beiden klinischen Studien mit AMG 330 und

AMG 673 wurde hierzu hinsichtlich klinisch-laborchemischer Parameter untersucht. Für Zellkultur-Experimente wurden T-Zellen aus Blutproben der Patienten isoliert und in Gegenwart von BiTEs zusammen mit AML-Zelllinien oder CD3/CD28-Beads kultiviert, um funktionelle Ergebnisse vor und während der Behandlung mit AMG 330 oder AMG 673 zu beurteilen. Responder zeigten vor der Einleitung der Therapie mit BiTEs signifikant erhöhte Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnisse mit hohen T-Zell-Zahlen und geringem Anteil an Leukämiezellen. Die höhere leukämische Belastung bei Non-Respondern spiegelte sich in signifikant erhöhten Laktat-Dehydrogenase-Werten im Vergleich zu Respondern vor der Behandlung wider. Während der Behandlung wurde die Aktivierung der T-Zellen durch die Expression des Oberflächenmarkers CD69 quantifiziert, welche mit der erhöhten Expression von Checkpoint-Inhibitor-Markern wie PD-1, TIGIT, TIM3 und LAG-3 einherging. Dies deutete auf eine Transformation der T-Zellen in Erschöpfungszustände mit verminderten Effektorfunktionen hin, was sich in einem Verlust von proliferativer und zytotoxischer Kapazität äußerte. Hieraus leiten sich folgende potenzielle Therapiemodifikationen ab, die zukünftig eingesetzt werden könnten, um den Behandlungserfolg für BiTE-Therapien zu verbessern: Reduktion von Leukämiezellen oder die Vermehrung von T-Zellen vor BiTE-Gabe, Blockade von inhibierenden oder die Unterstützung aktivierender T-Zell-Signale sowie die Modifikation der T-Zell-Erschöpfung mittels weiterer Methoden, welche bei herkömmlicher BiTE-Therapie mit kontinuierlicher Stimulation der T-Zellen im Verlauf ersichtlich wird.

Abstract (English):

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a malignant neoplasm of the myeloid hematopoietic lineage. The standard treatment consists of induction chemotherapy followed by either lower dose consolidation chemotherapy or hematopoietic stem cell transplantation. However, up to 40% of all newly diagnosed AML patients remain refractory to initial treatment and up to 40% of all transplanted AML patients in remission will eventually relapse. Immunotherapy is a developing therapeutic option for relapsed or refractory patients and provides hope for those being unable to undergo stem cell transplantation. One recent advancement for those patients is the development of Bi-specific T-cell Engager (BiTE[®]) molecules. Consisting of two linked antibody fragments directed against CD3 and CD33, BiTEs can redirect the patient's own T cells to CD33-positive leukemia cells. Once in proximity of a leukemic cell, a T cell will be linked to it and activated via the BiTE. This process is independent of tumor antigen presentation on major histocompatibility molecules and thus T-cell receptor specificity, allowing for recruitment of virtually all patient's T cells. Activation of a T cell results in proliferation and differentiation, while upregulation of perforins, granzymes and cytokines provide T cells with effector functions. By secreting perforins, T cells are able to create pores in the cell membrane of leukemic cells, through which granzymes will enter myeloblasts and ultimately induce their apoptosis. AMG 330 and the half-life extended molecule AMG 673 are anti-CD3/-CD33 BiTEs recently used in phase 1 clinical trials to evaluate for dose-limiting toxicities and adverse events, as well as pharmacokinetics and -dynamics. Despite promising preclinical results, early evaluation in both clinical trials revealed substantial percentages of non-responding patients. This dissertation aims at unveiling the mechanisms and differences underlying Responder's versus non-Responder's T cells in killing leukemic cells, while also searching for biomarkers predicting response and potential ways to enhance treatment. A subgroup of patients treated in either clinical trial was investigated in terms of clinical parameters, laboratory, and advanced hematologic parameters. T cells were isolated from patient blood samples and cocultured in presence of BiTEs with AML cell lines or CD3/CD28 beads in order to assess for functional read-outs before and during treatment with AMG 330 or AMG 673. Responders showed significantly increased Effector- to Target-Ratios with high counts of T cells and low counts of leukemic cells prior to

treatment with BiTEs. The higher leukemic burden of non-Responders was reflected by Lactate Dehydrogenase levels, which were significantly increased compared to Responders prior to treatment. During treatment, activation of T cells was assessed via expression of CD69, which was paralleled with upregulation of surface checkpoint inhibitor markers like PD-1, TIGIT, TIM3 and LAG-3. This suggested transformation of T cells into states of exhaustion characterized by decreased effector functions, which was reflected by loss of proliferative and cytotoxic capacity during treatment. Several possible ideas for future improvements of BiTE therapies are proposed, including reduction of myeloblasts or expansion of T cells prior to BiTE treatment. Blockade of inhibitory or support of activating T-cell signals seems to be a promising approach as it is heavily investigated. Another current milestone is the prevention and slowdown of T-cell exhaustion, which is often accompanied by continuous T-cell stimulation, as seen with BiTEs. Reversing the markers we identified in this small group of patients holds the potential to enhance the effectiveness of future treatments.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Gating-Strategie der T-Zellen	33
Abbildung 3-2: Gating-Strategie der Myeloblasten	34
Abbildung 3-3: Unterscheidung der Zytokine im Dotplot eines CBA-Assays.....	45
Abbildung 3-4: Gating-Strategie in den BiTE-vermittelten Experimenten.....	47
Abbildung 3-5: Proliferations-Analyse von T-Zellen.....	48
Abbildung 4-1: Analyse der Leukozyten und Myeloblasten im peripheren Blut.....	55
Abbildung 4-2: Analyse der Lymphozyten- und T-Zell-Anteile im peripheren Blut	57
Abbildung 4-3: Untersuchung der E:T-Ratio im Knochenmark.....	58
Abbildung 4-4: Untersuchung der CRP- und LDH-Werte	59
Abbildung 4-5: Durchflusszytometrische Untersuchung der PBMC mittels BiTE-Panel....	60
Abbildung 4-6: Verteilung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen im peripheren Blut.....	61
Abbildung 4-7: Verteilung der T-Zell-Subsets in % im peripheren Blut.....	62
Abbildung 4-8: Aktivierungs- und Immun-Checkpoint-Marker auf T-Zellen im peripheren Blut.....	63
Abbildung 4-9: Expression von PD-1, PD-L1 und CD33 im peripheren Blut	64
Abbildung 4-10: Versuchsergebnisse zur Dosisfindung BiTE für Zellkultur-Versuche	65
Abbildung 4-11: Experimentelle Untersuchung zur Zytotoxizität der Patienten-T-Zellen ..	67
Abbildung 4-12: Experimentelle Untersuchung zur BiTE-vermittelten Proliferation von T-Zellen	68
Abbildung 4-13: Detaillierte Analyse der BiTE-vermittelten Proliferation von T-Zellen.....	69
Abbildung 4-14: Zytokin-Konzentration im Medium nach 48 Stunden Ko-Kultur und BiTE in vitro	70
Abbildung 4-15: Experimentelle Untersuchung zur Bead-vermittelten Proliferation von T-Zellen	71
Abbildung 4-16: Detaillierte Analyse der Bead-vermittelten Proliferation von T-Zellen	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Laborgeräte.....	24
Tabelle 3-2: Computerprogramme.....	24
Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3-4: Medien und Chemikalien	25
Tabelle 3-5: FACS-Antikörper und Isotypkontrollen im BiTE-Panel des LfL.....	26
Tabelle 3-6: FACS-Antikörper und Lebend-Tot-Farbstoff im Genzentrum	26
Tabelle 3-7: Unterschiede im Design der klinischen Phase-1-Studien von AMG 330/ 673	28
Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Antikörper-Spezifitäten im BiTE-Panel.....	32
Tabelle 3-9: Eigenständig hergestellte Medien und Lösungen.....	37
Tabelle 3-10: Zentrifugation-Programme	38
Tabelle 4-1: Patientencharakteristika.....	52
Tabelle 4-2: Therapieschemata und Zeitpunkte der Blutentnahmen (BE).....	53
Tabelle 4-3: Therapieansprechen basierend auf prozentualer Abnahme des Myeloblastenanteils im KM-Aspirat im Vergleich vor/nach BiTE-Therapie	54

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Allo-HSZT	Allogene Hematopoetische Stammzelltransplantation
AML	Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AUC	<i>Area under the curve</i>
BiTE	<i>Bispecific T-cell Engager</i>
BE	Blutentnahme
BMMC	<i>Bone Marrow Mononuclear Cell</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
cBiTE	<i>control Bispecific T-cell Engager</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CiTE	<i>Checkpoint Inhibitory T-cell Engager</i>
CM	<i>Central Memory</i>
CR	<i>Complete Remission</i>
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DLI	<i>Donor Lymphocyte Infusion</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
EM	<i>Effector Memory</i>
EMRA	<i>Effector Memory RA-positive</i>
E:T-Ratio	<i>Effector- to Target-Ratio</i> (Effektor- zu Zielzellen-Verhältnis)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
GvL-Effekt	<i>Graft-versus-Leukemia-Effect</i> ("Spender vs. Leukämie" -Effekt)
G/l	Giga pro Liter
HLE	<i>Half-Life Extended</i> (Halbwertszeit-verlängert)
HSZT	Hematopoetische Stammzelltransplantation
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitor

IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IQR	<i>Interquartile Range</i> (Interquartilsabstand)
KM-Ausstrich	Knochenmark-Ausstrich
KMP	Knochenmarkpunktion
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LfL	Labor (Institut) für Leukämiediagnostik
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NR	<i>Non-Responder</i> (Therapie-Nicht-Ansprecher)
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
R	<i>Responder</i> (Therapie-Ansprecher)
SSC-A	<i>Sideward Scatter Area</i>
SSC-H	<i>Sideward Scatter Hight</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Neoplasie der myeloischen Zellreihe. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine rapide Vermehrung funktionsunfähiger leukämischer Zellen (Myeloblasten) mit Verdrängung der gesunden Hämatopoese im Knochenmark. Dies hat häufig eine Thrombozyto- und Granulozytopenie, sowie eine Anämie zur Folge und kann sich in der Klinik durch Störungen der Blutgerinnung, erhöhter Infektneigung und einer (Belastung-) Dyspnoe äußern. Unbehandelt führt eine akute Leukämie in nahezu allen Fällen innerhalb eines Jahres nach den ersten Symptomen zum Tod.(1) Das Rückgrat der AML-Therapie besteht seit mehreren Jahrzehnten aus einer Induktionstherapie mit dem Pyrimidin-Antagonisten Cytarabin und einem Topoisomerase-Hemmer aus der Gruppe der Anthracycline.(2) Trotz intensiver Chemotherapie erreicht nur ein Teil der Patienten im Therapieverlauf eine anhaltende komplette Remission.(3) Die damit einhergehenden hohen Raten an Rezidivkrankungen sind ursächlich für intensive Forschung, mit dem Ziel neue Therapiekonzepte zu identifizieren. In dieser Dissertation wird ein immuntherapeutischer Behandlungsansatz bei der Therapie der rezidivierten oder refraktären AML beleuchtet. Im Speziellen handelt es sich um eine Therapie mit einem bi-spezifischen Antikörper, für dessen Therapieansprechen prädiktive Biomarker identifiziert werden sollen.

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2018 wurden in Deutschland 12180 neu an Leukämie erkrankte Patienten registriert. Leukämien sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen selten, der prozentuale Anteil an allen Krebs-Neuerkrankungen liegt mit 2,3% bei Frauen bzw. 2,6% bei Männern jeweils an der elften Stelle. Bei Frauen lag die Inzidenz für Leukämie mit 12,6 leicht niedriger als bei Männern mit 16,8 pro 100.000 Personen. Das mediane Erkrankungsalter lag bei 74 bzw. 71 Jahren. An allen Leukämie-Neuerkrankungen hatte die AML dabei einen Anteil von 27% bzw. 22%.(4)

1.1.2 Diagnostik und Klassifikation

Zur Untermauerung des Verdachts auf eine akute Leukämie gehören neben Anamnese und körperlicher Untersuchung ein (Differenzial-) Blutbild aus peripher entnommenem Blut. Da bei fehlender Ausschwemmung von Myeloblasten aus dem Knochenmark in das periphere Blut eine Leukozytose ausbleiben kann, muss zur Diagnosesicherung und Therapie-relevanten Subklassifizierung der AML Blut aus dem Knochenmark untersucht werden. Hierfür erfolgt eine Knochenmark-Aspiration mit -Ausstrich für morphologisch-zytologische und eine Knochenmark-Stanzbiopsie für morphologisch-histologische Untersuchungen. Ein Myeloblastenanteil über 20% im Knochenmark bestätigt die Diagnose einer AML. Zusätzlich werden die hämatopoetischen Zellen zytogenetisch und molekulargenetisch untersucht. Der Nachweis bestimmter Chromosomenaberrationen oder Genmutationen wird zur Diagnose und WHO- (*World Health Organization*) Klassifikation der AML herangezogen. Teilweise ist anhand dieser Veränderungen (z.B. Nachweis einer NPM1-Mutation, oder der Nachweis einer t(15;17)) in den aktualisierten Klassifikationssystemen die Diagnose einer AML auch bereits dann zu stellen, wenn weniger als 20% Blasten in der zytomorphologischen Untersuchung nachweisbar sind. Zusätzlich werden die Zellen nach immunphänotypischen Oberflächenmarker (*Cluster of Differentiation*, CD) charakterisiert, wie bspw. nach dem Vorkommen von CD33 auf Myeloblasten.(5)

1.1.3 Prognose

Das mittlere Überleben nach Diagnose einer AML sinkt mit zunehmendem Alter. Während die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei unter 30-jährigen bei 60% liegt, fällt sie bei 55 bis 64-jährigen auf 23% ab, bei 80 bis 84-jährigen liegt sie bei 1%.(6) Zusätzlich sind Komorbidität und ein hoher ECOG- (*Eastern Cooperative Oncology Group*) Performance-Wert (hinweisend auf einen eingeschränkten Allgemeinzustand des Patienten) mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.(7) Ein weiterer Risikofaktor ist das genetische Risikoprofil der Myeloblasten. Die Einteilung erfolgt nach der revidierten Version der *European LeukemiaNet* (ELN) von 2022 in günstig, intermediär und ungünstig.(8)

1.1.4 Standardtherapie

Die primär bei geeigneten Patienten angestrebte, kurative Therapie setzt sich aus einer Induktionstherapie und einer Postremissionstherapie zusammen. Die Induktionstherapie erfolgt nach dem "7+3 Schema" für sieben Tage mit Cytarabin, jeweils an Tag eins bis drei in Kombination mit einem Anthrazyklin. Je nach vorliegenden molekulargenetischen und immunphänotypischen Besonderheiten finden weitere Substanzen Verwendung, bspw. der Protein-Kinase-Inhibitor Midostaurin bei FLT3-Mutation, oder das im Abschnitt 1.1.5 erwähnte Gemtuzumab-Ozogamicin bei CD33-positiver AML.(5) Anschließend wird der Therapieerfolg gemessen. Eine morphologisch komplette Remission (*Complete Remission*, CR) liegt (neben weiteren Kriterien) vor bei <5% Myeloblasten im Knochenmark und Abwesenheit von Myeloblasten im peripheren Blut. Bei ausbleibender Remission nach zwei Zyklen Induktionstherapie spricht man von primärer Refraktärität. Eine Induktionstherapie führt bei unter 60-jährigen in bis zu 85% der Fälle zu einer CR, bei über 60-jährigen in maximal 60%.(3) Die Postremissionstherapie zur Konsolidierung erfolgt ELN-Risiko-abhängig z.B. mittels Cytarabin oder hämatopoetischer Stammzell-Transplantation (HSZT).(5) Im Vergleich zu einer ungünstigen genetischen Risikoklassifikation nach ELN ist eine günstige häufiger mit CR nach Induktionstherapie und geringerem Rezidivrisiko assoziiert.(9) Die Rezidivraten nach allogener HSZT liegen bei bis zu 40%.(10) Primär refraktäre und nach initialer CR rezidierte Patienten können innerhalb verschiedener Studien eine *Salvage*-Therapie erhalten. Dabei werden in unterschiedlichen Kombinationen klassische Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien zur Blockade bestimmter Signal- und Stoffwechselwege, sowie immunologische Therapiekonzepte angewendet.(11)

1.1.5 Immuntherapie bei rezidivierter oder refraktärer AML

Immuntherapien ermöglichen eine gezielte Markierung von (Tumor-) Zellen mit Antikörpern oder Zellen des Immunsystems, wodurch bspw. Apoptose der Zielzellen eingeleitet wird. Ein Beispiel sind Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), welche das Patienten-eigene Immunsystem intolerant gegenüber den Myeloblasten machen und damit einen *Escape*-Mechanismus der Myeloblasten ausschalten. Zur Verfügung stehende und in Studien verwendete Ziel-

Oberflächenmoleküle, gegen die die ICI gerichtet sind, sind CTLA-4, PD1, PD-L1, CD47 und TIM-3. Die Erfolgsraten halten sich aktuell in Grenzen, die Mechanismen sind weitestgehend ungeklärt.(12, 13)

Eine weitere Möglichkeit der Immuntherapie ist die zielgerichtete Therapie durch Kopplung von Medikamenten an monoklonale Antikörper. Ein Beispiel hierfür ist das humanisierte Antikörper-Zytostatikum-Konjugat Gemtuzumab-Ozogamicin. Dabei handelt es sich um die zytotoxische Substanz Calicheamicin, welche in Zielzellen zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose führt. Im Unterschied zu herkömmlichen Zytostatika geschieht dies (nahezu) nur in CD33-positiven Zellen, die nach Bindung des monoklonalen Antikörper-Zytostatikum-Konjugats das Medikament internalisieren. Da AML-Blasten häufig CD33 stark exprimieren, wirkt das Zytostatikum bevorzugt (aber nicht ausschließlich) gegen Leukämiezellen.(14)

Bei der allogenen HSZT handelt es sich im weiteren Sinne ebenfalls um eine Immuntherapie. Neben dem zytotoxischen Effekt der vorausgehenden Konditionierung erfolgt auf lange Sicht eine immunvermittelte Eliminierung der leukämischen Blasten, was als *Graft-versus-Leukemia-Effect* ("Spender vs. Leukämie" -Effekt, GvL-Effekt) bezeichnet wird.(15) Der GvL-Effekt beruht auf der Erkennung von Fremdantigenen auf Empfänger-Myeloblasten durch Spender-Effektorzellen, ähnlich wie bei der *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD). Den T-Zellen kommt hierbei eine besondere Rolle zu, wie Daten aus Studien zeigen, die die Zeit bis zum Rezidiv nach allogener HSZT durch Infusion von Spender-Lymphozyten (*Donor Lymphocyte Infusion*, DLI) verlängern.(16)

Neben allogenen ist die Verwendung von autologen T-Zellen möglich. Es besteht die Möglichkeit Patienten-eigene T-Zellen für *in-vitro*-Modifikationen zu entnehmen und dem Patienten später zu re-transfundieren. Die Modifikation kann eine Transfektion mit einem gegen spezifische Tumor-Antigene gerichteten T-Zell-Rezeptor (*T-Cell Receptor*, TCR) darstellen,(17) oder eine Transfektion mit einem chimären und Antigen-spezifischem Rezeptor (Chimeric Antigen Receptor, CAR). Beide Varianten bringen nach Re-Transfusion Patienten-eigene T-Zellen in Kontakt mit auf dem Tumor exprimierten Antigenen, wodurch die T-Zell-vermittelte Apoptose der Tumorzellen eingeleitet wird. Sie unterscheiden sich unter anderem in der Abhängigkeit von prozessierten und auf humanen

Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) präsentierten Peptiden, welche bei der CAR-T-Zellen-Therapie nicht benötigt werden.(18)

Weiterhin möglich ist die Verwendung von autologen T-Zellen ohne vorherige Entnahme oder Modifikation. Ermöglicht wird dies durch die Applikation von Antikörpern mit zwei Bindungsdomänen, welche einerseits CD3-positive T-Zellen binden und in räumliche Nähe der Myeloblasten bringen, welche durch die zweite Bindungsdomäne gebunden sind. Es folgt eine HLA- und TCR-unabhängige Aktivierung der T-Zellen, welche zur Ausschüttung von Zytokinen führt und in der Lyse der Myeloblasten endet. Die Bezeichnung eines T-Zell-rekrutierenden, bi-spezifischen Antikörpers wird im angloamerikanischen Raum als "BiTE" (*Bi-specific T-cell Engager*) abgekürzt.(19) BiTE[®] ist ursprünglich eine Marke des Unternehmens Amgen Inc., im Folgenden werden zur Abkürzung nur die Begriffe "BiTE" und "BiTEs" verwendet. In dieser Dissertation werden zwei spezielle anti-CD3/-CD33 BiTE-Moleküle (AMG 330 und AMG 673) beschrieben, die bei refraktärer oder rezidivierter AML im Rahmen von Studien Verwendung finden. Um die Funktion von BiTEs zu verstehen, wird an dieser Stelle eine allgemeine Erläuterung zur Funktionsweise von T-Zellen gegeben.

1.2 T-Zellen

T-Zellen sind lymphatische Zellen und Teil des adaptiven Immunsystems. Sie entstehen nach Einwanderung von multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Dort differenzieren die (zunächst als Thymozyten bezeichneten) Zellen aus und werden bezüglich der Fähigkeit ihres TCR zur Selbst-Toleranz und Selbst-MHC-Restriktion selektioniert. T-Zellen exprimieren während ihrer Entwicklung das Oberflächenmolekül CD3, welches zur Signalübertragung nach Bindung eines Antigens an den TCR benötigt wird. Man unterscheidet zunächst basierend auf der TCR-Kette zwischen α : β - und γ : δ -T-Zellen. Erstere bilden die Mehrheit und werden weiterhin anhand eines Co-Rezeptors in CD4-positive und CD8-positive T-Zellen eingeteilt. CD4-positive T-Zellen erkennen an MHC-Klasse-II gebundene Antigene und sind als T-Helferzellen in der Lage Zytokine zu sezernieren, wodurch die Funktion von anderen, insbesondere immunkompetenten Zellen beeinflusst wird. CD8-positive T-Zellen werden als

zytotoxische Effektorzellen bezeichnet, sie erkennen an MHC-Klasse-I gebundene Peptide und können durch Induktion der Apoptose direkt den Zelltod der Zielzellen herbeiführen.(20) Nach ihrer Reifung im Thymus zirkulieren die naiven T-Zellen im Körper, bis sie in einem sekundären lymphatischen Organ auf ihr TCR-spezifisches, an MHC-gebundenes und auf Antigen-präsentierenden Zellen haftendes Peptid treffen und aktiviert werden.(21) Neben dem durch den TCR-vermittelten Signal benötigt die T-Zelle weitere, durch Stimulation von Co-Rezeptoren und Zytokine vermittelte Signale, welche gemeinsam zur Synthese und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Durch Proliferation entstehen klonale, Antigen-spezifische Tochterzellen, welche nach ihrer Funktion in weitere Effektor-Subtypen eingeteilt werden. Sie führen über die Freisetzung von Zytokinen und Rezeptor-Liganden-Interaktion zur Apoptose von Zielzellen.(22)

1.2.1 Zytotoxische Anti-Tumor-Aktivität beim Gesunden

Das Immunsystem verfügt über mehrere Mechanismen zur Erkennung und Eliminierung von entarteten Zellen. Tumorzellen können dabei durch die Präsentation von nicht-physiologisch vorkommenden Antigenen (sog. Neoantigenen) auf MHC-Klasse I (oder durch völlige Abwesenheit von MHC-Klasse I auf der Zelloberfläche) zu einer CD8-vermittelten und direkten Apoptose gezwungen werden. Dabei kommt es durch Fas- und Fas-Ligand-Interaktion, oder durch Ausschüttung von Granzymen und Perforinen, zur Apoptose der Zielzellen.(23) CD4-positive T-Zellen können ebenfalls Tumorzellen anhand fehlender oder nicht-physiologischer Peptide auf MHC-Klasse II erkennen und indirekt, durch Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) und subsequenter Aktivierung von M1-Makrophagen, eliminieren. Weiterhin wurden direkte zytotoxische Effekte durch CD4-positiven T-Zellen, ähnlich der Granzym- und Perforin-Sekretion von CD8-positiven T-Zellen, beschrieben.(24)

1.2.2 Immunevasion beim Leukämie-Patienten

Leukämische Zellen können durch das Immunsystem effektiv erkannt und bekämpft werden.(25) Allerdings führt dies zu Selektionsdruck unter den Subgruppen von Tumorzellen, wodurch manche der Kontrolle des Immunsystems entkommen. Es wurden zahlreiche solcher Mechanismen postuliert, unter anderem Modifikation/ Verlust bestimmter Tumorantigene und

damit fehlende Bindung durch den TCR, oder fehlende bzw. fehlerhafte Präsentation von Tumor-Antigenen auf MHC-Molekülen.(26) Im nächsten Abschnitt wird ein Therapiekonzept der Immuntherapie dargestellt, welches unabhängig von TCR-Spezifität und unabhängig von MHC-Molekülen eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslöst.

1.3 Bi-specific T-cell Engager (BiTE®)

Bi-spezifische Antikörper besitzen zwei üblicherweise unterschiedliche Antigen-Bindestellen und werden in der Immuntherapie maligner Erkrankungen verwendet, um Zellen des Immunsystems in Kontakt mit Tumorzellen zu bringen. Wenn dabei eine Bindestelle gegen ein T-Zell-Antigen gerichtet ist und dadurch eine zytotoxische Reaktion an Zielzellen auslösen soll, spricht man von einem bispezifischen T-Zell-Engager (*Bi-specific T-cell Engager*, BiTE®). Ein BiTE besteht aus zwei als Tandem angeordneten Peptidketten, welche jeweils die variablen Fragmente der leichten und schweren Kette eines monoklonalen Antikörpers beinhalten und über einen Linker verbunden sind.(27) Die Produktion erfolgt mittels rekombinanter DNA-Technologie in transfizierten Hamster Ovar Zelllinien.(28) Bei der Wahl der spezifischen Antikörperketten werden Bindungen an Oberflächenmoleküle wie beispielsweise CD-Antigene verfolgt. Beim C-terminalen T-Zell-Antigen handelt es sich in der Regel um anti-CD3, da das Antigen CD3 auf allen T-Zellen zu finden ist.(29) Für die N-terminale Bindestelle des Tumor-Antigen wird ein möglichst für den Tumor sensitives Antigen ausgewählt, das optimalerweise spezifisch nur auf Tumorzellen (dafür aber ausgeprägt und bestenfalls auch auf Tumorzellen mit Stammzell-Charakter) vorhanden ist.(30) Die Verbindung einer Patienten-eigenen T-Zelle mit einer Tumorzelle über den BiTE hat die Aktivierung und Proliferation der T-Zelle zur Folge. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von der Spezifität des TCR, unabhängig von dem Vorhandensein von MHC-Molekülen, sowie bei aktivierten und inaktiven T-Zellen. Theoretisch können somit sämtliche T-Zellen im Organismus auf diese Weise gegen die Tumorzellen mobilisiert werden.(31) Die Aktivierung der T-Zellen führt zur Exozytose von Perforinen und Granzymen. Perforine erzeugen Poren in der Zellmembran der Zielzellen, wodurch Granzyme eintreten und über Caspasen-Aktivierung zur Apoptose führen.(32)

1.3.1 Das Oberflächenantigen CD33

Bei CD33, welches auch als Siglec-3 (*sialic acid binding Ig-like lectin 3*) bezeichnet wird, handelt es sich um einen Sialinsäure-abhängigen Transmembran-Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen der myeloischen Zellreihe.(33) Die physiologische Funktion ist nicht gänzlich geklärt, unter anderem vermittelt der Rezeptor eine inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung von myeloischen Zellen.(34) In einem Bericht führte die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an CD33 auf Myeloblasten von AML-Patienten zu gehemmter Proliferation und Apoptose.(35) Aufgrund der Expression auf über 99% aller Myeloblasten bei AML-Patienten (in unterschiedlichem Ausmaß) bietet sich das Oberflächenantigen CD33 als Bindestelle für den N-terminalen Teil des anti-CD3/-CD33 BiTE® bei der Therapie einer AML an.(36) CD33 bietet weiterhin den Vorteil, dass es auf leukämischen Stammzellen zu finden ist, welche als Ursprung für häufige AML-Rezidive vermutet werden. Gleichzeitig ist es nicht auf frühen, multipotenten Progenitorzellen der gesunden Hämatopoese vorhanden,(37) sodass sich das Knochenmark nach einer CD33-depletierenden Therapie regenerieren kann.(38)

1.3.2 AMG 330

Das BiTE-Konstrukt AMG 330 ist ein bi-spezifischer Antikörper mit Bindungsdomänen gegen die Epsilon-Kette von CD3 (anti-CD3) und gegen das myeloische Oberflächenantigen CD33 (anti-CD33). Die Bindungsaffinitäten liegen jeweils im niedrigen nanomolaren Bereich. Die Herstellung erfolgt mittels rekombinanter DNA-Technologie in Zellkulturen aus chinesischen Hamster Ovarzellen und dreistufiger Aufreinigung aus Kulturmedium. Das Konstrukt mit einem molekularen Gewicht von ungefähr 55 kDa zeigt bereits in Konzentrationen unter 1 ng/ml eine effektive Lyse von CD33-positiven Zellen in autologen und allogenen Versuchen.(39) Die spezifische Lyse von CD33-positiven Zielzellen ist dabei abhängig von der Effektor-zu-Target-Ratio und der Antikörper-Konzentration.(40) Sobald eine Expression von CD33 auf den Zielzellen vorliegt spielt die Stärke der Expression für die Lyse jedoch keine Rolle.(41) Das Konstrukt wurde im Rahmen einer nicht-randomisierten, klinischen Phase 1 Studie bei Patienten mit rezidivierender oder refraktärer AML angewendet (Studien-Identifikationsnummer: NCT02520427). Dabei erfolgte

eine kontinuierliche intravenöse Applikation von AMG 330 in aufsteigenden Konzentrationen. Die Studie sollte primär die Frage nach der maximal tolerierbaren und biologisch aktiven Dosis beantworten. Dazu wurden unter kontinuierlichem Monitoring unerwünschte Nebenwirkungen und Dosis-limitierende Toxizitäten erfasst. Sekundäre Studienziele waren die Erfassung von pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern, sowie die Wirksamkeit der Therapie.(42)

1.3.3 AMG 673

Bei AMG 673 handelt es sich um einen Halbwertszeit-verlängerten (*Half-Life Extended*, HLE) BiTE, der ansonsten die gleichen Bindungsdomänen wie AMG 330 besitzt.(43) Bei einem HLE-BiTE wird am N-Terminus des Konstrukts eine konstante Domäne eines IgG-Antikörpers addiert, wodurch sich die Halbwertszeit von wenigen Stunden auf mehrere Tage erhöht. Damit entfällt zur Erreichung von ausreichenden Serum-Spiegeln die (bei AMG330 notwendige) kontinuierliche intravenöse Applikation.(31) AMG 673 wurde ebenfalls im Rahmen einer klinischen Phase 1 Studie evaluiert (Studien-Identifikationsnummer: NCT03224819). Das Medikament wurde zur Behandlung einer refraktären oder rezidivierten AML für einen 14-tägigen Zyklus zweimal im Abstand von einigen Tagen als Kurzinfusion verabreicht. Die primären und sekundären Studienziele waren nahezu identisch mit den zuvor beschriebenen von AMG 330.(44)

2. Fragestellung und Hypothese

Trotz der erfolgsversprechenden präklinischen Ergebnisse zeigten erste Zwischenergebnisse beider Studien eine unvollständige Rekrutierung von T-Zellen und Eliminierung der Myeloblasten. Die Rate kompletter Remissionen bei AMG 330 lag bei nur 21% in den letzten 3 Patienten-Kohorten.(19) Bei AMG 673 zeigten weniger als 50% aller Patienten eine Reduktion der Myeloblasten im Knochenmark.(43) Damit stellt sich primär die Frage:

Warum zeigen Patienten mit refraktärer oder rezidivierter AML unterschiedliches Therapieansprechen auf bi-spezifische, T-Zell-rekrutierende Antikörper (BiTEs)?

Auf dem Weg sollen dabei folgende Zwischenfragen beantwortet werden:

1. Wie unterscheiden sich die T-Zellen und Myeloblasten von Therapie-Ansprechern (*Responder*) und Therapie Nicht-Ansprechern (*non-Responder*) vor Therapiestart?
2. Gibt es Biomarker für einen Therapieerfolg, die früh im Verlauf der Behandlung eine Abschätzung der Wirksamkeit erlauben?
3. Wie verändern sich T-Zellen und Myeloblasten im Therapieverlauf in beiden Gruppen?
4. Können aus den gemachten Beobachtungen Rückschlüsse gezogen werden, die Potenzial zur Verbesserung der Wirksamkeit der Therapie haben?

Zur Beantwortung der obigen Fragen und Erstellung eines geeigneten Experiments wurde folgende Hypothese formuliert:

Es existiert ein prädiktiver Biomarker, der vor der Therapie einer refraktären oder rezidivierten AML mit einem bi-spezifischen, T-Zell-rekrutierenden Antikörper (BiTE) erhoben werden kann. Anhand des Biomarkers lässt sich ein Therapieansprechen abschätzen und ggf. die Therapie modifizieren.

3. Material und Methoden

Die Hypothese bietet die Grundlage für eine experimentelle Herangehensweise zur Beantwortung der Fragestellungen. Für den Versuch wurden klinische Daten von Patienten, die mit einem der beiden Studienmedikamente (AMG 330 oder AMG 673) behandelt wurden, retrospektiv ausgewertet. Zusätzlich wurde Blut, das den Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und während der Therapie entnommen wurde, labortechnisch untersucht. Aus dem Blut isolierte T-Zellen wurden in einem allogenen Zellkultur-Setting mit einer AML-Zelllinie und dem BiTE® AMG 330r3 DS, oder mit CD3/CD28-*beads* (ohne Zelllinien und ohne BiTE) inkubiert. Die Auswertung dieser Daten soll später zur Beantwortung der Fragestellungen herangezogen werden.

3.1 Material

Zur besseren Übersicht sind die meisten für Experimente, Datensammlung und -analyse verwendeten technischen Geräte und Materialien in tabellarischer Form aufgeführt.

3.1.1 Laborgeräte

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Durchfluss-zytometer	CytoFLEX LX CytoFLEX S	Beckman Coulter
Elektrische Pipette	Pipetboy acu	Integra Biosciences
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific™
Inkubator	CB 150 Serie	Binder
Inverses Labor-mikroskop	DM IL LED	Leica
Kühlschrank	CBN Premium Serie	Liebherr
Magnetsäule	BD IMag™ Cell Separation Magnet	BD Biosciences
Mikropipetten	0.1 - 2.5 µL Single-Channel 0.5 - 10 µL Research plus 2 - 20 µL Research plus 20 - 200 µL Research plus 100 - 1000 µL Research plus	ErgoOne Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf
PCR-Thermocycler	Infinite® M1000	Tecan
Sprühflasche	Sprühflasche mit Handpumpe, 500 ml	Wagner&Munz GmbH
Sterilwerkbank	Safe 2020, Sicherheitsklasse Klasse II	Thermo Scientific™
Stickstoff-Lagerbehälter	CHRONOS® Tiefemperaturlagerbehälter	Cryotherm®

Stickstofftank	Apollo Biosafe®	Messer Griesheim
Tiefkühlschrank	GN Comfort Serie	Liebherr
Tischmagnet	EasySep™ Magnet	Stem Cell Technologies
Tischzentrifuge	Rotina 420R	Hettich
Ultratiefkühlschrank	HERAfreeze™ HFU-B Serie	HERAfreeze
Vortexmischer	Mini Vortex Mixer (SU1900), D-8900, neoLab special edition	Sunlab®
Wasserbad	VWB 12	VWR
Zellzähler	Countess II	Life Technologies

Tabelle 3-1: Laborgeräte

3.1.2 Computerprogramme

Programm	Bezeichnung	Version
Analyse durchflusszytometrischer Daten	FlowJo MacOS X	10.7.0
Bildbearbeitung	Microsoft® PowerPoint für Mac	16.73
Datenerfassung am Durchflusszytometer	CytExpert	2.3.1.22
Literaturverwaltung	EndNote 21 für Mac	21.0.0.19023
Statistische Analyse	GraphPad Prism 10 for MacOS	10.1.0
Tabellenorganisation	Microsoft® Excel für Mac	16.49
Textverarbeitung	Microsoft® Word für Mac	16.68

Tabelle 3-2: Computerprogramme

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
5mL FACS-Röhrchen	5 mL Polypropylene Round-Bottom Tube	FALCON®
15mL Zentrifugenröhrchen	15 mL High-Clarity Polypropylene Conical Tube	FALCON®
50mL Zentrifugenröhrchen	50mL PP Centrifuge Tubes	Corning®
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette® Plasma Lithium-Heparin 7,5 ml	SARSTEDT
Pipettenspitzen für den Pipetboy acu	Costar Stripette 5mL Costar Stripette 10mL Costar Stripette 25mL	Corning®
Handschuhe	Handschuhe Eco Nitril III M, grün	ecoSHIELD™
Kryo-Röhrchen	1.8ml Skirted Cryovial with Internal Thread	STARLAB
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten 7ml, 3,5ml Saugvolumen	VWR
Pipettenspitzen	ep T.I.P.S Standard 0,5-20µl ep T.I.P.S Standard 2-200µl ep T.I.P.S Standard 50-1000µl	Eppendorf
Sterile Mikrotiterplatte	Tissue Culture Plate, 96 Well, U-Bottom with Low Evaporation Lid	FALCON®
Unsterile Mikrotiterplatte	HTS 96-well Platten, klar, mit Deckel, flach	FALCON®

Zählkammern	Countess cell counting chamber slide	Thermo Scientific
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche 25cm ² /50ml / 75cm ² /275ml mit Gasaustauschkappe	Corning®

Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Medien und Chemikalien

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
BSA	MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec
CBA-Assay	BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - Human Th1/Th2 Cytokine Kit II	BD Biosciences
CD3/CD28 Eisenoxid-Beads	Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28	gibco
CD33-Depletions-Kit	EasySep™ Human CD33 Positive Selection Kit II	Stem Cell Technologies
DMSO	Dimethyl sulfoxide research grade	SERVA
PBS	D-PBS	PAN BIOTECH
EDTA	UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	Invitrogen
Ethanol	Ethanol 70% vergällt (LAB)	CLN GmbH
FarRed	CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	Invitrogen
FBS	Fetal Bovine Serum	gibco
Formaldehyd	Formaldehyd 37%	Carl Roth
Hepes	Hepes 1M Buffer Solution	Invitrogen
Mycoplasmen-Detektions-Kit	Mycoalert plus mycoplasma detection kit	Lonza
Pen Strep Glutamine (100x)	Penicillin Streptomycin Glutamine	gibco
QC Fluorospheres	CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	Beckman Coulter
RPMI	RPMI 1640 (with L-Glutamine; with 2.0 g/L NaHCO ₃)	PAN BIOTECH
Separationslösung	Histopaque®-1077 Hybri-Max™	SIGMA Life Science
Sheath Fluid	CytoFLEX Sheath Fluid	Beckman Coulter
T-Zell-Isolations-Kit	EasySep™ Human T Cell Isolation Kit	Stem Cell Technologies
Trypanblau	Trypan Blue stain 0.4%	Invitrogen

Tabelle 3-4: Medien und Chemikalien

3.1.5 FACS-Antikörper, Isotypkontrollen und Lebend-Tot-Farbstoff

Bei den FACS-Antikörpern muss zwischen den im Labor für Leukämiediagnostik eingesetzten Antikörpern im BiTE-Panel (Tabelle 3-5) und den im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München verwendeten Antikörpern und Farbstoffen zur Färbung der Zellkultur-Experimente unterschieden werden (Tabelle 3-6).

Antigen	Bezeichnung	Hersteller
CCR7	PE anti-human CD197 (CCR7) Antibody (clone: G043H7)	BioLegend
CD3	CD3-FITC (clone: UCHT1)	Beckman Coulter
CD33	CD33-PE (clone: D3HL60.251)	Beckman Coulter
CD4	APC-H7 Mouse Anti-Human CD4 (clone: RPA-T4)	BD Biosciences
CD45	CD45-KrO (clone: J33)	Beckman Coulter
CD45RA	Brilliant Violet 421™ anti-human CD45RA Antibody (clone: HI100)	BioLegend
CD69	APC/Cyanine7 anti-human CD69 Antibody (clone: FN50)	BioLegend
CD8	CD8-ECD (clone: B9.11)	Beckman Coulter
LAG-3	CD223 (LAG-3) Monoclonal Antibody (3DS223H), eFluor 450, eBioscience™	Invitrogen
PD-1	PE Anti-Human CD279 (PD-1) Antibody (clone: EH12.2H7)	BioLegend
PD-L1	PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD274 (clone: MIH1)	BD Biosciences
TIGIT	TIGIT Monoclonal Antibody (MBSA43), APC, eBioscience™	Invitrogen
Tim-3	Human Tim-3 APC-conjugated Antibody (clone: 344823)	R&D Systems
Isotyp-Kontrollen	IgG1 Mouse-ECD (clone: 679.1Mc7) IgG1 Mouse-PC7 (clone: 679.1Mc7) IgG1 Mouse-APC (clone: 679.1Mc7) IgG1 Mouse-APC-A750 (clone: 679.1Mc7) IgG1 Mouse-PB (clone: 679.1Mc7)	Beckman Coulter

Tabelle 3-5: FACS-Antikörper und Isotypkontrollen im BiTE-Panel des LfL

Antigen/ Ziel	Bezeichnung	Hersteller
CD33	CD33 Monoclonal Antibody, PE, eBioscience™ (clone: HIM3-4)	Invitrogen
CD4	FITC anti-human CD4 (clone: OKT4)	BioLegend
CD8	CD8 Antibody, anti-human, VioBlue®, REAfinity™ (clone: REA734)	Miltenyi Biotec
Lebend-Tot-Färbung	Zombie UV™ Fixable Viability Kit	BioLegend

Tabelle 3-6: FACS-Antikörper und Lebend-Tot-Farbstoff im Genzentrum

3.1.6 Tumorzelllinie MOLM-13

MOLM-13 ist eine humane Tumorzelllinie. Die blastären Zellen stammen ursprünglich von einem 20-jährigen Patienten mit einer nach myelodysplastischem Syndrom rezidierten akuten myeloischen Leukämie vom Subtyp M5a (nach FAB-Klassifikation). Für experimentelle Zwecke wurde diese Zelllinie im Jahr 2013 durch die Arbeitsgruppe von Professor Spiekermann der

Medizinischen Klinik III der LMU erworben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In Vorexperimenten stellte sich diese Zelllinie als besonders geeignet heraus, unter anderem aufgrund der konstant hohen CD33-Expression. Die Kultivierung wurde entsprechend den Hinweisen der DSMZ durchgeführt und wird im Abschnitt 3.2.2.2 genauer beschrieben. In regelmäßigen Abständen wurde durch die DSMZ ein molekulargenetischer Vergleich mit der ursprünglichen Zelllinie durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkultur mit fremden Zellen zu erkennen.

3.1.7 Experimentelle bispezifische Antikörper AMG 330r3 DS und cBiTE

Das Unternehmen Amgen Inc. stellte für experimentelle Zwecke den anti-CD3/-CD33 BiTE® "AMG 330r3 DS" mit einer Konzentration der Stammlösung von 0,5 µg/mL zur Verfügung. Als Kontroll-Antikörper (*control Bispecific T-cell Engager*, "cBiTE") wurde "MEC14xI2C" der Firma micromet mit einer Konzentration der Stammlösung von 1,62 µg/mL verwendet. Der cBiTE ist am C-Terminus gegen CD3 gerichtet, während der N-Terminus gegen das (in den Versuchen irrelevante) Herbizid Mecoprop gerichtet ist.

3.2 Methoden

3.2.1 Im LMU-Klinikum erhobene Daten

Im LMU-Klinikum wurden im Rahmen der Routineversorgung der Patienten analysierte Daten erhoben. Hierzu zählten insbesondere Daten aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, das Analysen von Patienten unter laufender Therapie mit CD33-BiTEs durchführte (also insbesondere Daten der Routine-Hämatologie und Serumchemie). Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch Daten ausgewertet, die im Labor für Leukämiediagnostik (LfL) erhoben wurden. Hierzu zählen neben Daten zur Remissions-Evaluation von Patienten mit AML, die mit CD33-BiTEs behandelt wurden, auch Daten des T-Zell-Immunmonitorings, im Rahmen dessen wiederholt T-Zellen der Patienten charakterisiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Alle Daten wurden unter Beachtung der Deklaration von Helsinki und nach zustimmender Bewertung eines Ethikantrags durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU erhoben (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.1.1 Patientenrekrutierung und Kollektion von Biomaterial

Für diese Dissertation wurden klinischen Daten und Auswertungen aus Experimenten mit T-Zellen von elf Patienten verwendet, die im Rahmen von zwei klinischen Phase-1-Studien des Unternehmens Amgen im Zeitraum von 2016 bis 2020 am Universitätsklinikum Großhadern behandelt wurden. Bei beiden Studien handelt es sich um nicht-randomisierte, unverblindete Behandlungsstudien zur Evaluierung der Sicherheit, Durchführbarkeit und Wirksamkeit steigender Dosen von AMG 330 bzw. AMG 673 zur Behandlung von Patienten mit rezidivierter oder refraktärer AML. Aufgrund unterschiedlicher Leukämie-Entitäten wurden AML-Patienten vom Subtyp der "Akuten Promyelozyten Leukämie" (APL) nicht in die Studien eingeschlossen. Wesentliche Informationen zur Studiendurchführung sind Tabelle 3-7 zu entnehmen.

	AMG 330	AMG 673
ClinicalTrials.gov ID	NCT02520427	NCT03224819
Interventionsmodell (mehrmarmig)	Sequentielle Zuweisung	Zuweisung nach bayesschem Modell
Intervention	Kontinuierlich-zyklische intravenöse Applikation von AMG 330	Zyklische Kurzinfusionen mit AMG 673
Einschlusskriterium der Erkrankung	Refraktäre oder rezidierte AML (außer APL)	Persistierende oder rekurrente AML (außer APL) nach ≥ 1 Therapielinien mit mehr als 5% Myeloblasten im Knochenmark und ECOG-Performance-Status ≤ 2

Tabelle 3-7: Unterschiede im Design der klinischen Phase-1-Studien von AMG 330/ 673
Nach ClinicalTrials.gov; Patienten mit AML vom Subtyp "Akute Promyelozyten Leukämie" (APL) wurden aufgrund der unterschiedlichen Leukämie-Entität von beiden Studien ausgeschlossen.

Bei Einschluss eines Patienten in eine der beiden Studien erfolgte eine Befragung und Aufklärung darüber, ob Daten und Blut zu Forschungszwecken an der LMU München asserviert und in späteren Experimenten und Auswertungen verwertet werden dürfen. Die Einverständniserklärung zur Freigabe der Daten für Forschungszwecke wurde durch eine Unterschrift auf der Patienteninformation eingeholt. Die Patienteninformation mit Aufklärungsbogen ist im Anhang dieser Dissertation zu finden. Zuvor wurde das Forschungsprojekt durch die Ethikkommission der LMU überprüft und genehmigt (Ethikvotum Nr. 216-08). Es wurden in die Auswertung nur Daten von Patienten eingeschlossen, die mit als wirksam anzusehenden Dosen der BiTEs behandelt wurden (d.h. Daten von einem Patienten, der in früheren Kohorten der AMG 330-Studie im

Rahmen der Dosisfindung mit einer so geringen Dosis des Antikörpers behandelt wurde, dass keine Wirksamkeit der Therapie zu erwarten war, wurden nicht mit ausgewertet). Die kombinierte Sammlung von Daten aus zwei unterschiedlichen Studien erfolgte zur Erhöhung der ansonsten geringen Patientenzahl. Dadurch entstand jedoch eine Heterogenität innerhalb der Kohorte, da AMG 330 als kontinuierliche intravenöse Infusion über mehrere Tage in kontinuierlich steigenden Dosierungen appliziert wurde, während AMG 673 in Kurzinfusionen mit meist unterschiedlichen Dosierungen an definierten Therapietagen verabreicht wurde. Die Applikation beider Studienmedikamente erfolgte in Zyklen mit darauffolgenden Therapiepausen, wobei eine Therapiephase bei AMG 330 in etwa 28 Tage dauerte. Bei AMG 673 waren die Therapiephasen circa halb so lang. Der Fokus dieser Dissertation liegt auf dem ersten Therapiezyklus, welcher innerhalb einer Behandlungsgruppe aufgrund von Toxizität und Studienprotokollen teilweise unterschiedlich lang war. Innerhalb der beiden Medikamentengruppen unterschieden sich die Therapieschemata zusätzlich in ihrer Verlaufs- und Enddosierung. Genauere Informationen zu den Therapieschemata sind in Abschnitt 4.1 aufgeführt.

Von den rekrutierten Patienten wurde zu drei Zeitpunkten vor und während der Therapie Biomaterial in Form von je 20mL venösem Blut asserviert. Die Blutentnahme (BE) erfolgte unter aseptischen Bedingungen nach allgemein bekannten Regeln der Sicherheit für Patient und Behandler durch Personal der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Klinikums der LMU München. Das entnommene Blut wurde in kommerziellen Blutentnahmeröhrchen mit Lithium-Heparin antikoaguliert und bis zur Weiterverarbeitung für maximal acht Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die erste Blutentnahme erfolgte vor Verabreichung des Studienmedikaments an "Tag 0" und wurde als Zeitpunkt 0 definiert. "Tag 1" begann ab der ersten Medikamentenverabreichung und entsprach somit dem gleichen kalendarischen Tag. Zeitpunkt 1 markierte bei Patienten unter Therapie mit AMG 330 eine Blutentnahme während der ersten Dosissteigerung. Die Blutentnahme zum Zeitpunkt 2 war während der maximalen Dosierung gegen Ende des Therapiezyklus lokalisiert. Bei Patienten unter AMG 673 erfolgte die Blutentnahme zum Zeitpunkt 1 kurz vor Verabreichung der zweiten Kurzinfusion, während die Blutentnahme zum Zeitpunkt 2 nach der

letzten Kurzinfusion lag. Weitere Informationen zu verwendeten Patientenproben sind Tabelle 4.2 zu entnehmen.

3.2.1.2 Erfassung klinischer Daten

Zur Erfassung der Parameter C-reaktives Protein (CRP), Laktat-Dehydrogenase (LDH) und der Anzahl an Leukozyten in Giga pro Liter (G/l) wurde auf Daten aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin zurückgegriffen, welche aus nahezu täglichen peripher- oder zentral-venösen Routine-Blutentnahmen generiert wurden. Aus diesem Institut wurden auch Daten zum prozentualen Anteil an Lymphozyten und Myeloblasten aus regelmäßig angefertigten Differenzial-Blutbildern verwendet.

Im LfL erfolgten verschiedene Routineuntersuchungen zur Kontrolle der Therapie. Dazu gehörte beispielsweise die zytomorphologische Beurteilung der Knochenmarkaspirationen, die zur Remissionskontrolle vor und nach der Therapie durchgeführt wurden, und aus dessen Befunden das Therapie-Ansprechen abgeleitet wurde (siehe Abschnitt 4.2). Die zytomorphologische Beurteilung wurde auch zur näherungsweisen Berechnung eines Effektor- zu Zielzellen-Verhältnisses (*Effector- to Target-Ratio*, E:T-Ratio) verwendet, das sich durch das Verhältnis von Lymphozyten zu Myeloblasten ergab. Weiterhin wurden mononukleäre Zellen des Knochenmarks (*Bone Marrow Mononuclear Cells*, BMMC) durchflusszytometrisch immunphänotypisiert, was für die exakte Berechnung einer E:T-Ratio mittels T-Zell- zu Blasten-Verhältnis im Knochenmark genutzt wurde (siehe Abschnitt 4.3.2).

Zusätzlich wurden im LfL regelmäßig mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) für Forschungszwecke mit Hilfe eines speziell erstellten Immunmonitorings – dem "BiTE-Panel" – durchflusszytometrisch analysiert. Daten aus diesen Analysen wurden an mehreren Stellen dieser Dissertation implementiert, weshalb im Folgenden Abschnitt, neben einer Erklärung zum Prinzip der Durchflusszytometrie, das BiTE-Panel erläutert wird.

3.2.1.3 Durchflusszytometrie und Immunmonitoring

Die Durchflusszytometrie, welche auch als *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) bezeichnet wird, ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen

Analyse von Zellen. Dazu werden in einer Lösung suspendierte Zellen in einen dünnen Schlauch mit sogenannter *Sheath Fluid* aufgenommen und vereinzelt (und somit im Fluss hintereinander) gereiht. Die Zellen passieren auf diese Weise einzeln ein System von Lasern und Detektoren und gelangen abschließend in einen Flüssigkeitsabwurf. Bei der Passage des Schlauches werden die Zellen durch Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt, hindurchtretendes und gebeugtes Licht wird von Detektoren gemessen. Je höher dabei die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) des Lichts ist, desto größer ist eine Zelle. Ähnlich verhält es sich mit der Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*, SSC), welche eine Aussage zur Granularität einer Zelle zulässt. Am Computer lassen sich mit diesen beiden Informationen, die in Form von Events gespeichert werden, Zellen bestimmten Populationen zuordnen. Erscheinen die Events beispielsweise im zweidimensionalen *Dotplot* weit entfernt vom Ursprung des Koordinatensystems, bei dem FSC gegen SSC aufgetragen ist, so handelt es sich bei der Analyse von PBMC um große und granulいたe Zellen wie Monozyten. Mit sogenannten *Gates* lassen sich in der Auswertung der Ergebnisse am Computer Events gruppieren und somit ihr Anteil an allen aufgezeichneten Events bestimmen, sowie diese ausgewählten Events weitergehend charakterisieren.

Zusätzlich werden Farbstoffe (Fluorochrome) an oder in der Zelle, beispielsweise fixiert durch Antikörper-Antigen-Bindung, durch Laserlicht mit bestimmter Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt, wodurch ein Lichtsignal einer bestimmten Wellenlänge emittiert wird. Dadurch lassen sich mit entsprechenden Antikörper-Farbstoff-Konjugaten zum Beispiel Oberflächenmoleküle einer bestimmten Zellsubpopulation markieren und damit später unterscheiden. Durch die Kombination vieler unterschiedlicher Antikörper-Farbstoff-Konjugate lassen sich die Populationen eingehend charakterisieren, jedoch ist bei der gleichzeitigen Verwendung einer Vielzahl von Farbstoffen eine gewisse Überschneidung der Wellenlängen für Anregung und Emission zu beachten. Dies kann zu verfälschten Ergebnissen führen, weshalb die Erstellung einer Kompensationsmatrix vor Auswertung der Ergebnisse unerlässlich ist und täglich vor dem Gebrauch ein Qualitätscheck mit sogenannten *QC Fluorospheres* durchgeführt werden muss.

Neben der Messung von Immunzellpopulations-definierenden Oberflächenmarkern lässt sich auch die Expression weiterer Antigene auf der Zelloberflächen quantifizieren. Dazu wird ein Teil der Zellen mit einem Isotyp-Antikörper markiert, welcher unspezifisch an Zellen bindet und als Negativkontrolle fungiert. Später lässt sich mit Hilfe des Isotyp-Antikörpers definieren, ab welcher Wellenlängen-Emission (und somit Expressions-Intensität) eine Zelle als für ein bestimmtes Antigen positiv gilt und wie stark die Expression des Antigens ist. Üblicherweise wird dies mit einer Gating-Strategie erreicht, bei der ein Gate über das Histogramm der Antikörper-Kondition gelegt wird, welches sich zu weniger als einem Prozent mit dem Histogramm der Isotyp-Antikörper-Kondition überschneiden darf. Alternativ kann mithilfe einer *Mean Fluorescent Intensity* (MFI) -Ratio ein Vergleich der Expression eines Oberflächenmarkers zur Isotyp-Antikörper-Kondition oder einer Referenzpopulation gezogen werden. Dazu wird die durchschnittliche Intensität der Fluoreszenz in der Antikörper-Kondition durch die durchschnittliche Intensität der Fluoreszenz in der Referenz-Kondition dividiert. Dies kann von Nutzen sein, wenn sich die maximale Intensität der Fluoreszenz von Antikörper und Isotyp-Kontrolle kaum unterscheiden. Auf diese Weise lässt sich etwa der Umfang der Expression von *Exhaustion*- und Aktivitätsmarkern auf der Oberfläche von bestimmten Zellpopulationen beurteilen.

Zur Charakterisierung von T-Zell-(Sub-)Populationen vor und während der BiTE-Therapie wurde ein eigens angefertigtes "BiTE-Panel" zur Analyse der PBMC eingesetzt, welches eine Zusammenstellung von verschiedenen Antikörper-Farbstoff-Konjugaten in 3 Röhrchen umfasst (Tabelle 3-8).

Messkanal	Isotyp tube	Checkpoint tube	Subset tube
APC	IgG1	Tim-3	TIGIT
APCA750	IgG1	CD69	CD4
ECD	IgG1	-	CD8
FITC	CD3	CD3	CD3
KrOrange	CD45	CD45	CD45
PacBlue	IgG1	LAG-3	CD45RA
PC7	IgG1	PD-L1	PD-1
PE	CD33	CD33	CCR7

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Antikörper-Spezifitäten im BiTE-Panel
Gelistet sind die Zielantigene bzw. Isotyp-Kontrollen.

Die Gating-Strategie lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: $SSC^{\text{low}}CD45^+$ -Zellen wurden als Lymphozyten definiert. Der Anteil der $CD3^+$ Zellen an allen Lymphozyten stellte die T-Zellen dar, welche durch die Expression von CD4 und CD8 auf den entsprechenden Subpopulationen weiter subklassifizieren wurden. Innerhalb der T-Zellen wurden weiterhin naive ($CD45RA^+CCR7^+$), *Central Memory* (CM, $CD45RA^-CCR7^+$), *Effector Memory* (EM, $CD45RA^-CCR7^-$) und EM- $CD45RA^+$ (EMRAs, $CD45RA^+CCR7^-$) T-Zellen unterschieden (siehe Abbildung 3-1).

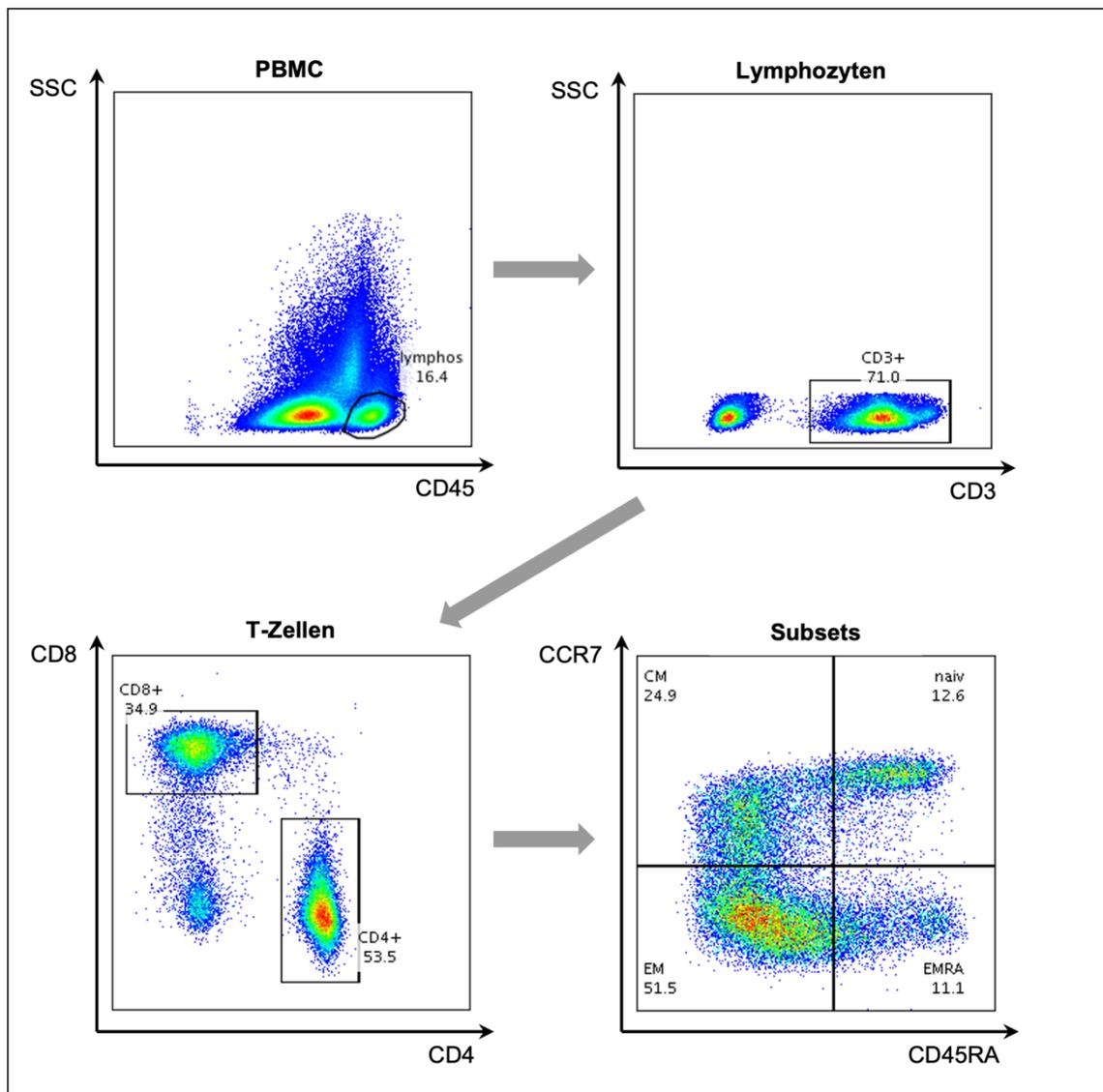


Abbildung 3-1: Gating-Strategie der T-Zellen

$CD45^+SSC^{\text{low}}$ -Zellen wurden als Lymphozyten definiert. Innerhalb der Lymphozyten wurden $CD3^+$ T-Zellen mittels Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 weiter subklassifiziert. Mit Antikörpern gegen CD45RA und CCR7 konnten zwischen naiven ($CD45RA^+CCR7^+$), *Central Memory* (CM; $CD45RA^-CCR7^+$), *Effector Memory* (EM, $CD45RA^-CCR7^-$) und EM- $CD45RA^+$ (EMRAs, $CD45RA^+CCR7^-$) T-Zellen unterschieden werden.

Auf jedem T-Zell-Subset konnte durch Vergleich zur Isotyp-Antikörper-Kontrolle die Expression der T-Zell-Immuncheckpoints PD-1, TIGIT, Lag-3 und Tim-3, sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 quantifiziert werden.

Events mit $SSC^{low}CD45^{dim}CD3^{-}$ -Zellen wurden als leukämische Myeloblasten definiert, auf ihnen erfolgte die Messung der CD33-Expression im Vergleich zur CD33-Expression auf T-Zellen (welche als Negativkontrollen fungierten), sowie die PD-L1-Expression im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (siehe Abbildung 3-2). Das Verhältnis von $CD3^{+}$ -T-Zellen zu $CD3^{-}$ -Leukämiezellen wurde zur Berechnung der E:T-Ratio im peripheren Blut herangezogen:

$$E:T - Ratio = \frac{(\% \text{ Lymphozyten}) \times (\% \text{ CD3}^{+} \text{ Events aller Lymphozyten})}{100 \times (\% \text{ Myeloblasten})}$$

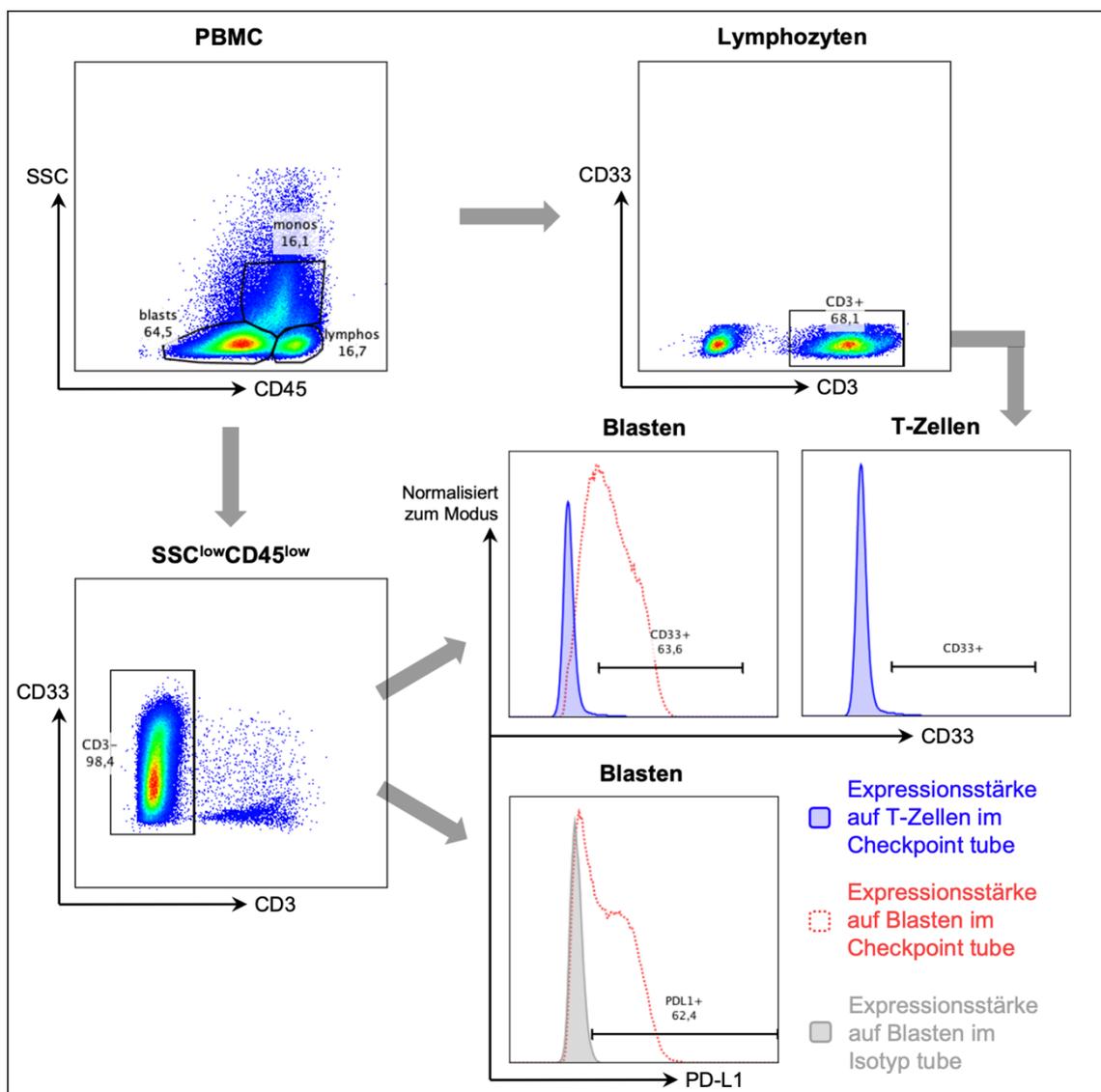


Abbildung 3-2: Gating-Strategie der Myeloblasten

$SSC^{low}CD45^{dim}CD3^{-}$ -Zellen wurden als Myeloblasten definiert, auf welchen die Expressionsstärke von CD33 im Vergleich zu $CD3^{+}$ T-Zellen (als Negativkontrolle) gemessen wurde. PD-L1 wurde auf Myeloblasten im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle gemessen.

Aufgrund der Tatsache, dass für die Analysen nicht Vollblut, sondern PBMC verwendet wurden, konnte keine valide Angabe zu absoluten Zellzahlen im Patientenblut erfolgen. Jedoch konnte aus Daten zur prozentualen Verteilung der Subsets aus FACS und den Informationen aus dem Differential-Blutbild eine Abschätzung zur absoluten Zellzahl im Patientenblut vorgenommen werden.

Zur Berechnung der Absolutzahl der Blasten im Vollblut eines Patienten wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Blasten} \left(\frac{G}{l} \right) =$$

$$\text{Leukozytenzahl} \left(\frac{G}{l} \right) \times \frac{\% \text{ Blasten im Differentialblutbild}}{100}$$

Analog wurde zur Berechnung der Absolutzahl der Lymphozyten im Vollblut folgende Formel verwendet:

$$\text{Lymphozyten} \left(\frac{G}{l} \right) =$$

$$\text{Leukozytenzahl} \left(\frac{G}{l} \right) \times \frac{\% \text{ Lymphozyten im Differentialblutbild}}{100}$$

Um die Absolutzahl der T-Zellen im Vollblut zu ermitteln, wurde die Absolutzahl der Lymphozyten mit dem Anteil CD3⁺ Events an allen Lymphozyten in der dazugehörigen FACS-Messung im BiTE-Panel multipliziert:

$$\text{T - Zellen} \left(\frac{G}{l} \right) =$$

$$\text{Leukozytenzahl} \left(\frac{G}{l} \right) \times \frac{\% \text{ Lymphozyten im Differentialblutbild}}{100} \times \frac{\% \text{ CD3+ Events aller Lymphozyten}}{100}$$

3.2.1.4 Definition von Therapieansprechen

Für eine pragmatische Auswertung wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Aufgrund der Heterogenität der Krankheitsverläufe war es für die Analysen nicht sinnvoll, die üblichen AML-Remissionskriterien zur Gruppierung zu verwenden. Stattdessen wurden alle Patienten entweder in die Gruppe der

Ansprecher (*Responder*, R), oder in die Gruppe der Nicht-Ansprecher (*Non-Responder*, NR) eingeteilt. Eine Einordnung als Responder erfolgte, wenn im zytomorphologischen Knochenmarkausstrich (KM-Ausstrich) des Aspirats nach dem ersten Therapiezyklus eine Reduktion des Blastenanteils von $\geq 50\%$ im Vergleich zum KM-Ausstrich vor dem ersten Therapiezyklus erreicht wurde. Bei einem Patienten wurde aufgrund fehlender Repräsentativität in den KM-Ausstrichen bei deutlicher klinischer Besserung die Veränderung der Granulozytenzahl zur Beurteilung des Therapieerfolgs herangezogen. In allen anderen Fällen wurden die Patienten automatisch den Non-Respondern zugeordnet (siehe Abschnitt 4.2).

3.2.2 Im Genzentrum der LMU durchgeführten Arbeiten

Die im Folgenden aufgeführten Arbeitsschritte wurden im Genzentrum der LMU München in speziellen Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 und unter den allgemein bekannten Regeln zu Sterilität und Arbeitssicherheit durchgeführt. Dazu gehörte beispielsweise das Arbeiten mit nicht verschlossenen Aufbewahrungsbehältern unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit laminarem Luftabzug, die Desinfektion von Arbeitsflächen, Geräten und Handschuhen mit Ethanol, regelmäßigen UV-Belichtungen von Arbeitsflächen und Werkzeugen, sowie die Verwendung von steril verpackten und autoklavierten Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen und Zentrifugenröhrchen. Versuche mit Patienten-Zellen wurden parallel mit Spender-Zellen eines 24-jährigen, gesunden Mannes begleitet und dienten als interne Kontrolle.

3.2.2.1 Zellzählung

20 μ L einer Zellsuspension wurden in eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells überführt und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Davon wurden 20 μ L in eine Zählkammer gegeben. Ein automatisches Zellzählgerät bestimmte die Zellkonzentration der Suspension, sowie die Zellviabilität anhand der prozentualen zytoplasmatischen Aufnahme von Trypanblau. Das Verfahren beruht auf einer höheren Permeabilität der Membranen von toten und apoptotischen Zellen und folglich erhöhten Aufnahme von Trypanblau. Lebende Zellen hingegen stellen sich wegen der fehlenden Aufnahme lichtmikroskopisch transparent dar, der blaue Farbstoff verbleibt im extrazellulären Raum. Die

darauffolgende Bestimmung der Zellzahl beruhte ausschließlich auf der so bestimmten Zahl an viablen Zellen.

3.2.2.2 Kultivierung von MOLM-13

Die Zelllinie MOLM-13 wurde in 75cm²/275mL-Zellkulturflaschen bei einer Konzentration von bis zu 2,5x10⁶/mL in R10-Medium (Herstellung siehe Tabelle 3-9) kultiviert. Die Kultivierung, sowie alle weiter unten folgenden Inkubationsschritte bei 37°C erfolgten in einem Inkubator mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Zweimal wöchentlich wurden zur Regulation der Zellzahl je $\frac{3}{4}$ der Zellsuspension durch frisches, im Wasserbad auf 37°C vorgewärmtes R10-Medium ersetzt. Im Falle eines anstehenden Experiments wurden 2,5mL der ersetzten Zellsuspension in eine frische 25cm²/50mL-Zellkulturflasche überführt, dazu 7,5mL frisches R10-Medium gegeben und diese Kulturflasche für zwei weitere Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellproliferation wurde regelmäßig unter Lichtmikroskopie beurteilt und auf eventuell vorhandene bakterielle Kontamination untersucht. Weiterhin wurde einmal monatlich im Überstand der Zellkultur ein Mycoplasmen-Detektions-Test mittels Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt. Auf diese Weise konnte für die anstehenden Experimente eine ausreichende Anzahl an Leukämiezellen mit hoher Viabilität und ohne Verunreinigungen zur Verfügung gestellt werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
R10-Medium	500mL RPMI, 55,5mL FCS, 5,5mL Hepes, 5,5mL Penicillin/ Streptomycin und L-Glutamin
Gefriermedium	50mL FBS, 5mL DMSO
FACS-Puffer	500mL PBS, 5mL BSA (0.1%), 2mL EDTA (0,5M)
FACS-Fix	47,3mL FACS-Puffer, 2,7mL Formaldehyd (37%)
FarRed-Dilution	FarRed + 20µL DMSO

Tabelle 3-9: Eigenständig hergestellte Medien und Lösungen

3.2.2.3 Gewinnung und Kryokonservierung von PBMC

Das im LMU-Klinikum entnommene Patientenblut wurde nach Pseudonymisierung im LfL ins Genzentrum der LMU transportiert und aufgearbeitet, damit die Patienten-PBMC bis zum Tag der Verwendung in Experimenten tiefgekühlt eingelagert werden konnten. Dazu wurde das Blut

eines Patienten aus den Blutentnahmeröhrchen gepoolt und im Verhältnis 1:1 mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS) gemischt. Von dieser Mischung wurden je 20mL auf 15mL einer kommerziell erhältlichen Separationslösung in 50mL Zentrifugenröhrchen überschichtet. Mit der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (siehe Tabelle 3-10 "Dichtezentrifugation") konnten die PBMC von Granulozyten, Erythrozyten und Blutplasma getrennt werden. Bei diesem Verfahren befinden sich die PBMC aufgrund ihrer Dichte in einer Schicht zwischen Blutplasma und Separationslösung. Dadurch konnten die PBMC mit einer Pasteurpipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden. Um versehentlich aufgenommene Separationslösung auszuwaschen, wurden dieses Röhrchen bis 50mL mit PBS aufgefüllt und in einem speziellen Zentrifugations-Schritt (siehe Tabelle 3-10 "Spezieller Waschschrift") zentrifugiert. Der Überstand wurde nun entfernt und die am Boden sedimentierten PBMC in 10mL PBS suspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration wurden die PBMC mithilfe einer einfachen (Standard-) Zentrifugation (siehe Tabelle 3-10 "Standard-Zentrifugation") erneut sedimentiert und der Überstand verworfen. Zur Kryokonservierung wurden die PBMC in *Aliquots* von 1,5mL Gefriermedium (siehe Tabelle 3-9) zu einer Konzentration von $1,0 \times 10^7$ /mL aufgenommen und in Kryo-Röhrchen konserviert. Dabei erfolgte zunächst eine schonende Kühlung mittels Gefrierbehälter im Ultratiefkühlschrank bei minus 80°C für mindestens 12h mit anschließendem Transfer in flüssigen Stickstoff und dortiger Lagerung bei minus 196°C. Aufgrund der über mehrere Jahre erfolgten Patientenrekrutierung ergaben sich für die Dauer der Aufbewahrung im Stickstoff bis zum Tag des Ansatzes eines Experiments mit den Patientenzellen Zeiträume von zwei bis 33 Monaten.

Programm- Bezeichnung	Geschwin- digkeit in rcf	Beschleu- nigung	Brem- se	Dauer in Minuten	Tempe- ratur in °C
Dichtezentri- fugation	820	1	1	30	20
Spezieller Waschschrift	550	9	9	10	20
Standard- Zentrifugation	550	9	9	5	20
CBA- Waschschrift	200	9	9	5	20

Tabelle 3-10: Zentrifugation-Programme

3.2.2.4 Magnetische Isolation von T-Zellen

Zum Auftauen der Aliquots am Tag des Ansatzes eines Experiments wurden diese aus der Lagerung im Stickstoff in ein Wärmebad bei 37°C transferiert und dort für circa zwei Minuten erwärmt. Sobald nur noch ein kleiner Rest Eis im Kryoröhrchen verblieb, wurden die Aliquots eines Patienten von einem Therapiezeitpunkt in ein vorbereitetes 15mL Zentrifugenröhrchen mit 10mL 4°C kaltem FACS-Puffer (siehe Tabelle 3-9) überführt. Die Zellen darin wurden mit Hilfe einer Standard-Zentrifugation sedimentiert, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Auf diese Weise konnten tote und apoptotische Zellen, Calcium-enhaltendes Medium, sowie das im flüssigen Aggregatzustand zytotoxische DMSO zum größten Teil aus der Zellsuspension entfernt werden. Zur exakten Bestimmung der Zellzahl und Viabilität wurden die sedimentierten Zellen in 10mL FACS-Puffer suspendiert. Dies war wichtig, da für den ersten Schritt der Zellisolation eine Ausgangskonzentration der PBMC von 1×10^8 /mL benötigt wurde. Das Zentrifugenröhrchen wurde erneut einer Standardzentrifugation zugeführt, der Überstand verworfen, die Zellen in entsprechendem Volumen FACS-Puffer suspendiert und in ein steriles 5mL FACS-Röhrchen überführt, in welchem die Isolation der T-Zellen erfolgte.

Zur einfachen Isolation von T-Zellen bei geringen Zellzahlen kam eine Zellisolation mit magnetischen *Beads* in Frage. Jedoch zeigte sich in Vorversuchen eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen bei positiver Selektion (d.h. bei Verwendung von Anti-CD3-Beads). Eine alleinige negative Selektion der T-Zellen (wie sie weiter unten im Text beschrieben wird) zeigte starke Verunreinigungen der isolierten T-Zellen von AML-Patientenproben, was laut Hersteller auf die Auslegung der kommerziell erhältlichen Kits auf gesunde Spenderproben zurückzuführen ist. Die größtenteils nicht physiologischen Verhältnisse und Mengen an PBMC bei AML-Patientenproben machten zunächst eine Entfernung der überwiegend CD33-positiven Myeloblasten notwendig.

Zur Gewinnung einer maximalen Anzahl und Reinheit an T-Zellen aus den kryokonservierten PBMC-Aliquots wurde ein spezielles, zweischrittiges Isolationsprotokoll entwickelt. Dieses basierte auf einer von Oberflächenstrukturen abhängigen, magnetischen Sortierung von Zellen und war eine Kombination aus zwei kommerziell erhältlichen Zell-Isolations-Kits (CD33-Depletions-Kit und T-Zell-Isolations-Kit) und deren aufeinanderfolgenden

Durchführung nach Herstellerangaben. Kurz zusammengefasst wurden in einem sterilen 5mL FACS-Röhrchen mittels positiver Depletion CD33-positive Zellen mit Antikörpern markiert, welche sekundär an magnetische Beads gebunden wurden. Mit Hilfe eines Tischmagneten konnten die markierten CD33-positiven Zellen am Rand des FACS-Röhrchens zurückgehalten werden, sodass die in der am Boden abgenommenen Flüssigkeit enthaltenen Zellen CD33-negativ waren. Aus dieser in ein steriles FACS-Röhrchen überführten, CD33-negativen Zellsuspension wurden in einem zweiten Schritt mittels negativer Selektion T-Zellen isoliert, indem abermals eine kommerziell erhältliche Antikörper-Bead-Mischung (deren genaue Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten wird) hinzugegeben wurde. Die Antikörper in diesem Cocktail markierten NK-Zellen, B-Zellen und verbliebene Monozyten, sodass diese vom Magneten zurückgehalten wurden und lediglich die unberührten T-Zellen abgenommen werden konnten.

3.2.2.5 Färbung der Zellmembran von T-Zellen

Die so isolierten T-Zellen wurden in ein neues 15mL Zentrifugenröhrchen überführt, mit einer Standard-Zentrifugation sedimentiert und schließlich in 1mL einer 1:1000 mit PBS verdünnten FarRed-Dilution (siehe Tabelle 3-9) suspendiert und für 20 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. FarRed ist ein Farbstoff, der sich in Zellmembranen einlagert, bei 405nm zur Fluoreszenz angeregt wird und dabei Licht einer Wellenlänge von 450nm emittiert. Dadurch lassen sich später in der Durchflusszytometrie die T-Zellen von den Tumorzellen unterscheiden, da letztere keine Membranfärbung erhalten. Zusätzlich lassen sich auf diese Weise Zellteilungen der T-Zellen nachvollziehen, da mit jeder Mitose die Menge an in der Zellmembran eingelagertem Farbstoff einer Zelle halbiert wird und dementsprechend die Intensität der emittierten Strahlung abnimmt. Die Auswertung dieser Daten wird in Abschnitt 3.2.3 erläutert.

Nach den 20 Minuten Inkubationszeit wurden die Zentrifugenröhrchen bis 15mL mit R10-Medium aufgefüllt und für weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Um während des Färbevorgangs apoptotisch gewordene Zellen zu entfernen und die Zellkonzentration auf 1×10^6 T-Zellen /mL zu adjustieren erfolgte eine letzte Zählung, sowie ein Waschschriff mit Standard-Zentrifugation und abschließender Suspension der Zellen in entsprechendem Volumen R10-Medium.

3.2.2.6 BiTE-vermittelte Experimente zur Untersuchung der zytotoxischen und proliferativen Kapazität von Patienten-T-Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung von Patienten-T-Zellen wurde eine allogene Ko-Kultur von Patienten-T-Zellen von verschiedenen Therapiezeitpunkten und den Tumorzellen der Zelllinie MOLM-13 angesetzt. Ziel war es, Momentaufnahmen dieser Ko-Kultur kurz vor (also nach 0 Stunden) sowie nach 48 und 120 Stunden in Anwesenheit des experimentellen anti-CD3/-CD33 BiTEs "AMG 330r3 DS" mittels Durchflusszytometrie anzufertigen. Dazu wurden Mikrotiterplatten verwendet, deren Inhalt jeweils 200µL R10-Medium, 2×10^4 FarRed-gefärbte T-Zellen und 8×10^4 Tumorzellen (E:T-Ratio = 1:4), sowie den experimentellen BiTE bzw. cBiTE umfasste. Für die Messungen zur Stunde 0 reichte eine unsterile Mikrotiterplatte mit 96 Wells und flachem Boden aus, da diese Zellen direkt gefärbt und analysiert wurden. Da für die Messung keine Ko-Inkubation von T- und Tumorzellen erfolgte, wurden für diesen Zeitpunkt auch keine BiTEs/ cBiTEs zugegeben. Diese Momentaufnahme spiegelte den Ausgangszustand der Ko-Kultur wider und wurde insbesondere zur Bestimmung der E:T-Ratio zu Beginn des Versuchs herangezogen.

Die Inkubation für die Messungen nach 48 und 120 Stunden erfolgte in je zwei Wells einer sterilen 96-Well-Mikrotiterplatte mit U-förmigem Boden. Diese Boden-Konfiguration führte nach Sedimentation der Zellen zu einer höheren räumlichen Nähe von T- und Tumorzellen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator mit finalen BiTE- und cBiTE-Antikörperkonzentrationen von 0,5ng/mL. Dazu wurde je ein Aliquot der Stammlösungen des (c)BiTEs aus der Lagerung bei -70°C entnommen, auf Zimmertemperatur erwärmt und mit R10-Medium verdünnt. Durch den Vergleich der Zellzahlen im BiTE vs. cBiTE-enthaltenden Well wurden nur Effekte erfasst, die CD33-BiTE-spezifisch waren. Unspezifische Zytotoxizität (z.B. durch Spontan-Apoptose der Zielzellen) spielte somit für die beobachteten Effekte keine Rolle. Nach 48 und 120 Stunden wurden je 100µL des Medium-Überstands in den Wells in eine neue unsterile Mikrotiterplatte überführt, welche bei minus 20°C im Tiefkühlschrank eingefroren wurden. Dies ermöglichte eine spätere Messung von im Zellmedium gelösten Zytokinen mittels *Cytometric Bead Arrays* (siehe Abschnitt 3.2.2.9). Die restlichen 100µL mit den darin enthaltenen Zellen wurden wiederum in eine neue, unsterile Mikrotiterplatte überführt und zur

Antikörperfärbung und Messung am Durchflusszytometer verwendet (siehe Abschnitt 3.2.2.8).

3.2.2.7 Bead-vermittelte Experimente zur Untersuchung der proliferativen Kapazität von Patienten-T-Zellen

Im Gegensatz zu den BiTE-vermittelten Experimenten wurden in diesem Ansatz nur die FarRed-gefärbten T-Zellen der Patienten verwendet. Die Inkubation von 1×10^5 T-Zellen in 200 μ L R10-Medium pro Well erfolgte ebenfalls in sterilen, U-förmigen 96-Well Mikrotiterplatten bei 37°C im Inkubator für 48 bzw. 120 Stunden. Auch hier wurden pro Therapiezeitpunkt zwei Wells verwendet, um anhand der Kontrolle im ersten Well (ohne Zugabe von Beads) unspezifische Effekte zu detektieren, während in das zweite Well 5×10^4 kommerziell erhältliche CD3/CD28 Eisenoxid-Beads gegeben wurden. Hierbei handelt es sich um magnetische Kugeln mit einem Durchmesser von 4.5 μ m und kovalent gekoppelten anti-CD3- und CD28- Antikörpern, welche eine unspezifische (von Antigen-präsentierenden Zellen unabhängige) Aktivierung und Proliferation von T-Zellen induzieren. Im Unterschied zur BiTE-vermittelten T-Zell-Aktivierung in der Ko-Kultur mit Tumor-Zelllinien erfolgt die Aktivierung von T-Zellen mit Beads reproduzierbarer, weil sie nicht von zusätzlichen, patienten-individuellen biologischen Variablen (wie z.B. der CD33-Expression auf myeloblastären Zellen) abhängig ist. In diesem Versuchsansatz sollten damit besser vergleichbare Bestandsaufnahmen der proliferativen Kapazität der T-Zellen nach 48 und 120 Stunden erfasst werden. Am Auslesetag wurden die Beads mithilfe eines Tischmagneten entfernt und die Zellsuspensionen in eine unsterile Mikrotiterplatte überführt. Darin erfolgte eine Färbung zur Messung am Durchflusszytometer, wie im nächsten Abschnitt 3.2.2.8 erläutert wird.

3.2.2.8 (Antikörper-) Färbungen und durchflusszytometrische Messungen

Die aus den BiTE- und Bead-vermittelten Experimenten transferierten Zellen wurden zunächst mittels Standard-Zentrifugation auf den Boden der unsterilen 96 Well Mikrotiterplatten sedimentiert. Nach der Zentrifugation erfolgte ein vorsichtiges Abschütten der Überstände durch einmaliges Invertieren der Platte über dem Flüssigkeitenabfall, gefolgt von einer Lösung der Zellen vom Plattenboden durch kurzzeitiges Schütteln mit dem Vortexermischer und abschließender Suspension der Zellen in je 100 μ L PBS pro Well. Dieser Vorgang

ab der Standard-Zentrifugation bis zur Suspension wird im Folgenden als "Waschschritt" bezeichnet. Pro Well wurden 0,125 μ L des Lebend-Tot-Farbstoffs "ZombieUV" zugefügt. Dieser funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie das zur Zellzählung verwendete Trypanblau, zeigt aber eine violette Fluoreszenz und ist somit zur Messung in der Durchflusszytometrie geeignet. Tote Zellen strahlen aufgrund der starken Permeabilität der Zellmembran für den Farbstoff mit hoher Intensität Licht einer Wellenlänge von 459nm aus. Bei lebendigen Zellen fehlt die Aufnahme, womit die Intensität des ausgestrahlten Lichts deutlich geringer ist. Im Sterbeprozess befindliche Zellen lokalisieren sich zwischen beiden Extremen.

Nach 20-minütiger Inkubation in Dunkelheit bei 4°C im Kühlschrank erfolgte ein Waschschritt mit 200 μ L FACS-Puffer. Die Färbung der Zellen aus den Bead-vermittelten Experimenten war mit einem abschließenden Waschschritt und Suspension der Zellen in 200 μ L FACS-Fix (siehe Tabelle 3-9) beendet. Das in FACS-Fix enthaltene Formaldehyd stabilisiert und fixierte Zellen für einen Zeitraum von 24 Stunden, sodass Messungen mit einer Latenz und ohne Verfälschung der Zellviabilität durchgeführt werden konnten.

Den in 200 μ L FACS-Puffer gelösten Zellen aus den BiTE-vermittelten Experimenten wurde in der Antikörperfärbung eine Mischung an Antikörpern zugegeben, dessen Zusammensetzung für ein Well je 0,5 μ L der Antikörper CD33, CD4 und CD8 (siehe Tabelle 3-6) entsprach. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Kühlschrank für 20 Minuten. Nach zwei weiteren Waschschritten und einer erneuten Suspension der Zellen in 200 μ L FACS-Fix war die Färbung dieser Zellen abgeschlossen. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Mikrotiterplatten für bis zu 12 Stunden im Kühlschrank gelagert.

Durchflusszytometrische Messungen an den im Genzentrum der LMU durchgeführten Experimenten erfolgten am CytoFLEX LX-Zytometer bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 60 μ L/min und einem Aufnahmestopp nach 100 μ L pro Well. Für beide Experimente wurden eigene Kompensationen, sowie Einstellungen der Laser und Detektoren etabliert, welche konstant über alle Messungen hinweg verwendet wurden. Vor allen Messungen erfolgte täglich eine Qualitätskontrolle am Gerät, sowie eine Re-Suspension der sedimentierten Zellen in den Wells.

3.2.2.9 Cytometric Bead Array (CBA) und Messung mittels Durchflusszytometrie

Diese Methode bedient sich der simultanen, quantitativen, durchflusszytometrischen Detektion mehrerer löslicher Proteine durch fluoreszenz-konjugierte Antikörper-Bead-Komplexe und ist als Set für verschiedene Protein-Kombinationen erhältlich. In diesem Fall wurde ein kommerzielles Kit für die humanen Zytokine Interleukin-2, -4, -6, -10, Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ verwendet. Dazu wurden zunächst die bei minus 20°C eingefrorenen Zellkulturüberstände auf Raumtemperatur erwärmt. 30 μ L des Überstands eines Versuchs wurden in je ein Well einer unsterilen 96-Well Mikrotiterplatte überführt und mit je 30 μ L des PE-Detektionsantikörpers gemischt. Anschließend wurden zu jedem Well 30 μ L einer Beads-Mischung gegeben und die Mikrotiterplatte für 3 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an eine Standard-Zentrifugation wurden 50 μ L des im Kit enthaltenen Wasch-Puffers zu jedem Well hinzugegeben und die Mikrotiterplatte unter speziellen Einstellungen zentrifugiert (siehe Tabelle 3-10 "CBA-Waschschritt"). Nach Invertieren der Platte und Abkippen des Überstands erfolgte eine Suspension der Antikörper-Bead-Zytokin-Komplexe in 200 μ L des Wasch-Puffers. Zur Messung wurde das CytoFLEX S -Zytometer verwendet. Bei einer Geschwindigkeit von 124 μ L/min wurde aus einem Well so lange Flüssigkeit aufgenommen, bis 1800 Events gezählt wurden.

Die Auswertung basierte auf der Bindung der PE-Detektionsantikörper an die Zytokine (und die Bindung dieser Komplexe an Beads) während der Inkubationszeit. Da die Beads für jedes der sechs Zytokine unterschiedliche Mengen des Farbstoffes APC enthalten, können sie im zweidimensionalen Dotplot an der Ordinate voneinander unterschieden werden. Die Menge der Zytokine korreliert mit der PE-Signalstärke und kann über die MFI quantifiziert werden (siehe Abbildung 3-3). Die Signalstärke des PE-Signals wird abschließend mittels einer (durch definierte Standardlösungen angefertigten) Standardkurve in pg/mL umgerechnet. Die so berechnete Konzentration eines Zytokins in den *in vitro* Ko-Kulturen soll als Korrelat für die Fähigkeit einer T-Zelle zur *ex vivo* Zytokin-Produktion herangezogen werden und damit Rückschlüsse auf die T-Zell-Fitness liefern.

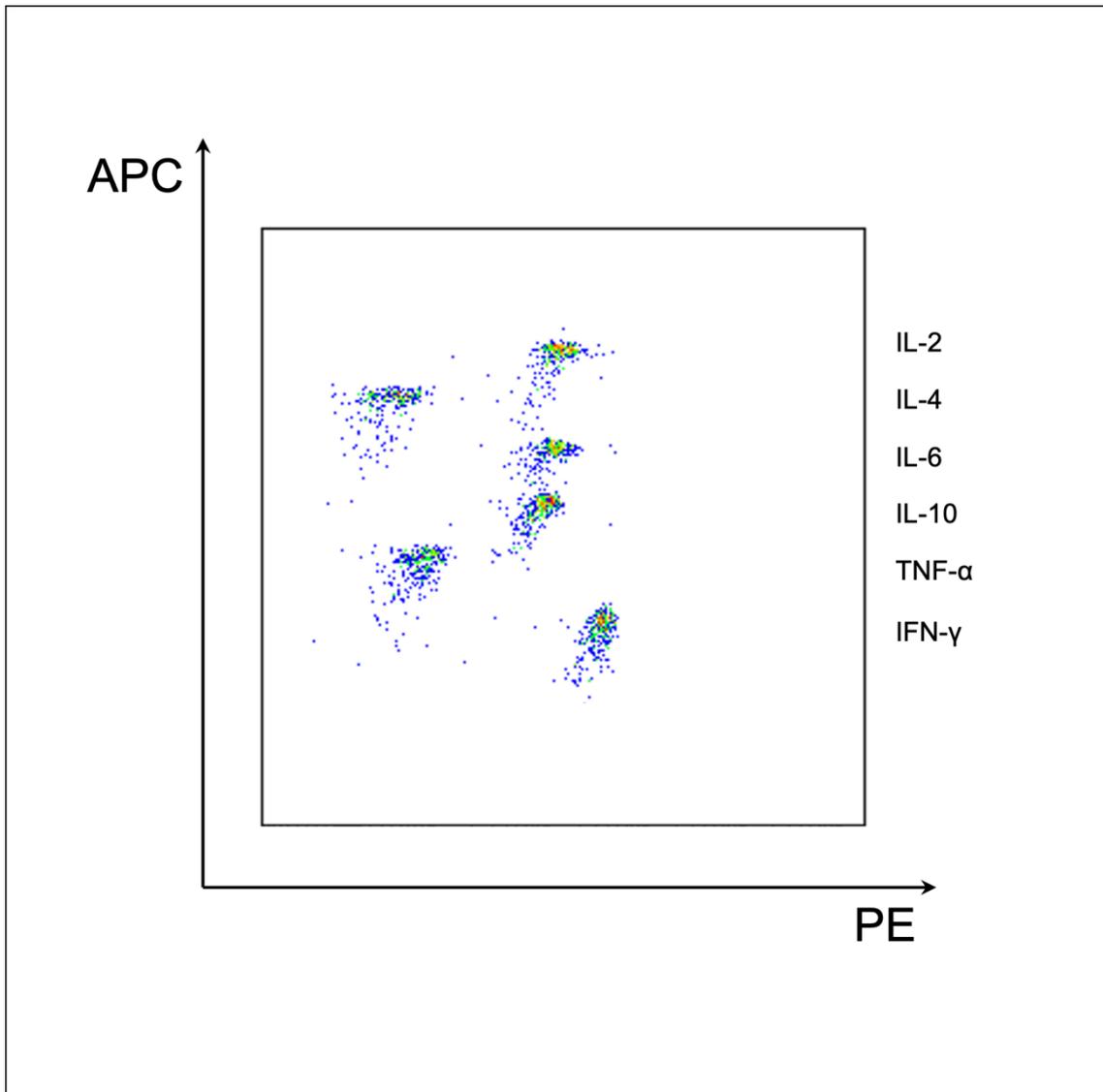


Abbildung 3-3: Unterscheidung der Zytokine im Dotplot eines CBA-Assays
Zellkultur-Überstände aus Zellkultur-Experimenten wurden mittels Cytometric Bead Array (CBA) auf die Konzentration von Zytokinen untersucht. Die einzelnen Populationen von oben nach unten stellen Interleukin-2, -4, -6, -10, Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ dar. Je stärker die PE-Signal-MFI einer Zytokin-Population, desto höher die Konzentration des Zytokins.

3.2.3 Datenverarbeitung und Statistik

Alle am Durchflusszytometer generierten Daten wurden anschließend mit dem Analyse-Programm FlowJo ausgewertet. Mithilfe der jeweiligen Gating-Strategien wurden die Events in Dotplots und Histogrammen dargestellt und sowohl graphisch als auch tabellarisch exportiert.

Die Gating-Strategie zur Analyse von T-Zellen aus den Zellkultur-Experimenten begann mit einem Ausschluss von sehr kleinen und kaum granulierten Events, welche sich im FSC-A/SSC-A (Forward Scatter Area, FSC-A; Sideward Scatter Area, SSC-A) -Dotplot nahe dem Ursprung befanden und am ehesten Zellbestandteile/ Zellschrott darstellten. Im zweiten Schritt wurden Dubletten

(zwei aneinanderhaftende Zellen, die als einziges Event detektiert werden) ausgeschlossen, welche aufgrund eines stark abweichenden Quotienten aus Höhe (Sideward Scatter Height, SSC-H) und Fläche (SSC-A) des vorwärtsgestreuten Lichts abseits einer gedachten Geraden im Dotplot lagen. Abschließend wurden nur viable Zellen in die Analyse eingeschlossen, die im Vergleich zu toten und apoptotischen Zellen deutlich weniger des Lebend-Tot-Farbstoffs aufnahmen (siehe obere Hälfte in Abbildung 3-4).

Für die BiTE-vermittelten Experimente wurden in einem Dotplot CD33-positive Tumorzellen von FarRed-positiven T-Zellen unterschieden. Mit einem Gate um alle FarRed-positiven T-Zell-Events und Multiplikation der Eventzahl x2 konnten absolute Zahlen von lebendigen T-Zellen bestimmt werden, da in den Messungen am Durchflusszytometer zuvor nur die Hälfte des gesamten Flüssigkeitsvolumens aufgenommen wurde. Innerhalb der T-Zellen war mithilfe von CD4- und CD8-Antikörpern eine weitere Subklassifikation der Zellen möglich. Die Proliferation der T-Zellen konnte anhand der Reduktion des FarRed-Signals quantifiziert werden. Dazu wurde im Histogramm des APC-Kanals der unbehandelten T-Zellen der Kontroll-Kondition ein Gate links des Peaks erstellt, welches weniger als zwei Prozent der FarRed-positiven Zellen beinhalten durfte. Dieses Gate wurde dann auf die korrespondierende stimulierte Kondition übertragen, sodass es alle T-Zellen erfasste, die sich mindestens einmal geteilt haben (siehe untere Hälfte in Abbildung 3-4).

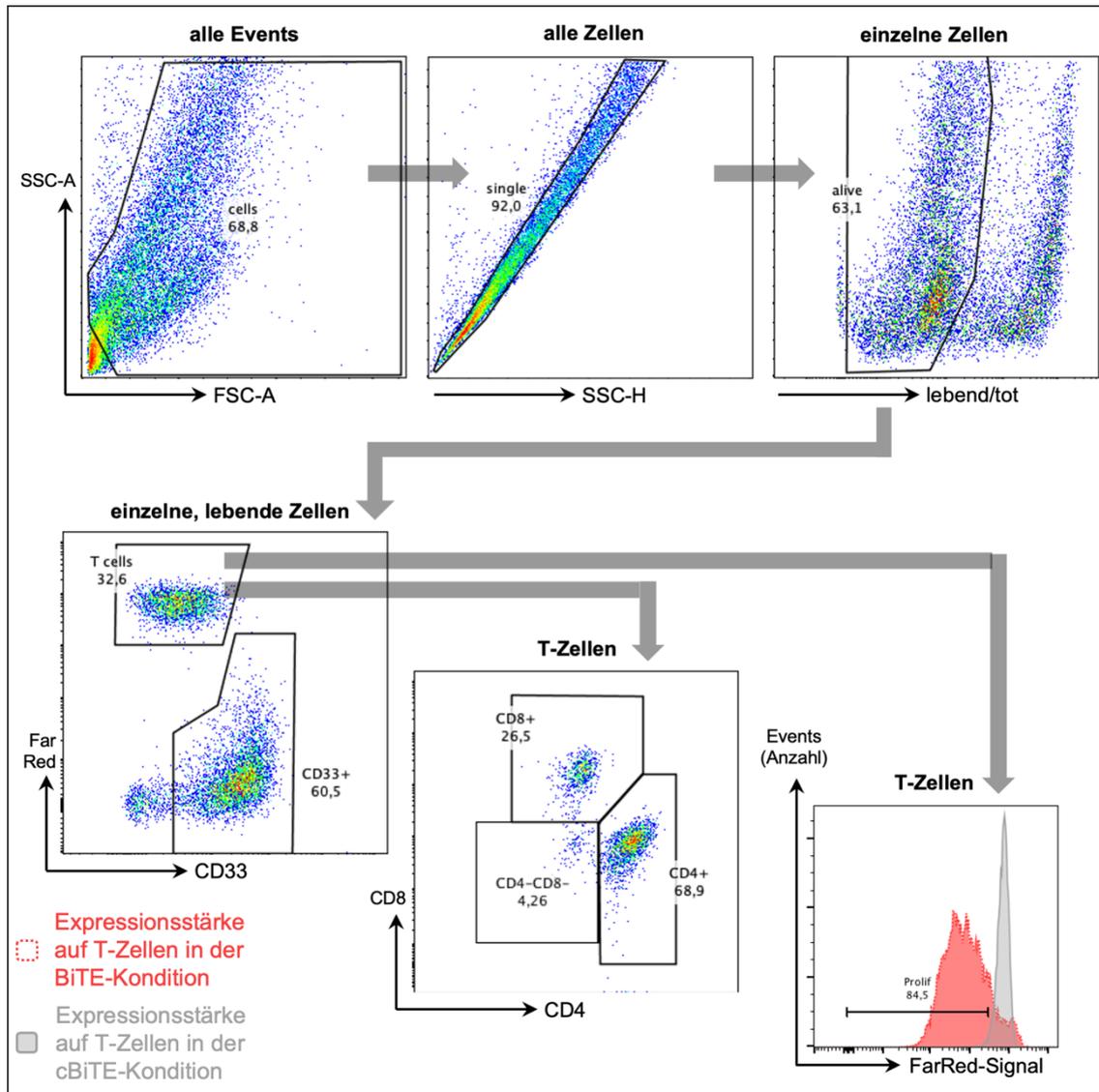


Abbildung 3-4: Gating-Strategie in den BiTE-vermittelten Experimenten

Es erfolgte ein Ausschluss von Zellschrott und Dubletten anhand des Forward und Sideward Scatters, sowie ein Einschluss von ausschließlich lebenden Zellen mit geringer Expression des Lebend-Tot-Farbstoffs. Diese Zellen waren entweder CD33⁺ Tumorzellen, oder FarRed⁺ T-Zellen. Mittels Antikörpern gegen CD4 und CD8 konnten T-Zellen weiter subklassifiziert werden. Die FarRed-Expression auf T-Zellen in der BiTE-Kondition im Vergleich zur cBiTE-Kondition gab Aufschluss über den Proliferationsgrad der T-Zellen.

Zusätzlich konnte in FlowJo mithilfe einer Funktion zur Analyse von Zellteilungen eine weitere Charakterisierung der proliferativen Kapazität von Patienten-T-Zellen vorgenommen werden. Dabei wurde ebenfalls die Tatsache genutzt, dass sich mit jeder Teilung einer T-Zelle die Expression des Membran-Farbstoffs FarRed halbierte. Eine graphische Darstellung der Verteilung von Events mit unterschiedlich starkem FarRed-Signal zeigt Abbildung 3-5. Durch Definition der Ausgangspopulation mit dem höchsten FarRed-Signal (nicht geteilte Zellen, *Undivided*) interpoliert das Programm die sukzessiven Tochter-Generationen mit jeweils halbiertes FarRed-Signalintensität. Basierend auf der Verteilung der Events in diesen (mit Ziffern durchnummerierten) Tochter-Generationen

errechnet das Programm einen Divisions-, Expansions-, Replikations- und Proliferationsindex. Der Divisionsindex gibt Auskunft über die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen, die eine Zelle der gesamten Ausgangspopulation erfahren hat. Der Expansionsindex zeigt die Vervielfachung der gesamten Ausgangspopulation an, während der Replikationsindex nur die Vervielfachung von sich teilenden Zellen einbezieht. Der Proliferationsindex ist der Quotient aus der Anzahl an Zellteilungen insgesamt geteilt durch die Anzahl an Zellen, die sich mindestens 1x geteilt haben.

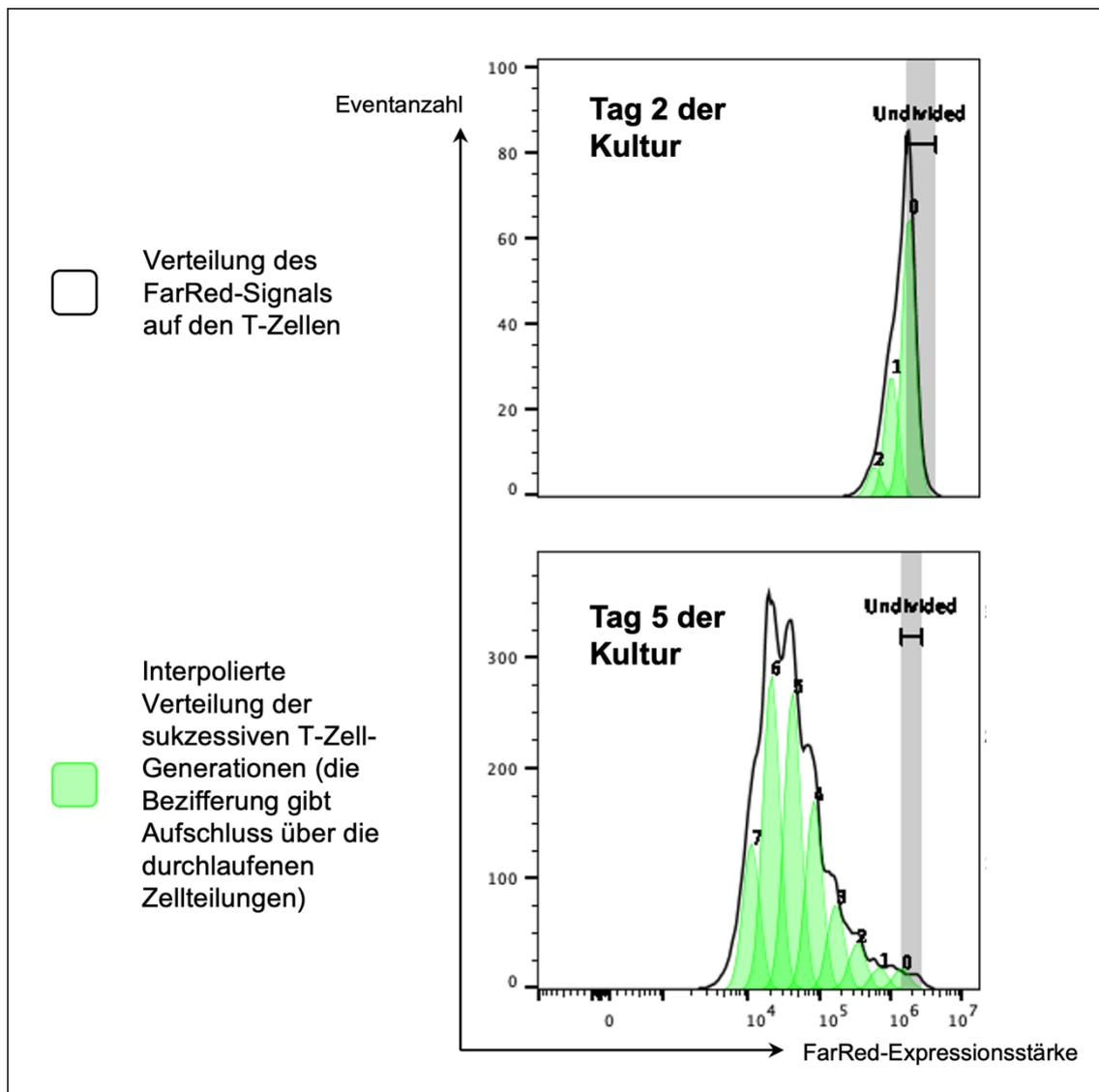


Abbildung 3-5: Proliferations-Analyse von T-Zellen

T-Zell-Proliferation aus Zellkultur-Experimenten an Tag 2 und 5 wurden mit Hilfe des Zellmembran-Farbstoffs FarRed quantifiziert. Durch eine Halbierung der FarRed-Expressionsstärke mit jeder Zellteilung konnten sukzessive T-Zell-Generationen (grün) in den Histogrammen der Gesamt-FarRed-Expression (schwarze Linie) interpoliert werden.

Zur Bestimmung der zytotoxischen Kapazität der T-Zellen eines Patienten in den BiTE-vermittelten Experimenten wurde die Berechnung der spezifischen Lyse

herangezogen. Dabei wurden die absoluten Zahlen lebendiger, CD33-positiver Tumorzellen in der BiTE- und cBiTE-Kondition verglichen:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Tumorzellen in BiTE - Kondition}}{\text{Tumorzellen in cBiTE - Kondition}}\right) \times 100$$

In den Bead-vermittelten Experimenten erfolgte eine ähnliche Analyse der T-Zellen. Im Unterschied zu den BiTE-vermittelten Experimenten wurde jedoch nur die Proliferation der T-Zellen untersucht, ohne Unterscheidung zwischen CD4- und CD8-positiven Zellen.

Zahlenwerte aus den klinisch erhobenen Daten, wie auch aus den exportierten Tabellen von FlowJo wurden anschließend in Microsoft Excel-Tabellen übertragen und gesammelt. Da es Unterschiede in der Zyklusdauer der unterschiedlichen Patienten gab, wurde der Zeitpunkt unmittelbar vor Therapiestart mit dem Zahlenwert 0 und der Zeitpunkt des letzten Therapietages mit dem Zahlenwert 1 definiert. Die Zeitpunkte dazwischen wurden entsprechend in Bruchteile von 1 umgerechnet und auf Viertel gerundet, sodass ein besserer Vergleich zwischen dem Therapie-Fortschritt der Patienten möglich war. Veränderungen von Zellzahlen und Messwerten im Therapieverlauf bzw. in der Zellkultur wurden als Vielfaches (*fold change*, fc) zu einem Referenzzeitpunkt (zum Zeitpunkt 0 vor Therapie/ zum Tag 0 der Zellkultur), oder der Kontrollkondition (zur cBiTE-Kontrolle in BiTE-vermittelten Experimenten/ zur Kontrolle ohne CD3/CD28-Beads in Bead-vermittelten Experimenten) angegeben.

Zur statistischen Analyse wurden die gesammelten Daten aus der Excel-Tabelle in das Programm GraphPad Prism importiert. Daten von Respondern (R, grün) und Non-Respondern (NR, rot) wurden gruppiert und mithilfe des zweiseitigen, nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests auf einem Signifikanzniveau von 5% verglichen. Dieser Test wurde gewählt, da es sich bei den Respondern und Non-Respondern um zwei nicht normalverteilte, unabhängige Gruppen handelte. Die n-Zahl variierte aufgrund der Datenverfügbarkeit bei Respondern von 0 bis 5 und bei Non-Respondern von 0 bis 6 und ist bei Signifikanz-Berechnungen jeweils angegeben. Weiterhin wurden die Daten mit GraphPad Prism in Diagrammen dargestellt und als Bilddateien exportiert. Wenn nicht anders angegeben handelt

es sich bei den graphischen Darstellungen um den Median der Werte der Responder (grün, mit gefülltem Kreissymbol und durchgängiger Linie) und der Non-Responder (rot, mit quadratischem Symbol und gepunkteter Linie) mit dem Interquartilsabstand (IQR) als Fehlerbalken. Diagramme und Graphiken wurden zuletzt dem Layout angepasst, wozu das Programm Microsoft Powerpoint benutzt wurde.

4. Ergebnisse

Im Zeitraum von 2016 bis 2020 wurden in der Medizinischen Klinik III der LMU 11 Patienten für die Therapie mit den Studienmedikamenten AMG 330 oder AMG 673 rekrutiert. Klinisch und experimentell erhobene Daten werden im Folgenden präsentiert. Wenn nicht anders angegeben wird auf den Median-Wert Bezug genommen.

4.1 Kohorten-Eigenschaften

Die Daten in dieser Dissertation stammen von 5 weiblichen und 6 männlichen Patienten. Das Alter der Patienten bei Beginn der Therapie mit einer AMG 330/AMG 673-Therapie reichte von 36 bis 75 Jahre mit einem medianen Alter von 59 Jahren. Da die Indikation für eine BiTE-Therapie bei AML erst bei refraktärer oder rezidivierter AML gegeben ist, lässt sich ein medianer Zeitraum zwischen letzter Therapie und Verabreichung des BiTE-Antikörpers berechnen. Dieser lag bei 10 Monaten, wobei sich der Zeitraum von einem Monat bis 7 Jahre erstreckte. Sechs Patienten erhielten in ihrer Vorgeschichte eine allogene HSZT (allo-HSZT), im Fall von Patient 5 erfolgten zwei allo-HSZT von verschiedenen Spendern. Die auf Mutations- und Zytogenetik-Analysen beruhende ELN-Klassifikation von 2022 zur prognostischen Risikostratifizierung ergab bei 6 Patienten eine ungünstige, bei 3 Patienten eine intermediäre, sowie bei 2 Patienten günstige Risikoklassifikation (siehe Tabelle 4-1). Die Relevanz der ELN-Klassifikation ist im rezidiert/refraktären Setting, wie hier bei den Patienten vorliegend, jedoch eingeschränkt.

Patientennummer	Alter, Geschlecht	ELN-Klassifikation (2022)	Vergangene Monate seit der letzten Therapie	Anzahl vorausgegangener allo-HSZT
1	61, m	ungünstig	10	1
2	75, w	ungünstig	11	0
3	38, m	ungünstig	25	1
4	42, m	intermediär	84	1
5	51, w	intermediär	2	2
6	59, w	günstig	36	0
7	61, w	günstig	22	1
8	36, m	ungünstig	1	1
9	55, m	intermediär	1	0
10	65, m	ungünstig	1	1
11	68, w	ungünstig	3	0

Tabelle 4-1: Patientencharakteristika

Fünf Patienten wurden mit einer kontinuierlichen Infusion von AMG 330 bei einer Startdosis von 10µg/d behandelt. Davon wurde in zwei Fällen über einen Zwischenschritt von 60µg/d auf eine Maximaldosis von 240µg/d erhöht. In einem Fall wurde direkt von der Startdosis auf 240µg/d erhöht, in einem anderen direkt auf 480µg/d. Der letzte AMG 330 Patient wurde über einen Zwischenschritt von 240µg/d mit einer Maximaldosis von 600µg/d behandelt.

Sechs Patienten wurden mit dem als Kurzinfusion applizierten Studienmedikament AMG 673 behandelt. In vier Fällen wurde zu beiden Applikationszeitpunkten dieselbe Dosis verwendet (18, 36, 72, oder 110µg). In einem Fall wurde die Dosis zur zweiten Infusion von 36 auf 72µg verdoppelt. Der letzte AMG 673 Patient erhielt über 14 Tage jeweils täglich eine Kurzinfusion in den Dosierungen 36µg an den ersten beiden, sowie 72µg an den darauffolgenden 12 Tagen.

Teilweise musste aufgrund von medizinischen Indikationen vom definierten Therapieschema abgewichen werden, beispielsweise wenn nicht tolerierbare Toxizität auftrat, sodass eine Therapiepause eingelegt werden musste (siehe X-Markierung (x) in Tabelle 4-2). Bei AMG 673 Patienten verzögerte sich dadurch die zweite Verabreichung der Kurzinfusion. AMG 330 Patienten erhielten eine Pausierung der Dauerinfusion mit später erneuter Steigerung der Dosis von

10µg/d bis zur Enddosierung. Begleitend wurde in zwei Fällen zeitweise eine Zellreduktion mittels Hydroxycarbamid (Litalir[®], siehe ^L in Tabelle 4-2) eingeleitet.

Die Anzahl der möglichen Experimente mit den Patientenzellen variierte aufgrund des limitierten Biomaterials und der teilweise geringen Anzahl an T-Zellen, sodass bei manchen Auswertungen nicht von allen Patienten Daten vorhanden sind. Eine Zusammenfassung der Therapieschemata von jedem Patienten, sowie an welchen Therapietagen T-Zellen aus Blutentnahmen (BE) für experimentelle Zwecke verwendet wurden zeigt Tabelle 4-2.

Patientennummer	Studien-Medikament	Therapieschema und Dosis in µg	Zeitpunkt 1. BE	Zeitpunkt 2. BE
1	AMG 673	18, 18	-	-
2	AMG 673	72, 72	Tag 5	Tag 12
3 ^L	AMG 330	10/d, 60/d, 240/d	Tag 7	Tag 29
4	AMG 330	10/d, 60/d, 240/d	Tag 4	Tag 6
5	AMG 330	10/d, 240/d	Tag 11	Tag 15
6	AMG 673	36, 36	-	Tag 8
7 ^x	AMG 330	10/d, 480/d, 10/d, 240/d, 480/d	Tag 15	Tag 27
8 ^x	AMG 330	10/d, 240/d, 10/d, 240/d, 600/d	Tag 7	Tag 43
9 ^{L, x}	AMG 673	110, 110	Tag 5	Tag 14
10	AMG 673	36, 72	Tag 4	-
11	AMG 673	36, 36, 72 (x12)	Tag 4	Tag 15

Tabelle 4-2: Therapieschemata und Zeitpunkte der Blutentnahmen (BE)

^x markiert Patienten mit Therapiepause aufgrund nicht tolerierbarer Toxizität; ^L markiert Patienten mit zum Teil begleitender zellreduzierender Therapie mit Litalir[®]

4.2 Therapieansprechen

Der Myeloblastenanteil im KM-Ausstrich vor Therapiestart reichte von 8 bis 91% mit einem Median von 31%. Im Anschluss an die Therapie reichte der Myeloblastenanteil von 2 bis 82% mit einem Median von 26%. Die prozentuale Veränderung des Myeloblastenanteils erstreckte sich damit von -85% bis +195% mit einem Median von -23%. Beim Patienten 10 waren die KM-Ausstriche fraglich repräsentativ, sodass anstatt der Veränderung des Myeloblastenanteils eine Erhöhung des Granulozytenanteils im peripheren Blut bei gleichzeitig klinischer Besserung des Allgemeinzustandes als Therapie-Ansprechen gewertet wurde. Die absolute Granulozytenzahl bei diesem Patienten verbesserte sich von einem

Wert vor Therapie von 1,09 G/l und 12% segmentkernigen Granulozyten auf nach Therapie 5,28 G/l und 32% segmentkernige Granulozyten. Basierend auf den im Abschnitt 3.2.1.4 "Definition von Therapieansprechen" genannten Kriterien wurden somit fünf Responder identifiziert (siehe Tabelle 4-3). Die Ansprechrate (die jedoch nicht den sonst für die AML üblichen Ansprechkriterien, wie z.B. in der ELN-Klassifikation definiert, entspricht) für eine Therapie mit AMG 330 oder AMG 673 lag damit in dieser Kohorte bei 45,5%.

Patienten- Nummer, Gruppen- einteilung	Myeloblastenanteil im KM-Ausstrich vor Therapie in %	Myeloblastenanteil im KM-Ausstrich nach Therapie in %	Veränderung des Myelo- blastenanteils in %
1, NR	8	6	-25
2, NR	72	80	+11
3, NR	80	62	-23
4, R	40	6	-85
5, R	12	6	-50
6, R	24	12	-50
7, NR	21	62	+195
8, NR	55	78	+42
9, NR	91	70	-23
10, R*	31	26	-16
11, R	8	2	-75

Tabelle 4-3: Therapieansprechen basierend auf prozentualer Abnahme des Myeloblastenanteils im KM-Aspirat im Vergleich vor/nach BiTE-Therapie

* kennzeichnet einen Patienten, welcher aufgrund fraglicher Repräsentativität des KM-Aspirats anhand eines Granulozytenanstiegs bei klinischer Besserung als Responder eingeordnet wurde.

4.3 Ergebnisse aus klinisch erhobenen Daten im Therapieverlauf

4.3.1 Daten aus der Routine-Hämatologie

Daten der Routine-Hämatologie ergaben für Responder eine geringere Absolutzahl an Leukozyten im peripheren Blut im gesamten Therapieverlauf (siehe Abbildung 4-1, oben links). Myeloblasten waren dabei prozentual bei Respondern vor Therapie und im gesamten Therapieverlauf erniedrigt (Abbildung 4-1, oben rechts). Eine Analyse der Fläche unter den Graphen (*Area under the curve*, AUC) der Absolutzahl der Myeloblasten im Therapieverlauf zeigte signifikant geringere Myeloblasten-Ausschwemmung bei Respondern

($p=0,0303$; 5R, 6NR; Abbildung 4-1, unten links). Die Absolutzahl der Myeloblasten im peripheren Blut in G/l vor Start der Therapie, also zum Zeitpunkt 0, war ebenfalls signifikant niedriger bei Respondern als bei Non-Respondern (0 vs. 3,99 G/l; $p=0,0238$; 5R, 5NR, Abbildung 4-1, unten rechts).

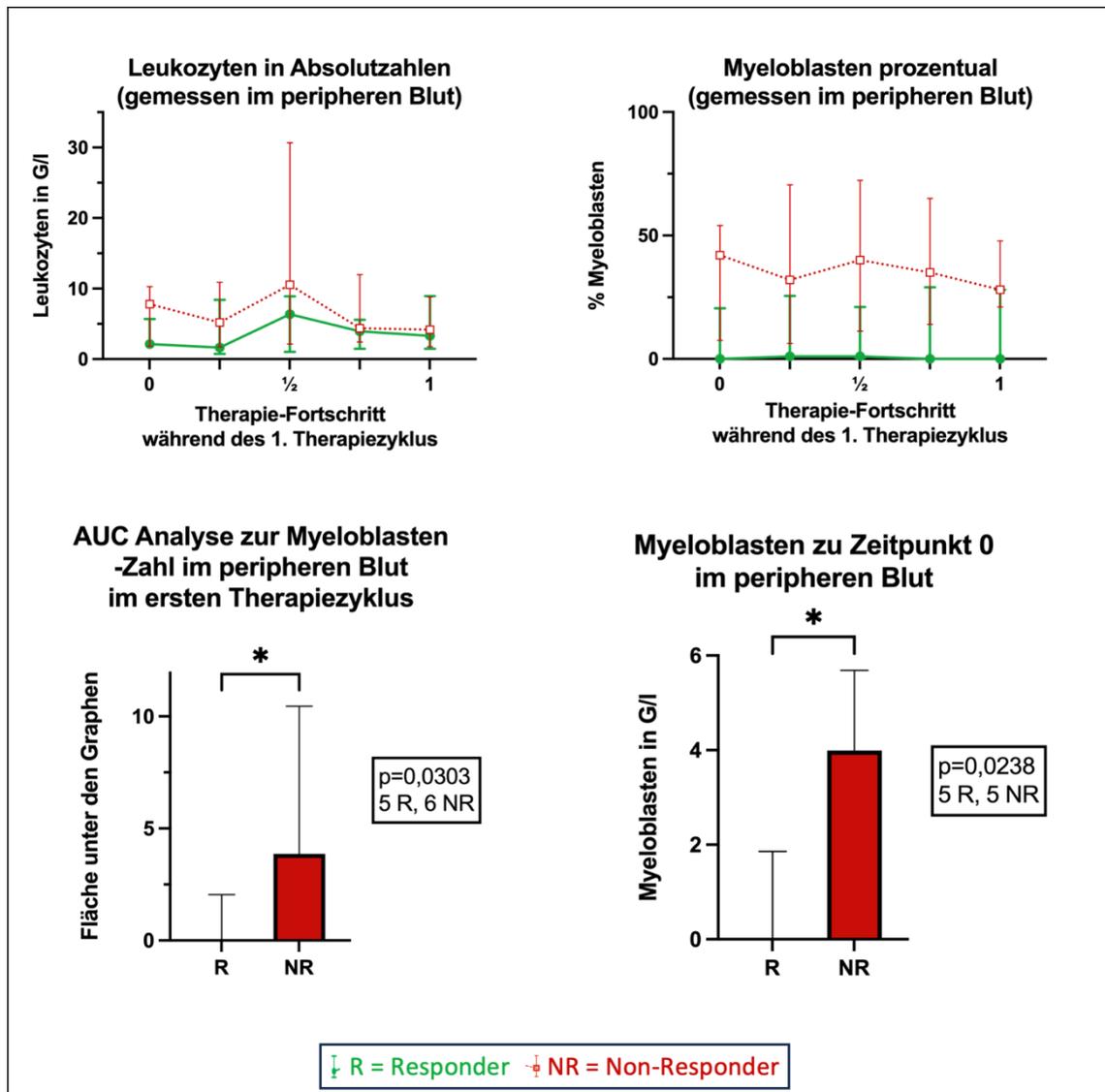


Abbildung 4-1: Analyse der Leukozyten und Myeloblasten im peripheren Blut Responder (R, grün) und Non-Responder (NR, rot).

Oben links: Leukozyten in Absolutzahlen in G/l gemessen im peripheren Blut im ersten Therapiezyklus.

Oben rechts: Prozentualer Myeloblastenanteil an Leukozyten im peripheren Blut im ersten Therapiezyklus.

Unten links: Vergleich der AUC von Myeloblasten-Absolutzahlen im peripheren Blut zwischen R/NR im ersten Therapiezyklus.

Unten rechts: Vergleich der Myeloblasten-Absolutzahl im peripheren Blut zwischen R/NR zu Zeitpunkt 0.

Bei Respondern und Non-Respondern zeigte sich unmittelbar nach Einleitung der BiTE-Therapie in ähnlichem Umfang ein Abfall der Lymphozyten. Im Therapieverlauf durchschritt der prozentuale Lymphozytenanteil an allen Leukozyten im peripheren Blut circa zur Hälfte des ersten Therapiezyklus den Nadir und erholten sich bis zum Ende auf nahezu prätherapeutische Werte. Der

Lymphozytenanteil sank bei Respondern von im Median 33% vor Therapie auf einen Minimalwert von 7% zum Therapiezeitpunkt $\frac{3}{4}$, bei Non-Respondern von 35% auf 8,5% zum Therapiezeitpunkt $\frac{1}{4}$. Bei Therapieende lagen die Werte bei 35% bzw. 28,5% (siehe Abbildung 4-2, oben links).

Der prozentuale Anteil CD3-positiver T-Zellen an allen Lymphozyten in FACS-Messungen des Immunmonitorings im BiTE-Panel ergab für Responder im Therapieverlauf höhere Werte als für Non-Responder (wobei zu Therapiezeitpunkt $\frac{1}{2}$ bei Respondern für diese Messung nur ein Wert vorliegt, was in Abbildung 4-2 mit einem Stern (*) markiert ist). Der Kurvenverlauf zeigte einen initialen Abfall an CD3-positiven Events mit einem Tiefpunkt zur Hälfte des ersten Zyklus und Erholung der Werte bis zum Ende der Therapie. Bei Respondern sank der Wert von 88,4% auf 46,8% und stieg erneut auf 66,7% an. Bei Non-Responder sank der Wert von 68,1% auf 10,6% und erreichte zum Therapieende 50,1% (Abbildung 4-2, oben rechts). Die Berechnung der Absolutzahlen der T-Zellen ergab einen Abfall von 0,54 G/l vor Therapie auf 0,07 G/l zum Zeitpunkt $\frac{1}{4}$ bei Respondern, bzw. von 1,47 G/l auf 0,05 G/l bei Non-Respondern. Zum Therapieende stieg dieser Wert auf 0,31 G/l bzw. 0,21 G/l. Ein Vergleich der Absolutzahlen der T-Zellen zwischen Respondern und Non-Respondern zum Therapiezeitpunkt 0 ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,5714$; 5R, 3NR; Abbildung 4-2, untere Reihe). Die weitere Charakterisierung der T-Zellen im peripheren Blut der Patienten erfolgt in Abschnitt 4.3.4 "Daten aus den im Immunmonitoring mittels BiTE-panel durchflusszytometrisch erhobenen Messungen".

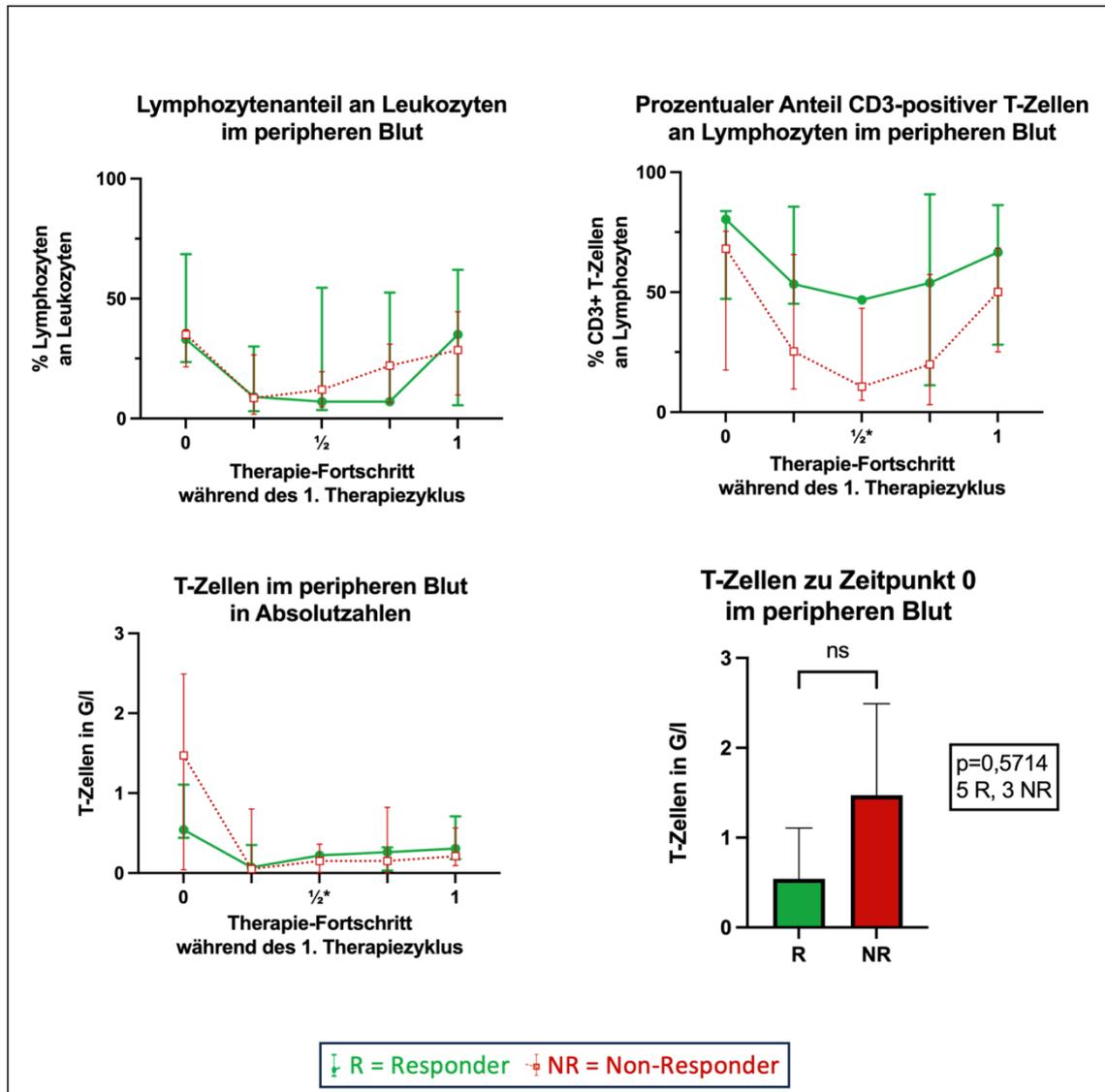


Abbildung 4-2: Analyse der Lymphozyten- und T-Zell-Anteile im peripheren Blut Responder (R, grün) und non-Responder (NR, rot); * markiert einen Therapiezeitpunkt, bei dem in der Gruppe der Responder nur ein Messwert vorlag.

Oben links: Prozentualer Lymphozytenanteil an Leukozyten im peripheren Blut im Therapieverlauf.
Oben rechts: Prozentualer Anteil an CD3-positiven T-Zellen an Lymphozyten im peripheren Blut im Therapieverlauf.

Unten links: T-Zellen im peripheren Blut in G/l im Therapieverlauf.

Unten rechts: Vergleich der T-Zellen Absolutzahlen im peripheren Blut zwischen R/NR zu Zeitpunkt 0.

4.3.2 Effektor- zu Target-Ratio im Knochenmark

Zytomorphologische Untersuchungen der KM-Aspirate vor und nach Therapie wurden zur Berechnung einer E:T-Ratio im Knochenmark im Sinne eines Lymphozyten- zu Myeloblasten-Verhältnisses genutzt. Bei Respondern stieg die E:T-Ratio unter Therapie von 0,75 auf 1,0 an, bei Non-Respondern fiel sie von 0,47 auf 0,27 ab. Der Unterschied vor Therapie war nicht signifikant ($p=0,5022$; 5R, 6NR; siehe Abbildung 4-3, obere Reihe).

Eine exaktere Berechnung der E:T-Ratio im Knochenmark mit Hilfe des T-Zell- zu Myeloblasten-Verhältnisses in der Durchflusszytometrie ergab einen Anstieg der E:T-Ratio von 0,56 auf 0,96 bei Respondern und einen Abfall von 0,14 auf 0,08 bei Non-Respondern. Der Unterschied vor Therapie war signifikant ($p=0,0397$; 4R, 5NR; Abbildung 4-3, untere Reihe).

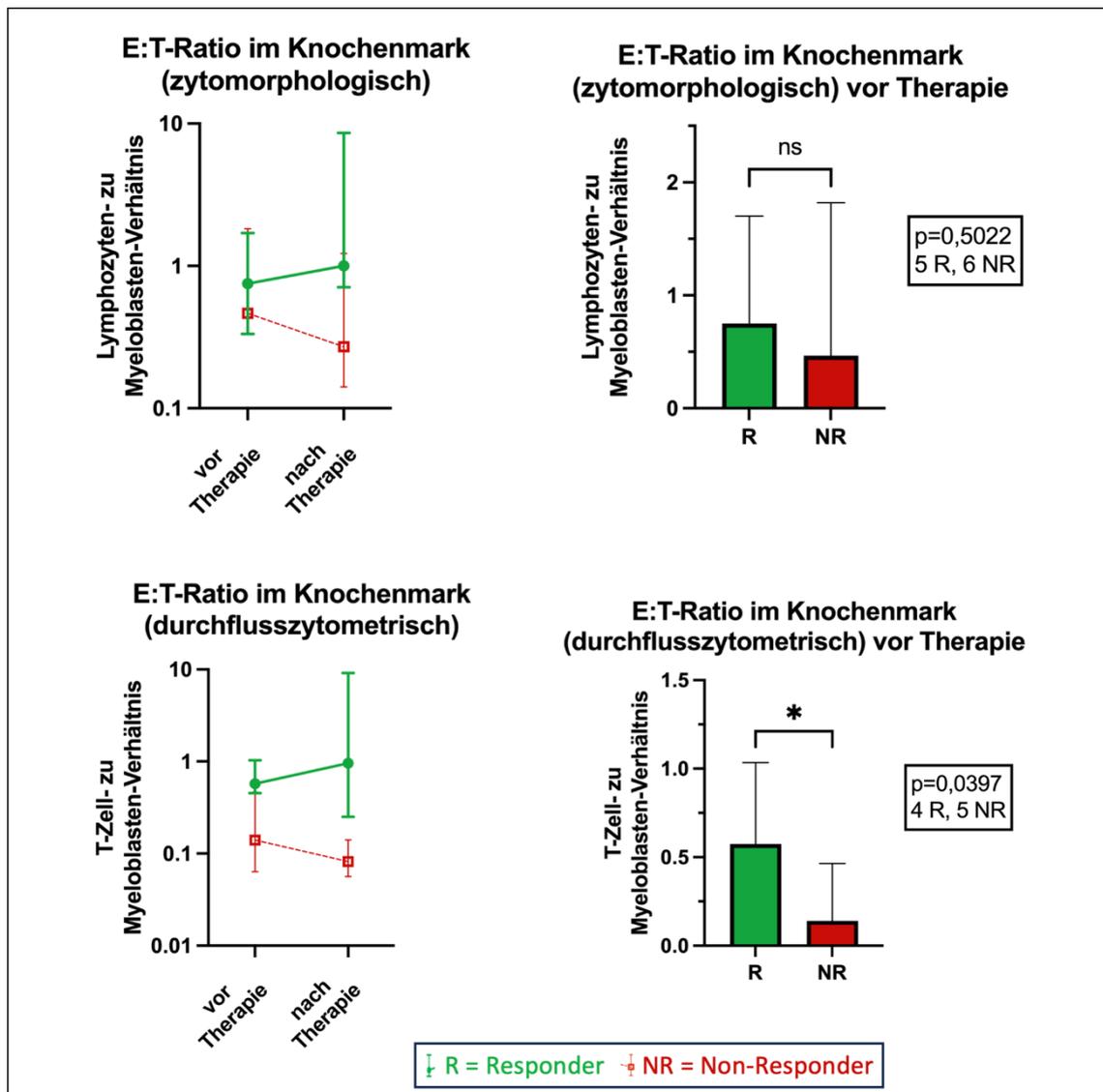


Abbildung 4-3: Untersuchung der E:T-Ratio im Knochenmark

Responder (R, grün) und Non-Responder (NR, rot).

Oben links: Zytomorphologisch erhobenes Lymphozyten- zu Myeloblasten-Verhältnis, vor und nach Therapie.

Oben rechts: Vergleich der zytomorphologisch erhobenen E:T-Ratio zwischen R/NR vor Therapie.

Unten links: Durchflusszytometrisch erhobenes T-Zell- zu Myeloblasten-Verhältnis, vor und nach Therapie.

Unten rechts: Vergleich der durchflusszytometrisch erhobenen E:T-Ratio zwischen R/NR vor Therapie.

4.3.3 Daten aus der Routine-Serumchemie

Untersuchungen aus der Routine-Serumchemie ergaben CRP-Werte von 0,6mg/dl bis 5,9mg/dl für alle Patienten. Zu Zeitpunkt 0 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern

($p=0,0887$; 5R, 6NR, siehe Abbildung 4-4, obere Reihe). Der LDH-Wert stieg bei Respondern im Therapieverlauf von im Median 164U/l auf 189U/l an und lag niedriger als bei Non-Respondern, für die der Median im Therapieverlauf von 314U/l auf 384U/l anstieg. Zu Zeitpunkt 0 waren die LDH-Werte bei Respondern signifikant niedriger ($p=0,0087$, 5R, 6NR; Abbildung 4-4, untere Reihe).

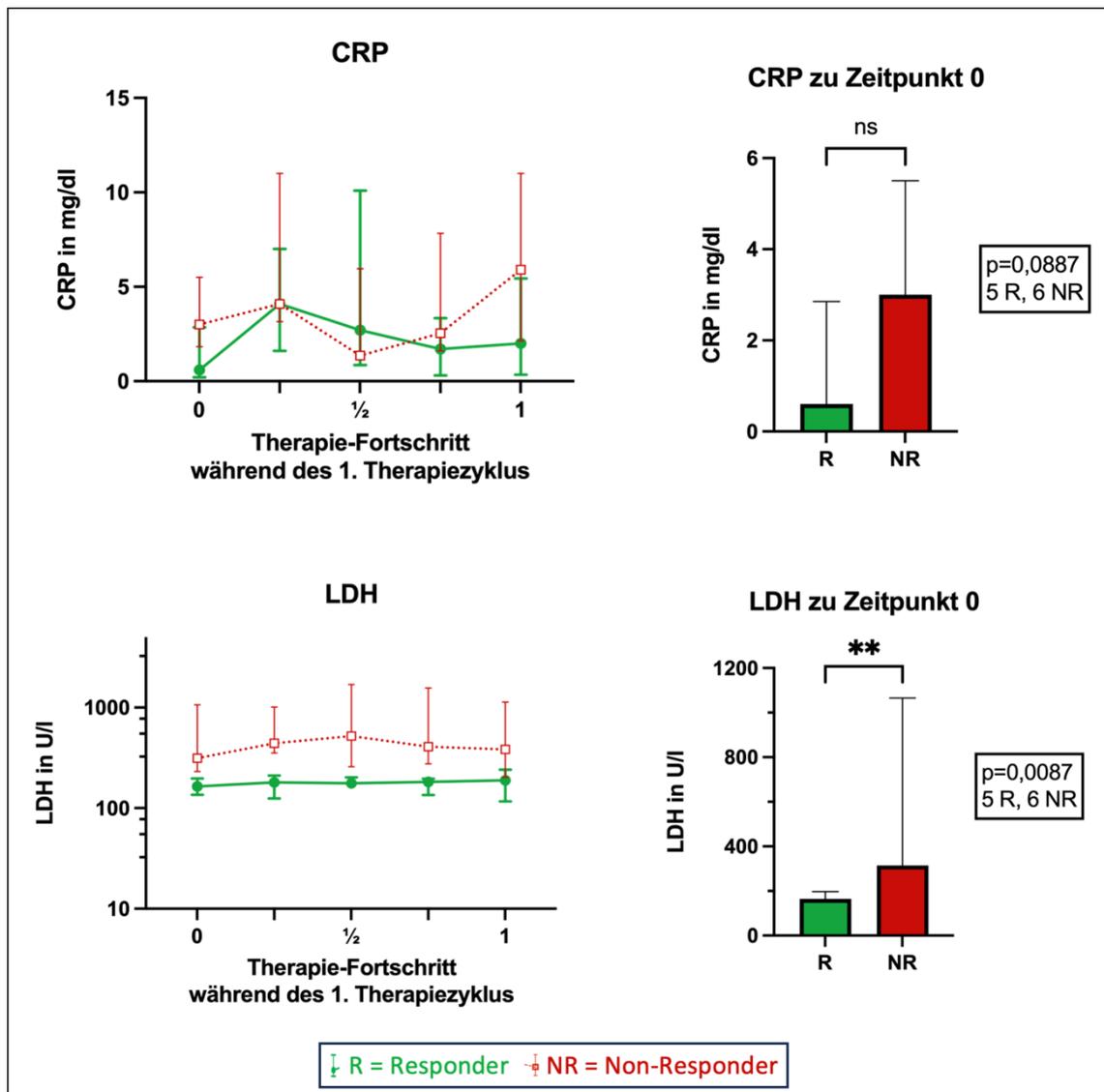


Abbildung 4-4: Untersuchung der CRP- und LDH-Werte Responder (R, grün) und non-Responder (NR, rot).
 Oben links: CRP in mg/dl im Therapieverlauf.
 Oben rechts: Vergleich der CRP-Werte zwischen R/NR zu Zeitpunkt 0.
 Unten links: LDH in U/l im Therapieverlauf.
 Unten rechts: Vergleich der LDH-Werte zwischen R/NR zu Zeitpunkt 0.

4.3.4 Daten aus den im Immunmonitoring mittels BiTE-Panel durchflusszytometrisch erhobenen Messungen

Im Immunmonitoring wurden die PBMC von Patienten im Therapieverlauf weiter charakterisiert. Alle Messungen vor Therapiestart unterschieden sich bei

geringen n-Zahlen nicht signifikant zwischen Respondern und Non-Respondern. In der Gruppe der Responder waren zu machen Therapie-Zeitpunkten ≤ 2 Messungen (insbesondere zur Hälfte des Therapie-Fortschritts nur ein Messwert) vorhanden, welche mit einem Stern (*) in den Diagrammen markiert wurden.

Der prozentuale Lymphozyten-Anteil (bestimmt als Anteil von $CD45^{+}SSC^{low}$ -Zellen an allen PBMC) war bei Respondern im Therapieverlauf konstant höher als bei Non-Respondern. Gegensätzlich verhielt es sich mit dem prozentualen Myeloblasten-Anteil (bestimmt als Anteil von $CD45^{dim}SSC^{low}CD3^{-}$ -Zellen an allen PBMC). Die E:T-Ratio im peripheren Blut, berechnet als Verhältnis der Anteile von CD3-positiven T-Zellen und Myeloblasten an allen PBMC, war bei Respondern konstant höher (siehe Abbildung 4-5).

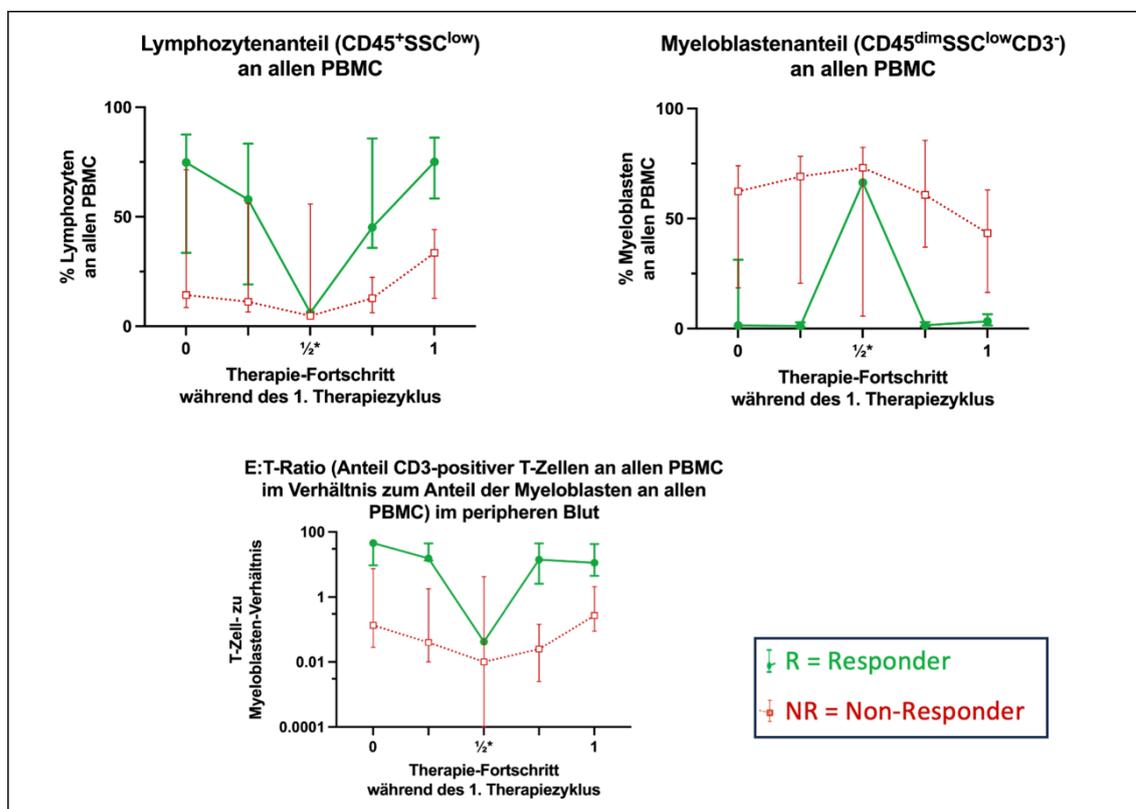


Abbildung 4-5: Durchflusszytometrische Untersuchung der PBMC mittels BiTE-Panel Responder (grün) und non-Responder (rot); * markiert Therapiezeitpunkte, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen.
 Oben links: Lymphozyten in % aller PBMC im Therapieverlauf.
 Oben rechts: Myeloblasten in % aller PBMC im Therapieverlauf.
 Unten: E:T-Ratio im peripheren Blut im Therapieverlauf, als Anteil CD3-positiver T-Zellen im Verhältnis zum Anteil der Myeloblasten an allen PBMC.

Die Unterteilung der CD3-positiven T-Zellen in CD4- und CD8-positive T-Zellen, sowie die Berechnung von deren Verhältnis (CD4:CD8-Ratio) ergab für Responder und Non-Responder ähnliche Ergebnisse. Die Kurvenverläufe ähnelten sich in beiden Gruppen und zeigten gleichgerichtete, abwechselnde An-

und Abstiege in überwiegend ähnlichem Umfang. Die CD4:CD8-Ratio reichte in beiden Gruppen im Median von 0,58 bis 1,89 (siehe Abbildung 4-6).

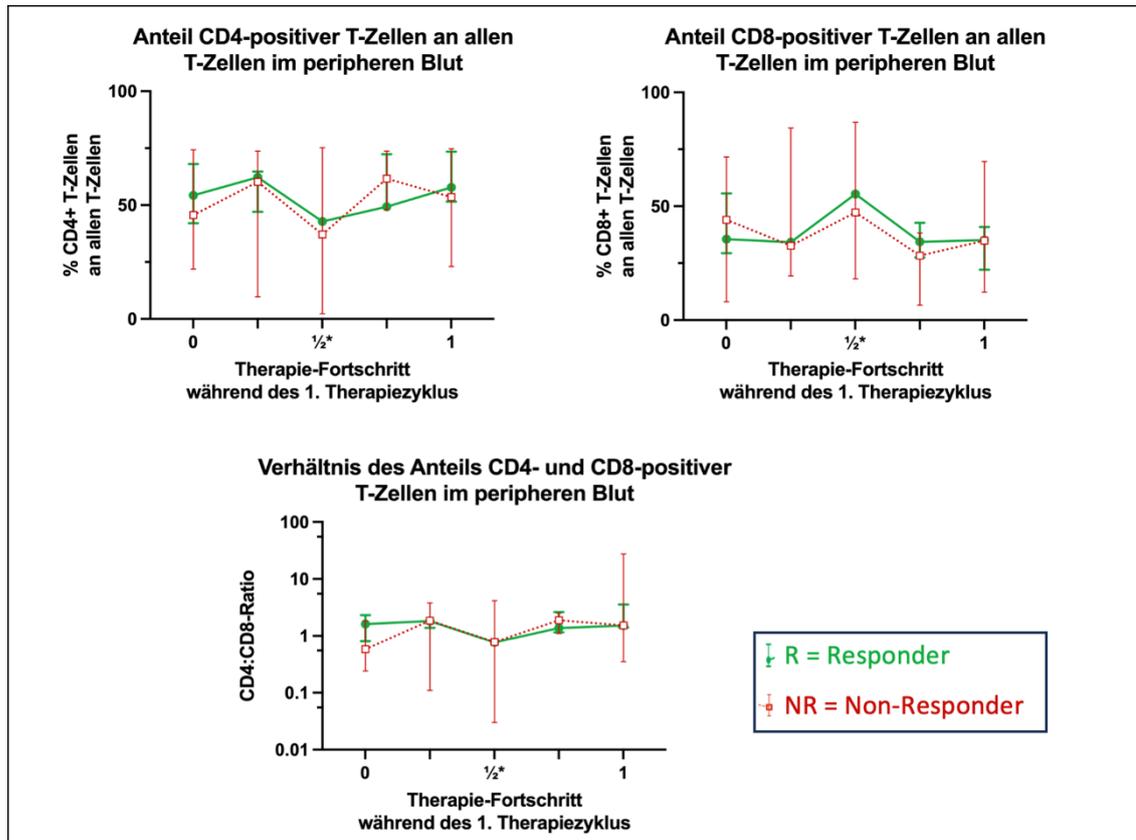


Abbildung 4-6: Verteilung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen im peripheren Blut Responder (grün) und non-Responder (rot); * markiert Therapiezeitpunkte, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen.

Oben links: CD4-positiv T-Zellen in % aller T-Zellen im Therapieverlauf.

Oben rechts: CD8-positiv T-Zellen in % aller T-Zellen im Therapieverlauf.

Unten: Verhältnis der CD4- zu CD8-positiven T-Zellen als CD4:CD8-Ratio im Therapieverlauf.

Weiterhin erfolgte eine Subklassifizierung von T-Zellen in naive, CM-, EM- und EMRA-positive T-Zellen (Gating-Strategie siehe Abbildung 3-1). Die Verteilung der Subsets zeigte bei Respondern und Non-Respondern eine ähnliche Dynamik mit initialem Abfall der naiven und CM-T-Zell-Anteile bei gleichzeitigem Anstieg des EM-T-Zell-Anteils (siehe Abbildung 4-7). Zur Hälfte des Therapie-Fortschritts sank der EM-T-Zell-Anteil wieder ab, während der Anteil naiver T-Zellen anstieg. EM-T-Zellen stellten zu den meisten Therapiezeitpunkten die größte Subgruppe dar. Der Anteil EMRA-positiver T-Zellen im Therapieverlauf bei Non-Respondern stieg von 14,5% auf 23,5% zur Hälfte der Therapie und sank auf 11,6% zum Ende der Therapie. Bei Respondern sank dieser Wert von anfangs 28,7% auf abschließend 17,3%. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen Respondern und Non-Respondern, noch über den Zeitverlauf der Therapie.

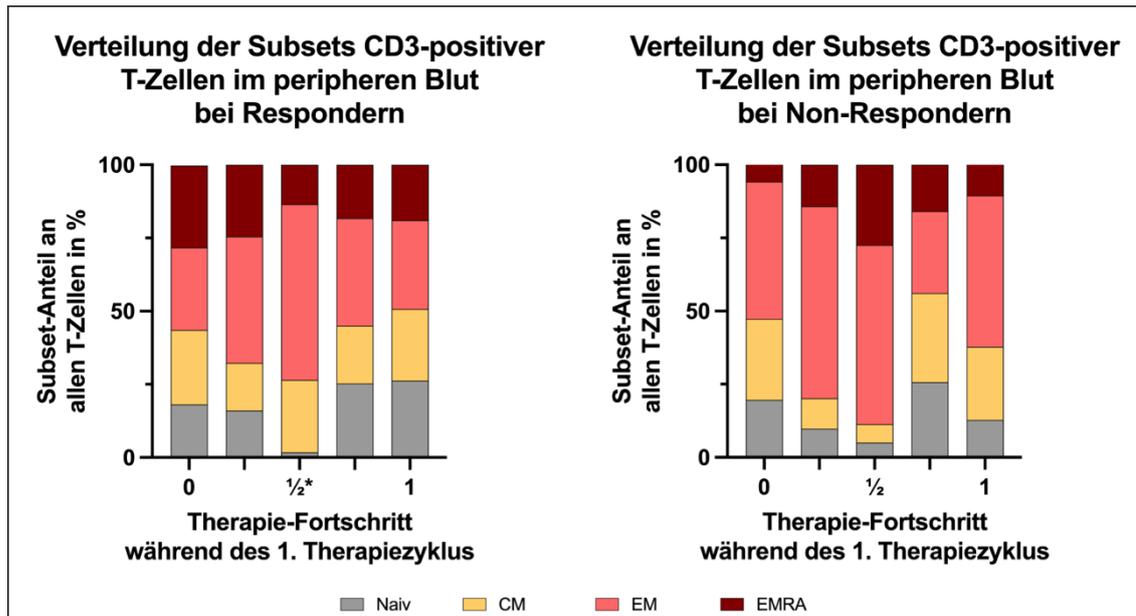


Abbildung 4-7: Verteilung der T-Zell-Subsets in % im peripheren Blut Responder (linke Abbildung) und Non-Responder (rechte Abbildung); * markiert einen Therapiezeitpunkt, zu dem in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen.
 Graue Farbe: Anteil von naiven T-Zellen an allen CD3-positiven T-Zellen.
 Gelbe Farbe: Anteil von CM-T-Zellen an allen CD3-positiven T-Zellen.
 Hellrote Farbe: Anteil von EM-T-Zellen an allen CD3-positiven T-Zellen.
 Dunkelrote Farbe: Anteil von EMRA-T-Zellen an allen CD3-positiven T-Zellen.

Auf T-Zellen wurde die Expression des Aktivierungs-Markers CD69, sowie die Expression der Immun-Checkpoint-Marker LAG-3, TIM3 und TIGIT quantifiziert. Die CD69-Expression bei Respondern betrug maximal 28% zum Ende des Therapie-Fortschritts, während Non-Responder nach einem Viertel des Therapie-Fortschritts einen Maximalwert von 47% erreichten. LAG-3 war vor und nach Therapie kaum auf T-Zellen exprimiert, erreichte jedoch zur Hälfte der Therapie einen Maximalwert von 7,1% bei Respondern und 13,7% bei Non-Respondern. TIM3 war in beiden Gruppen zu Beginn der Therapie nicht auf T-Zellen exprimiert, wurde jedoch im Verlauf hochreguliert und erreichte bei drei Vierteln des Therapie-Fortschritts einen Maximalwert von 18,1% bei Respondern bzw. 25,2% bei Non-Respondern. Die TIGIT-Expression stieg in beiden Gruppen initial an und fiel zum Ende der Therapie wieder ab. Responder erreichten Maximalwerte von 44,9% nach drei Vierteln des Therapie-Fortschritts, Non-Responder Maximalwerte von 49,3% nach einem Viertel des Therapie-Fortschritts (siehe Abbildung 4-8).

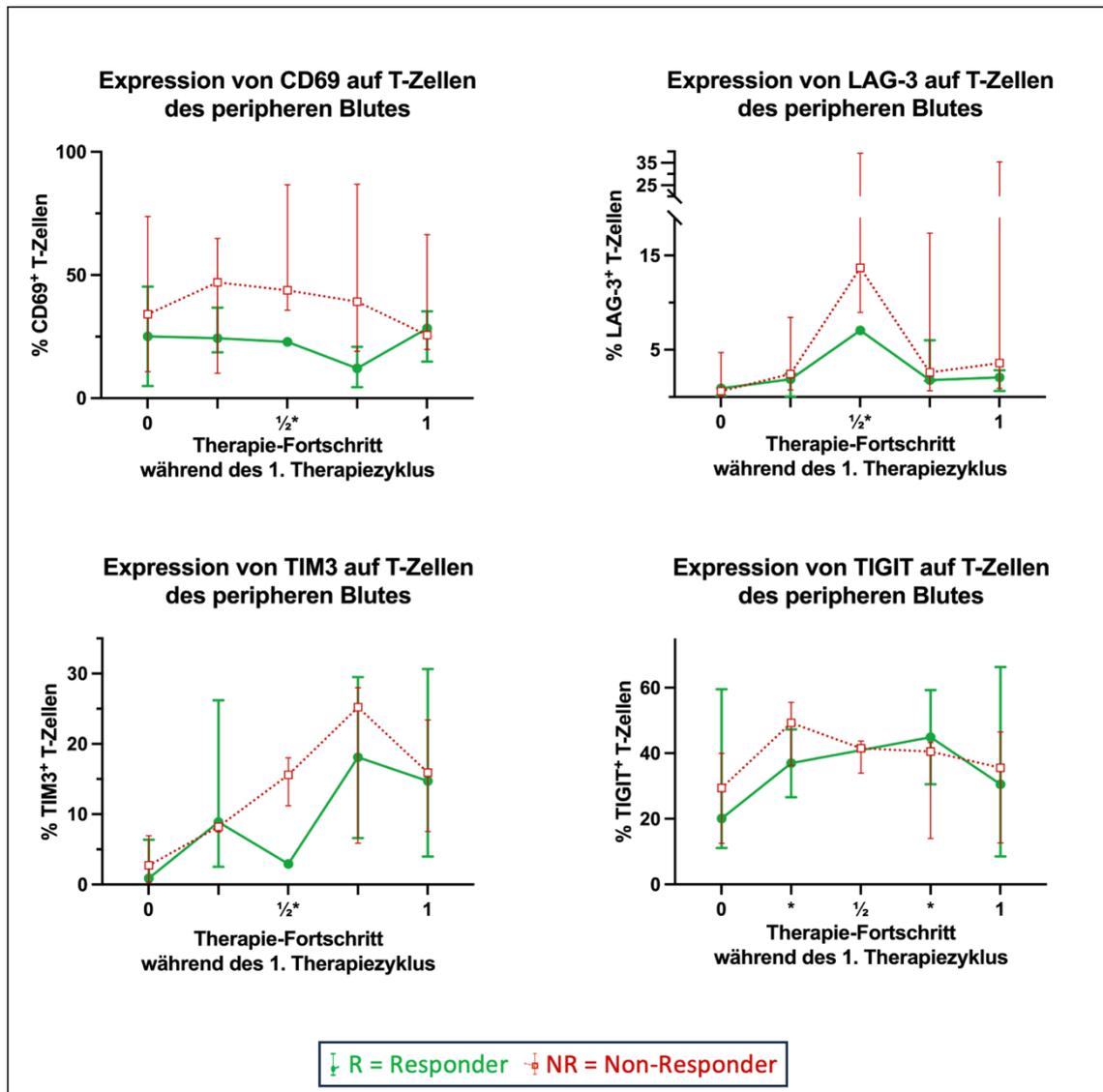


Abbildung 4-8: Aktivierungs- und Immun-Checkpoint-Marker auf T-Zellen im peripheren Blut
 Responder (grün) und Non-Responder (rot); * markiert Therapiezeitpunkte, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen.

Oben links: Anteil CD69-positiver T-Zellen an allen T-Zellen in % im Therapieverlauf.

Oben rechts: Anteil LAG-3-positiver T-Zellen an allen T-Zellen in % im Therapieverlauf.

Unten links: Anteil TIM3-positiver T-Zellen an allen T-Zellen in % im Therapieverlauf.

Unten rechts: Anteil TIGIT-positiver T-Zellen an allen T-Zellen in % im Therapieverlauf.

Zusätzlich wurde die Expression des Checkpoint-Markers PD-1 auf T-Zellen, sowie die Expression von dessen Liganden PD-L1 auf Myeloblasten quantifiziert. Während bei Respondern die PD-1-Expression bei Werten vor Therapie von 64,3% bis 61,7% zum Ende der Therapie stabil war, zeigten Non-Responder eine deutliche Erhöhung von 52,9% auf 87%. Der Oberflächenmarker PD-L1 auf Myeloblasten hingegen, welcher als Ligand von PD-1 fungiert, zeigte im Therapieverlauf unspezifische Änderungen mit einer großen Streuung der Messwerte in beiden Patienten-Gruppen. Zuletzt wurde die CD33-Expression auf Myeloblasten (wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben) quantifiziert, welche bei

Respondern vor und zum Ende der Therapie 56% betrug. Non-Responder zeigten leicht erhöhte Werte mit 69,3% vor und 79,1% zum Ende der Therapie (siehe Abbildung 4-9).

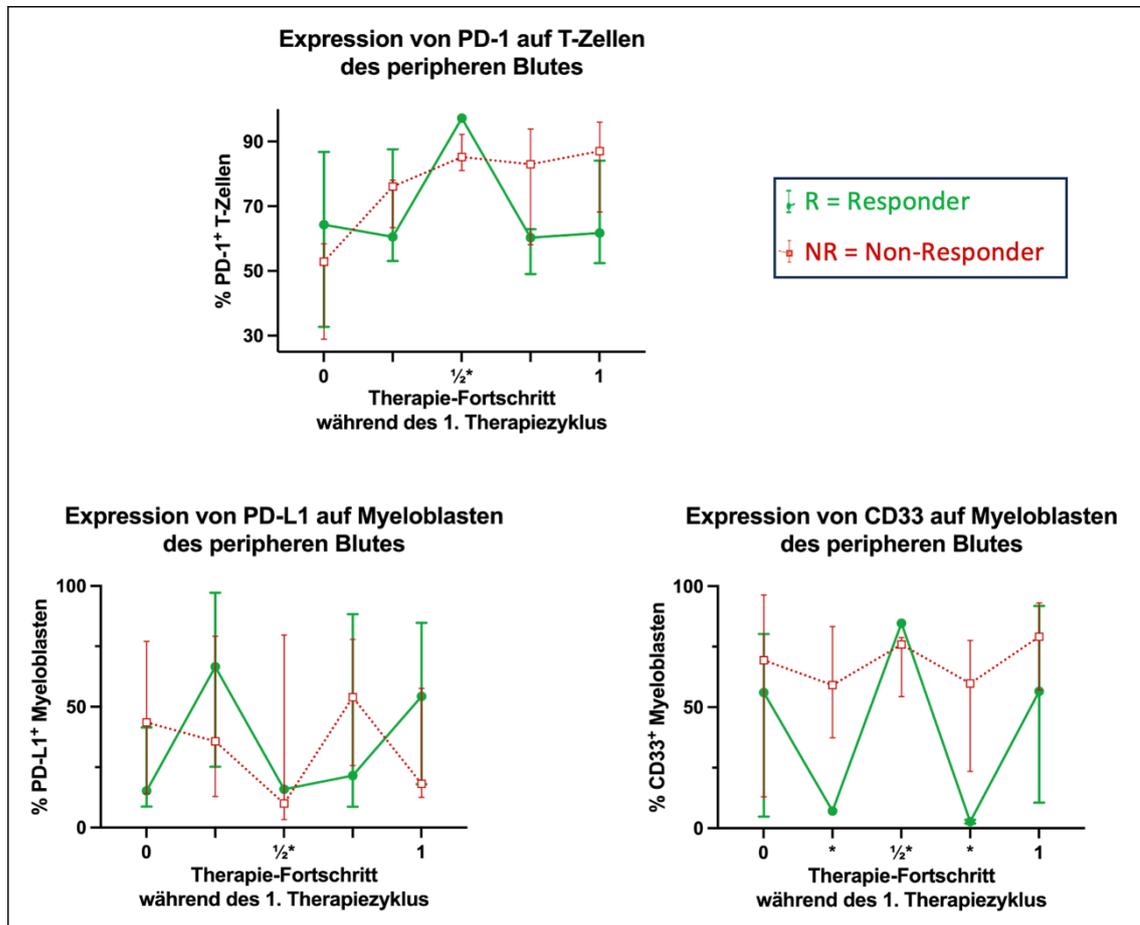


Abbildung 4-9: Expression von PD-1, PD-L1 und CD33 im peripheren Blut Responder (grün) und non-Responder (rot); * markiert Therapiezeitpunkte, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen.
 Oben: Anteil PD-1-positiver T-Zellen an allen T-Zellen in % im Therapieverlauf.
 Unten links: Anteil PD-L1-positiver Myeloblasten an allen Myeloblasten in % im Therapieverlauf.
 Unten rechts: Anteil CD33-positiver Myeloblasten an allen Myeloblasten in % im Therapieverlauf.

4.4 Ergebnisse aus experimentell erhobenen Daten

Für zehn Patienten konnten Daten aus Experimenten mit den kultivierten T-Zellen ausgewertet werden. Die n-Zahl zu den Therapiezeitpunkten variiert, da nicht in jedem Fall ausreichend T-Zellen für alle Experimente vorhanden waren.

4.4.1 BiTE-vermittelte Aktivität von T-Zellen

4.4.1.1 Konzentrationsfindung des experimentellen BiTEs

In einem Vorversuch mit gesunden Spender-Zellen für die BiTE-vermittelten Patienten-Zell-Versuche wurde eine möglichst geringe Konzentration des

therapeutischen Antikörpers AMG 330 ermittelt, die gleichzeitig einen maximalen Effekt herbeiführte. Dies wurde in den BiTE-vermittelten Experimenten genutzt, um auch zwischen Patienten mit sehr hoher zytotoxischer und proliferativer Kapazität der T-Zellen zu unterscheiden. Der Vorversuch mit je einem Replikat zeigte, dass bei einer E:T-Ratio von 1:4 mit 100.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte eine Konzentration von 0,5 ng/mL AMG 330 nicht ausreichend war, um eine vollständige Target-Zellyse nach 120 Stunden Ko-Kultur herbeizuführen (87,9%, n=1). Gleichzeitig war diese BiTE-Konzentration nach 120 Stunden in der Lage eine ähnliche Proliferation der T-Zellen zu induzieren, wie sie bei 15 ng/mL zu sehen war (fold change der T-Zellen 2,0 bei einer Konzentration von 15 ng/mL; fold change bei 1,8 bei einer Konzentration von 0,5 ng/mL, n= jeweils 1). Insgesamt zeigten niedrigere Konzentrationen des BiTE eine längere Latenz bis zur vollständigen Lyse der Target-Zellen. Trotz einer geringen BiTE-Konzentration konnte (nach einem initialen Abfall der T-Zellzahl bis zu 72 Stunden nach Versuchsansatz) eine ähnliche Proliferation der T-Zellen nach 120 Stunden Ko-Kultur in allen Konzentrationen erreicht werden (siehe Abbildung 4-10), sodass letztendlich die geringste Konzentration des BiTE von 0,5 ng/mL für alle Versuche mit Patienten-Zellen gewählt wurde.

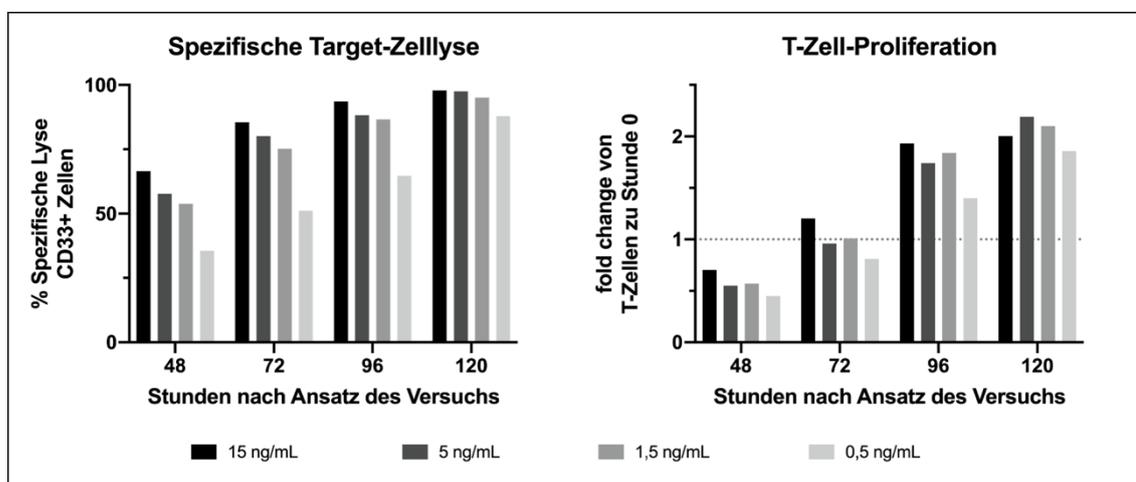


Abbildung 4-10: Versuchsergebnisse zur Dosisfindung BiTE für Zellkultur-Versuche

Konzentrationen von AMG 330r3 DS in den Zell-Experimenten waren 15ng/mL, 5ng/mL, 1,5ng/mL und 0,5ng/mL, dargestellt in absteigenden Grautönen. Die Auswertungen erfolgten jeweils nach 48, 72, 96 und 120 Stunden (je ein Replikat).

Links: Balkendiagramm zur spezifischen Lyse CD33-positiver Zellen in %.

Rechts: Balkendiagramm zur Proliferation von T-Zellen als fold change zu Stunde 0 des Versuchsansatzes.

4.4.1.2 Analyse der Zytotoxizität von T-Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung der Patienten-T-Zellen wurde deren Zytotoxizität *in vitro* untersucht. Vor Therapie-Start zeigten Responder-T-Zellen

nach 48 Stunden Ko-Kultur *in vitro* eine spezifische Lyse von 73,3 (IQR = 24,0; 79,5) %, nach 120 Stunden 95,8 (IQR = 47,9; 97,6) %. Damit lagen sie über der spezifischen Lyse von Non-Respondern, welche nach 48 Stunden Ko-Kultur *in vitro* bei 49,2 (IQR = 38,6; 77,1) % lag und nach 120 Stunden auf 92,8 (IQR = 82,6; 96,3) % anstieg. Die Zytotoxizität der T-Zellen vor Therapiestart war damit im *in vitro* Zeitverlauf bei Betrachtung der AUC zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant höher bei Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (AUC im Median bei 253,6 vs. 210,8; $p=0,5476$).

Nach Einleitung der BiTE-Therapie zeigten T-Zellen aus beiden Gruppen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme unter laufender Therapie deutlich niedrigere Werte für die spezifische Lyse mit im Median maximal 9 (IQR = -4,5; 54,9) % nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* in der Gruppe der Responder und 8,65 (IQR -0,7; 58,0) % bei den Non-Respondern.

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, d.h. zum Ende des Therapiezyklus, erhöhten sich die maximalen Werte auf im Median 24,5 (IQR = 1,3; 66,7) % bei Respondern nach 48 Stunden und auf im Median maximal 11,6 (IQR = 0,6; 38,6) % bei Non-Respondern nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* (siehe Abbildung 4-11, obere Reihe).

Beim Vergleich der Werte vor und während der Therapie (jeweils nach 48 Stunden bzw. 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro*) zeigte sich damit ein deutlicher Abfall der zytotoxischen Kapazität der T-Zellen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme in beiden Gruppen. Die T-Zell-Zytotoxizität regenerierte sich teilweise bis zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, dieser Effekt war bei Respondern deutlicher ausgeprägt (Abbildung 4-11, untere Reihe).

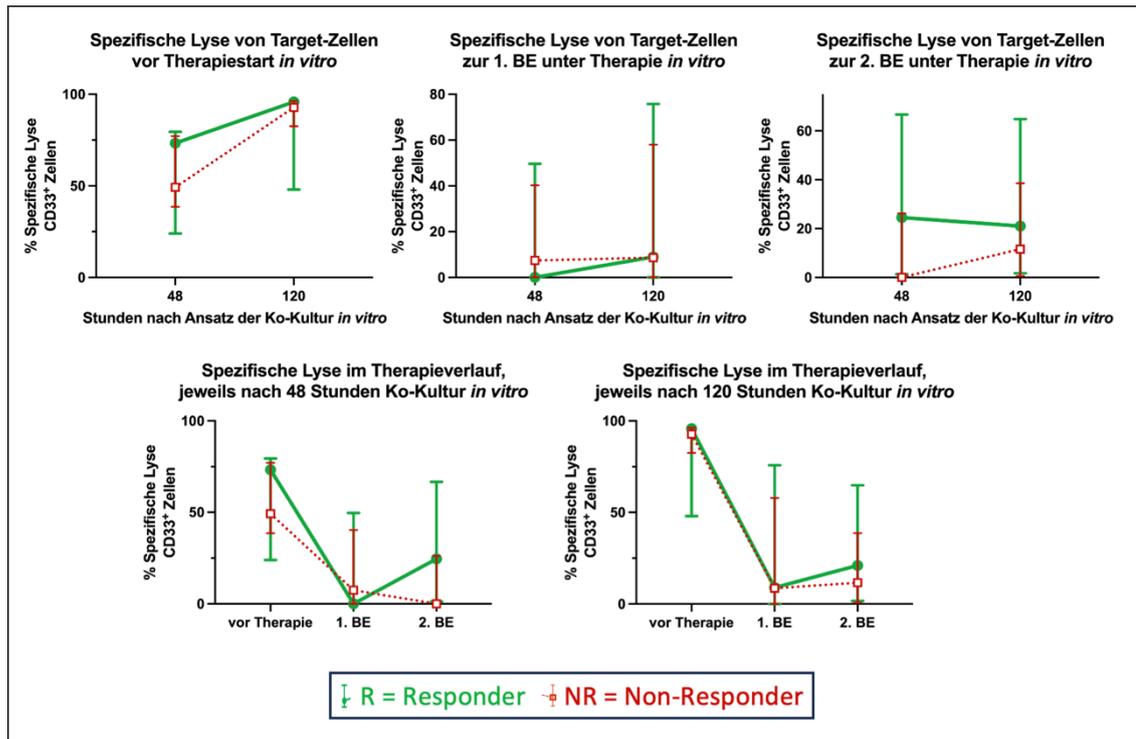


Abbildung 4-11: Experimentelle Untersuchung zur Zytotoxizität der Patienten-T-Zellen Responder (grün) und Non-Responder (rot); gemessen als % spezifische Lyse CD33-positiver Zellen. Oben: Spezifische Lyse 48 und 120 Stunden nach Ko-Kultur *in vitro*. Von links nach rechts vor Therapie, zum Zeitpunkt der ersten BE, zum Zeitpunkt der zweiten BE. Unten: Vergleich der spezifischen Lyse im Therapieverlauf (vor Therapie vs. bei 1. BE vs. bei 2. BE). Links nach 48 Stunden Ko-Kultur *in vitro*; rechts nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro*.

4.4.1.3 Analyse der Proliferation von T-Zellen

Ähnliche Kurvenverläufe ergaben sich bei der Analyse der proliferativen Kapazität der T-Zellen, der Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern war dabei noch geringer und ebenfalls nicht signifikant. Vor Therapie stieg der Anteil proliferierter T-Zellen an allen T-Zellen bei Respondern von 11,7 (IQR = 6,0; 21,1) % nach 48 Stunden auf 97,9 (IQR = 58,6; 98,5) % nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro*. Non-Responder waren mit 3,8 (IQR = 1,8; 10,0) % bzw. 95,2 (IQR = 91,0; 96,4) % nur knapp darunter. Auch hier zeigte sich ein Abfall der maximalen Proliferation von T-Zellen nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme unter der Therapie auf 26,3 (IQR = 5,7; 72,3) % bei Respondern und 31,4 (IQR = 17,9; 92,0) % bei Non-Respondern. T-Zellen vom zweiten Blutentnahme-Zeitpunkt, zum Ende des Therapiezyklus, konnten wiederum eine Erhöhung der maximalen Proliferation nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* von 66,6 (IQR = 9,2; 68,6) % bzw. 68,2 (IQR = 35,5; 88,6) % aufweisen. Damit bestätigte sich die Beobachtung einer initialen Abnahme der T-Zell-Funktion unter initialer Therapie, mit erneuter Erholung

gegen Ende der Therapie. Dieses Phänomen ist nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* stärker ausgeprägt als nach 48 Stunden (siehe Abbildung 4-12).

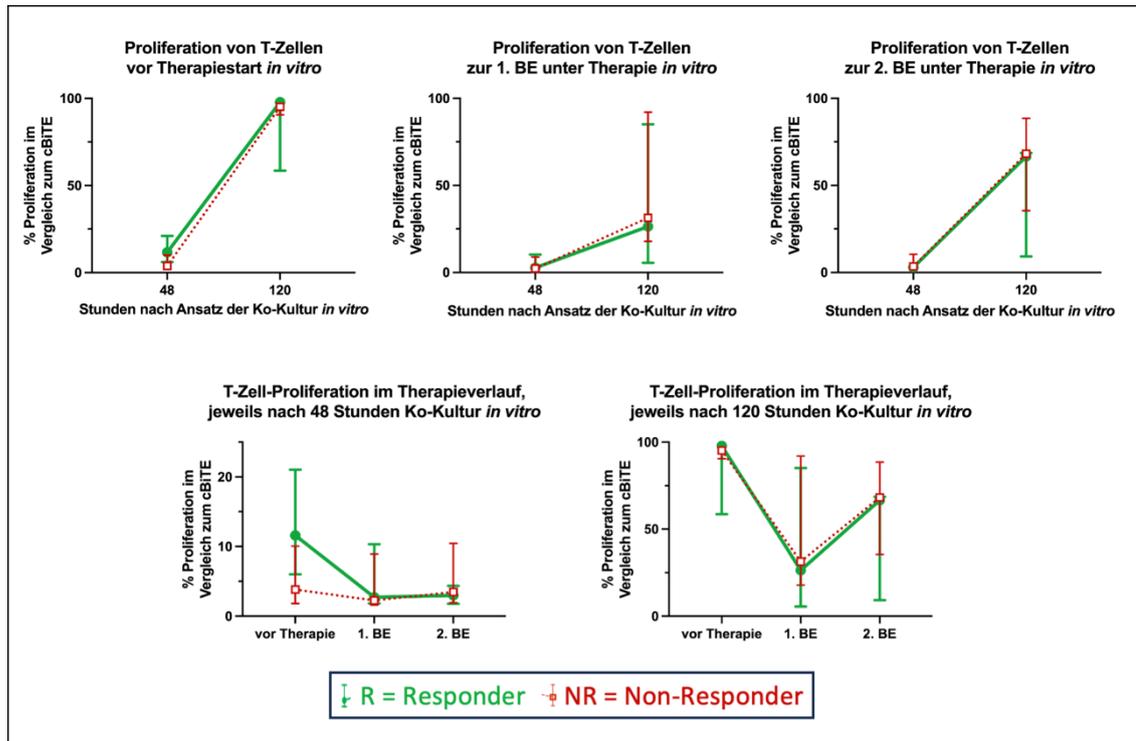


Abbildung 4-12: Experimentelle Untersuchung zur BiTE-vermittelten Proliferation von T-Zellen Responder (grün) und Non-Responder (rot); gemessen als % Proliferation im Vergleich zur Kontroll-Kondition (cBiTE).

Oben: T-Zell-Proliferation 48 und 120 Stunden nach Ko-Kultur *in vitro*. Von links nach rechts vor Therapie, zum Zeitpunkt der ersten BE, zum Zeitpunkt der zweiten BE.

Unten: Vergleich der T-Zell-Proliferation im Therapieverlauf (vor Therapie vs. bei 1. BE vs. bei 2. BE). Links nach 48 Stunden Ko-Kultur *in vitro*; rechts nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro*.

T-Zellen nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro* wurden weiterhin mittels eines Computer-Algorithmus einer Proliferations-Analyse unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.3). Der Divisions- und Proliferations-Index war dabei vor Therapiestart und unter Therapie bei Werten unter fünf und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern. Der Expansions- und Replikations-Index war vor Therapiestart in beiden Gruppen deutlich erhöht im Vergleich zu den Messungen unter Therapie. Weiterhin zeigte sich beim Expansions- und Replikations-Index vor Therapiestart eine Tendenz zu höheren Werten bei Respondern, jedoch ohne signifikante Unterschiede (Expansionsindex bei Respondern 24,1 (IQR = 11,4; 30,9) vs. 13,9 (IQR = 10,9; 14,2) bei Non-Respondern, $p=0,1508$; Replikationsindex 24,9 (IQR = 12,7; 32,1) vs. 15,3 mit ebenfalls $p=0,1508$). Unter Therapie nahmen der Expansions- und Replikationsindex im Median wiederum ab und zeigten neben einer großen

Streuung keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patienten-Gruppen (siehe Abbildung 4-13).

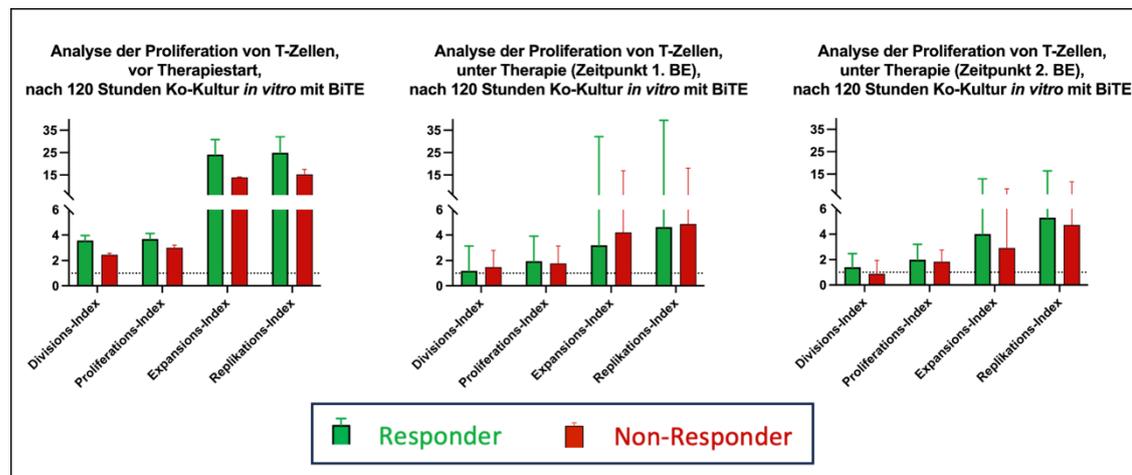


Abbildung 4-13: Detaillierte Analyse der BiTE-vermittelten Proliferation von T-Zellen Responder (grün) und Non-Responder (rot); nach 120 Stunden Ko-Kultur *in vitro*; jeweils mit Darstellung des Divisions-, Proliferations-, Expansions- und Replikations-Index. Von links nach rechts: vor Therapiebeginn, unter Therapie zum Zeitpunkt der ersten BE, unter Therapie zum Zeitpunkt der zweiten BE.

4.4.1.4 Analyse der Zytokin-Konzentrationen in den Medium-Überständen

In den Medium-Überständen aus den BiTE-vermittelten Zellkultur-Experimenten wurde nach 48 Stunden *in vitro* Ko-Kultur die Zytokin-Konzentration untersucht. Insgesamt zeigte sich eine im Therapieverlauf abnehmende Zytokin-Produktion in den *in vitro* Ko-Kulturen im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn. Teilweise ist ein erneuter, leichter Anstieg der Zytokin-Konzentrationen zum zweiten Therapiezeitpunkt zu sehen. Die Unterschiede zwischen beiden Patienten-Gruppen waren nicht signifikant, jedoch zeigten Responder vor Therapiebeginn tendenziell höhere Zytokin-Konzentrationen. Dies war insbesondere der Fall für IL-2 (1520 (IQR = 815; 3209) pg/ml vs. 985 (IQR = 574; 1967) pg/ml), IL-6 (352 (IQR = 126; 771) pg/ml vs. 101 (IQR = 87; 300) pg/ml), IL-10 (185 (IQR = 59; 892) pg/ml vs. 31 (IQR = 18; 147) pg/ml) und IFN- γ (1470 (IQR = 479; 4063) pg/ml vs. 593 (IQR = 469; 1610) pg/ml; siehe Abbildung 4-14).

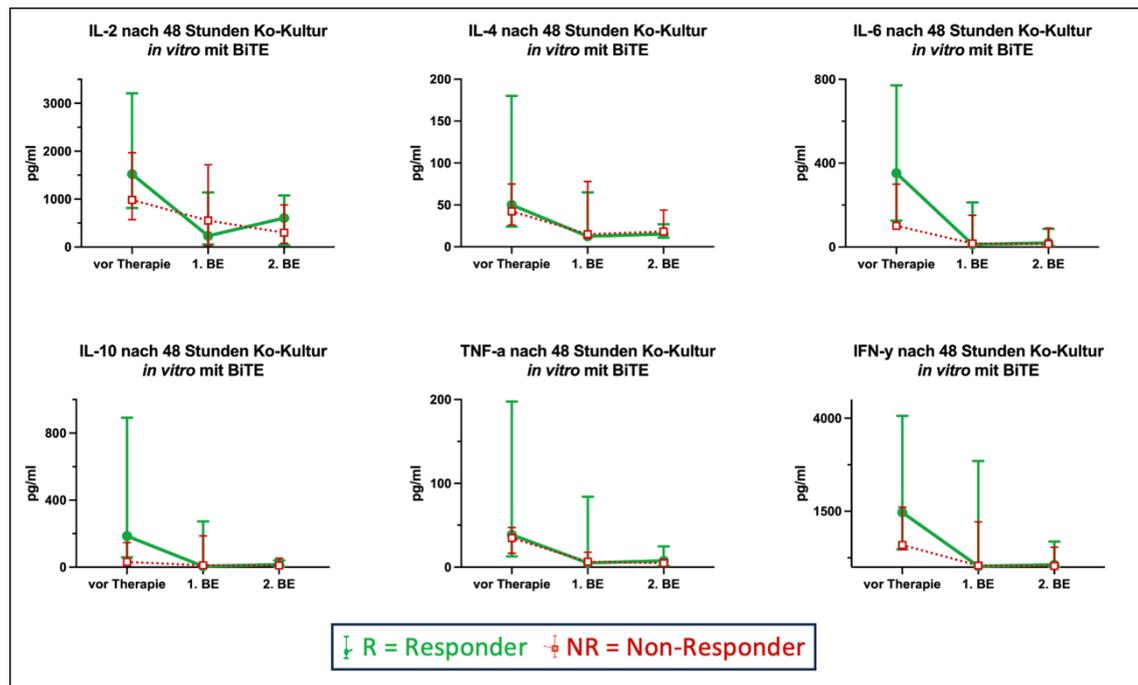


Abbildung 4-14: Zytokin-Konzentration im Medium nach 48 Stunden Ko-Kultur und BiTE *in vitro* Responder (grün) und Non-Responder (rot); Konzentration in pg/mL der Überstände. Jeweils zu den Zeitpunkten vor Therapiestart, unter Therapie zur ersten BE, sowie unter Therapie zur zweiten BE. Oben: Von links nach rechts Konzentration von IL-2, IL-4 und IL-6. Unten: Von links nach rechts Konzentration von IL-10, TNF-a und IFN-gamma.

4.4.2 Bead-vermittelte Proliferation von T-Zellen

In den Bead-vermittelten Experimenten zeigte sich ein ähnlicher Trend der T-Zell-Proliferation, wie er auch schon bei den BiTE-vermittelten Experimenten zu beobachten war. Die Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern waren zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. Daten unter der Therapie zum Zeitpunkt der ersten und zweiten Blutentnahme nach 120 Stunden *in vitro* Inkubation mit anti-CD3/-CD28 Beads setzten sich in der Gruppe der Responder aus nur zwei Messungen zusammen (mit einem Stern (*) in Abbildung 4-15 und 4-16 gekennzeichnet).

Insgesamt war auch in diesem Experiment ein initialer Abfall der T-Zell-Proliferation nach Therapiestart zu verzeichnen, welcher sich zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme unter der Therapie regenerierte. Nach 48 Stunden *in vitro* Inkubation mit Beads zeigte sich zwischen der Beads- und der Kontroll-Kondition kein wesentlicher Unterschied im prozentualen Anteil proliferierter T-Zellen mit Maximalwerten von 17,2 (IQR = 7,1; 23,9) % bei Respondern zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme. Nach 120 Stunden Inkubation mit Beads *in vitro* waren zum Zeitpunkt vor Therapiestart und zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme unter der Therapie nahezu 100% aller T-Zellen in beiden Patienten-Gruppen

proliferiert, während dieser Wert zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme unter der Therapie unter 75% in beiden Patienten-Gruppen lag (Abbildung 4-15).

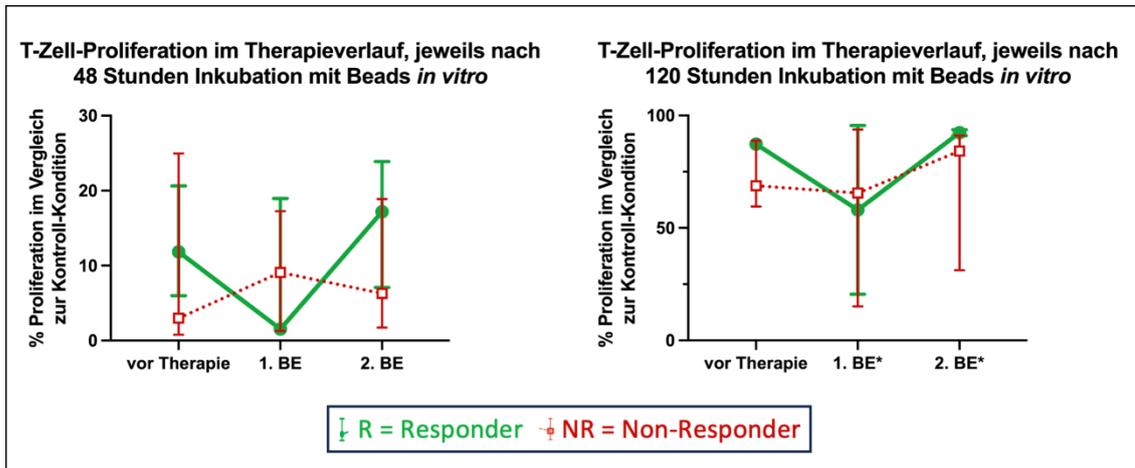


Abbildung 4-15: Experimentelle Untersuchung zur Bead-vermittelten Proliferation von T-Zellen Responder (grün) und Non-Responder (rot). Proliferation nach Inkubation mit anti-CD3/-CD28 Beads, gemessen in % im Vergleich zur Kontroll-Kondition (ohne Beads). Jeweils zu den Zeitpunkten vor Therapiestart, unter Therapie zur ersten BE, sowie unter Therapie zur zweiten BE. * markiert Messungen, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen. Links nach 48 Stunden Inkubation mit Beads *in vitro*. Rechts nach 120 Stunden Inkubation mit Beads *in vitro*.

Eine genauere Analyse der proliferierten T-Zellen nach 120 Stunden Inkubationszeit mit Beads *in vitro* ergab zu keinem Therapiezeitpunkt bei keinem Index signifikante Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern. Wie auch schon bei den BiTE-vermittelten Versuchen war der Expansions-Index vor Therapiestart bei Respondern leicht erhöht (siehe Diagramm links in Abbildung 4-16).

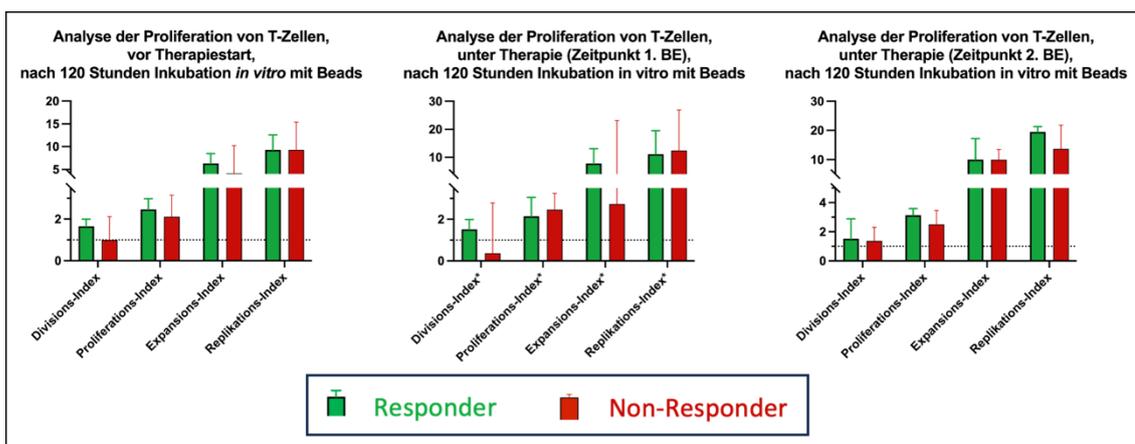


Abbildung 4-16: Detaillierte Analyse der Bead-vermittelten Proliferation von T-Zellen Responder (grün) und Non-Responder (rot); nach 120 Stunden Inkubation mit Beads *in vitro*; jeweils mit Darstellung des Divisions-, Proliferations-, Expansions- und Replikations-Index. * markiert Messungen, zu denen in der Gruppe der Responder ≤ 2 Messwerte vorlagen. Von links nach rechts: vor Therapiestart, unter Therapie zum Zeitpunkt der ersten BE, unter Therapie zum Zeitpunkt der zweiten BE.

5. Diskussion

In Kapitel 2 wurde die zentrale Frage gestellt, warum das Ansprechen von Patienten mit einer AML auf eine Therapie mit einem BiTE unterschiedlich ist. Weiterhin wurde die Hypothese formuliert, dass ein prädiktiver Biomarker existiert, anhand dessen ein Therapieansprechen abgeschätzt werden kann. Die Identifikation eines solchen Biomarkers ermöglicht unter Umständen ein besseres Verständnis von Effektor- und Resistenzmechanismen, was im weiteren Verlauf Interventionen erlaubt, die möglicherweise die Therapie positiv beeinflussen können. In den folgenden Abschnitten soll die Antwort auf die zentrale Frage anhand der präsentierten Ergebnisse und aktueller Literatur hergeleitet werden. Die Beantwortung orientiert sich an den in Kapitel 2 formulierten Zwischenfragen und spiegelt sich in deren Nummerierung wider. Zu beachten ist, dass alle Ergebnisse aus dieser Dissertation bei kleiner Größe der Kohorte (maximal 5 Responder und 6 Non-Responder) hinsichtlich ihrer Repräsentativität für größere Patientenkohorten kritisch bewertet werden müssen; dennoch sollten sich Trends anhand der untersuchten Patientenzahlen ableiten lassen. Zusätzlich wird die Interpretation dadurch erschwert, dass insgesamt nur bei wenigen Patienten ein klares Ansprechen auf die Therapie zu erkennen war – so wurden auch Patienten, bei denen ein offensichtliches Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden konnte, als Ansprecher für unsere Analyse deklariert. Insgesamt war die Ansprechrate in den zu beiden Studien veröffentlichten Interims-Analysen (bei Betrachtung der Reduktion von Blasten im Knochenmark) gering: eine allgemeine Reduktion der Blasten im Vergleich zum prätherapeutischen Zustand (Overall Response Rate, ORR) gelang mit AMG 330 bei 50% der Patienten und nur bei 17% der Patienten im Sinne einer kompletten Remission (*complete remission*, CR).(19) Mit AMG 673 lagen ORR bei 44% und CR bei 4%.(43) Dennoch ermöglichen die Ergebnisse unserer Analyse Einblicke in die T-Zell-Funktion unter BiTE-Therapie und Trends in den Ergebnissen erlauben Rückschlüsse auf zugrundeliegende Mechanismen für Therapieerfolg und -versagen.

5.1 Unterschiede bei der Quantifizierung und Charakterisierung von T-Zellen und Myeloblasten vor Therapiestart

Die Quantifizierung von T-Zellen und Myeloblasten vor Therapiestart zeigte unterschiedliche Absolutzahlen und Anteile der Subpopulationen für Responder und Non-Responder. Weiterhin zeigten sich unterschiedliche Charakteristika von T-Zellen in Bezug auf die T-Zell-Funktion, jedoch weniger ausgeprägt beim Vergleich verschiedener Oberflächenmarker oder Subsets. Die Untersuchung der CD33- und PD-L1-Expression auf Myeloblasten zeigte keine signifikanten Unterschiede.

5.1.1 Responder zeigen vor Therapiestart eine höhere Effektor-zu-Target-Ratio, jedoch nicht erhöhte absolute T-Zell-Zahlen

Bei Betrachtung der Effektor- (T-Zellen) und Target- (Myeloblasten) -Zellen im Knochenmark, welches als Ort des hauptsächlichen BiTE-Effektes angesehen wird,(39) zeigte sich bei Respondern eine signifikant höhere E:T-Ratio *in vivo* (siehe Abschnitt 4.3.1). Ebenfalls zeigte sich durch Messungen mittels BiTE-Panel im peripheren Blut *in vivo*, dass Responder tendenziell eine höhere E:T-Ratio aufweisen (siehe Abschnitt 4.3.4). Im Einklang damit steht, dass bereits publizierte Daten zur Wirksamkeit von AMG 330 in Zellkultur-Experimenten *in vitro* eine von der E:T-Ratio abhängige Lyse von Myeloblasten bei AML-Patienten zeigten, wobei eine höhere E:T-Ratio mit einer besseren Lyse von CD33-positiven Targetzellen einherging.(45) Auch *in vivo* konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. Dabei stellte sich die E:T-Ratio vor Therapiestart (neben der Dosierungshöhe des BiTE und der Anzahl der vorrausgegangenen Therapien) als relevant für das Therapieansprechen heraus.(19, 46)

Die absolute Anzahl an T-Zellen im peripheren Blut vor Therapie *in vivo* (ermittelt durch Messungen mit dem BiTE-Panel und Berechnung anhand der Leukozyten-Zahl in der Routine-Hämatologie) war unerwarteter Weise bei Non-Respondern höher als bei Respondern, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (siehe Abschnitt 4.3.1), so dass die Absolutwerte für T-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf das Therapieergebnis zu haben scheinen. Allerdings muss bei dieser Schlussfolgerung beachtet werden, dass die Leukozyten-Zahl und der

Blastenanteil im peripheren Blut bei Non-Respondern vor Therapiestart erhöht waren (siehe auch Abschnitt 5.1.4), was die nicht signifikant unterschiedliche absolute Anzahl an T-Zellen erklären könnte. Dennoch relevant bleibt die relative Anzahl der T-Zellen, wie oben bereits beschrieben. Die Interim-Analyse zu AMG 330 zeigte bereits, dass eine erhöhte E:T-Ratio (bei niedrigeren Anteilen von Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut) die klinische Prognose verbessert.(19)

5.1.2 Tendenz zur besseren Funktionalität von T-Zellen *in vivo* von Respondern vor Therapiestart

Im Zellkultur-Versuch zeigten die von Respondern vor Therapie entnommenen und *ex vivo* verarbeiteten T-Zellen zahlreiche (wenn auch bei geringer n-Zahl nicht signifikante) Unterschiede zu T-Zellen von Non-Respondern. So zeigten T-Zellen von Respondern eine erhöhte zytotoxische Aktivität nach 48 Stunden in Ko-Kultur *in vitro* mit der AML-Zelllinie und dem experimentellen BiTE (siehe Abschnitt 4.4.1.2). Zusätzlich zeigte sich ein höherer Expansionsindex in der speziellen Analyse zur T-Zell-Proliferation (siehe Abschnitt 3.2.3), der eine Vervielfachung der gesamten T-Zell-Population bedeutet. Weiterhin zeigten T-Zellen von Responder einen höheren Replikationsindex. Dieser deutete auf eine verstärkte proliferative Kapazität von T-Zellen mit mitotischer Aktivität hin (die Analyse schließt also T-Zellen aus, die sich nicht geteilt haben, siehe Abschnitt 4.4.1.3).

In den Bead-vermittelten Mono-Kulturen konnten ebenfalls, jedoch in einem geringeren Ausmaß, ein besserer proliferativer Effekt bei Responder T-Zellen vor Therapie beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.4.2).

Die Überstände aus den *in vitro* Ko-Kulturen nach 48 Stunden wiesen höhere Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-6, IL-10 und IFN- γ auf (siehe Abschnitt 4.4.1.4), was auf eine bessere Fähigkeit zur Zytokin-Produktion nach Aktivierung der T-Zellen (und damit einer besseren Funktionalität der T-Zellen) hindeutet. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei präklinischen Experimenten mit T-Zellen eines gesunden Spenders in frühen präklinischen Studien von AMG 330 *in vitro* berichtet. Dabei zeigte sich nach Behandlung mit AMG 330 eine vermehrte Sekretion von IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, und IL-10 durch T-Zellen des gesunden Spenders. Diese Zytokine sind maßgeblich an der Effektor-Funktion von T-Zellen

beteiligt, was im Einklang mit der besseren zytotoxischen und proliferativen Kapazität steht.(47)

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass T-Zellen von Respondern in Experimenten *ex vivo* tendenziell eine bessere Funktionalität vor dem Start einer Therapie mit BiTEs besitzen.

5.1.3 Unspezifische Verteilung von T-Zell-Subsets und Oberflächen-Markern auf T-Zellen vor Therapiestart

Die Verteilung der CD4- und CD8-positiven T-Zellen, sowie die Unterteilung in naive, CM, EM und EMRA Subsets zeigte sich in unserer Kohorte vor Therapie nicht signifikant unterschiedlich zwischen Respondern und Non-Respondern. Gleichzeitig konnten keine Unterschiede bei der Verteilung der Checkpoint- und Aktivierungs-Marker festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.3.4). In der Literatur wurde jedoch beschrieben, dass der Anteil an EMRA-Zellen an den T-Zellen von AML-Patienten vor Behandlung mit AMG 330 im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht ist, während naive und CM-Zellen zu geringeren Anteilen nachweisbar sind.(39)

Bezüglich der Checkpoint-Marker wurde in der Zwischenevaluation der AMG 330 Studie gezeigt, dass eine höhere Expression von PD-1 auf CD4-positiven T-Zellen vor Therapie tendenziell verstärkt bei Non-Respondern zu verzeichnen ist.(19) Hinsichtlich des Checkpoint-Markers TIGIT auf T-Zellen konnte in der Literatur ebenfalls ein negativer prognostischer Wert für die Lyse von Myeloblasten gezeigt werden.(48) Möglicherweise konnten diese Ergebnisse hier aufgrund der geringen n-Zahl nicht reproduziert werden. Im Therapieverlauf zeichneten sich jedoch geringe Unterschiede ab, worauf im Abschnitt 5.3 genauer eingegangen wird.

5.1.4 Quantifizierung von Myeloblasten und Expression von CD33 und PD-L1 auf Myeloblasten vor Therapiestart

Hinsichtlich der Charakterisierung der Myeloblasten im peripheren Blut zeigte sich in der Routine-Hämatologie unserer Kohorte der Trend, dass Non-Responder generell höhere Absolutzahlen an Leukozyten haben. Der überwiegende Anteil wurde dabei durch Myeloblasten gebildet (siehe Abschnitt 4.3.1). Die Begutachtung der CD33-Positivität zeigte eine unspezifische

Streuung der Expressionsstärke bzw. Positivität von CD33 auf den Myeloblasten *in vivo* (siehe Abschnitt 4.3.4). Dies steht in Einklang damit, dass die CD33-Expression auf Myeloblasten in der Zwischenevaluation der Studie mit AMG 330 nicht mit dem Therapieansprechen korrelierte.(19) Anfängliche Untersuchungsergebnisse aus Versuchen *in vitro* zeigten zwar eine Abhängigkeit der Lyse von der CD33-Expression,(40, 45) neue Ergebnisse weisen jedoch keine Abhängigkeit mehr nach.(41, 46) Die Expression des Immun-Checkpoint-Liganden PD-L1 auf Myeloblasten zeigte in unserer Kohorte keine relevanten Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern (siehe Abschnitt 4.3.4). Bei anderen Tumor-Entitäten konnte eine vermehrte Expression von PD-L1 auf Tumorzellen mit einem schlechteren Ansprechen auf Immuntherapien korreliert werden.(49)

5.2 Tumorlast und Krankheitsfortschritt vor Therapiestart als prädiktive Biomarker für das Therapieansprechen

Wie bereits erwähnt zeigten Non-Responder höhere Anteile und Absolutzahlen für Myeloblasten im peripheren Blut, was sich ebenfalls in den erniedrigten E:T-Ratios im peripheren Blut und Knochenmark widerspiegelte. Interessanterweise zeigten Non-Responder vor Therapie bei Routine-Messungen des Instituts für Laboratoriumsmedizin höhere LDH-Werte als Responder (siehe Abschnitt 4.3.3). Ein hoher LDH-Wert wird bei Lymphomen häufig in Verbindung mit einem reduzierten Überleben beobachtet.(50) Ähnliches gilt für die Onkologie der soliden Tumore, hier wurde eine erhöhte LDH-Konzentration zusätzlich mit einer reduzierten Anti-Tumor-Immunologie assoziiert, was die Relevanz dieses Parameters unterstreicht.(51) Im Verlauf der Therapie blieb der LDH-Wert auf einem stabilen Niveau, wobei dieses Niveau bei Non-Respondern stets höher lag (siehe Abschnitt 4.3.3).

Der CRP-Wert war von Interesse, weil er bei verschiedenen anderen Tumoren als prognostischer Wert herangezogen wird.(49) Insbesondere bei der Behandlung von Großzelligen B-Zell-Lymphomen mittels CAR-T-Zellen, also ebenfalls einer T-Zell-basierten Therapieplattform, konnte ein erhöhter CRP-Wert mit einem schlechteren Behandlungsergebnis assoziiert werden.(52) Untersuchungen des CRP-Wertes lieferten in unserer Kohorte keine eindeutigen Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern vor Therapie. Im

Therapieverlauf zeigten die Werte eine unterschiedliche Dynamik, aber keine wegweisenden Trends (siehe Abschnitt 4.3.3).

Darüber hinaus soll hier noch erwähnt werden, dass bei Patienten vor Therapie mit Blinatumomab, einem anti-CD3/-CD19 BiTE mit bereits zugelassener Anwendung bei Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) der B-Zellreihe, ein signifikanter Unterschied bei der Verteilung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) entdeckt wurde. Dies sind T-Zellen mit einer inhibierenden, Immunreaktion-dämpfenden Funktion. Sie konnten als prognostisch ungünstige Marker für das Ansprechen auf Blinatumomab identifiziert werden.(53) In dieser Dissertation wurden T_{reg} Zellen vor Therapiestart nicht untersucht, sie stellen aber einen potenziellen Marker auch bei der AML dar, welcher in Zukunft weiter analysiert werden sollte.

5.3 Veränderungen von T-Zellen und Myeloblasten im Therapieverlauf

5.3.1 Erhöhte E:T-Ratios im peripheren Blut und Knochenmark bei Respondern *in vivo* im Therapieverlauf

Blutentnahmen während der BiTE-Therapie zeigten, dass der Myeloblasten-Anteil an allen Leukozyten im peripheren Blut bei Non-Respondern im Vergleich zu Responder *in vivo* konstant erhöht war (siehe Abschnitt 4.3.1). Der T-Zell-Anteil im peripheren Blut zeigte sich nach Einleitung der Therapie hingegen konstant bei Respondern erhöht. Der Anteil der T-Zellen an allen Lymphozyten fiel zu Beginn der Therapie in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß ab, erholte sich jedoch bis zum Ende der Therapie auf nahezu prätherapeutische Werte (siehe Abschnitt 4.3.1). Dies könnte für eine Rekrutierung der T-Zellen durch den BiTE in Körperbereiche mit hohen CD33-Expressionen sprechen, wie beispielsweise in das Knochenmark.(39) Dementsprechend zeigte sich im peripheren Blut im gesamten Therapieverlauf eine höhere E:T-Ratio bei Respondern. Bei der E:T-Ratio zeigte sich weiterhin ein kongruenter Abfall zur Mitte der Therapie in beiden Gruppen (siehe Abschnitt 4.3.4). Auch im Knochenmark zeigten durchflusszytometrische Messungen nach dem ersten Therapiezyklus höhere E:T-Ratios bei Respondern (siehe Abschnitt 4.3.2). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Therapie von Patienten mit Blinatumomab

berichtet, hierbei konnte die Anzahl und Expansionskapazität der T-Zellen während der Therapie mit einem positiven Therapieansprechen korreliert werden.(54)

5.3.2 Veränderung von T-Zell-Subsets und Oberflächenmarkern auf T-Zellen *in vivo* im Therapieverlauf

Bei genauerer Untersuchung der Subsets von T-Zellen unter Therapie zeigten sich keine spezifischen Veränderungen der CD4:CD8-Ratio. Bei Untersuchung der weiteren T-Zell-Subsets zeigte sich nach Therapieeinleitung in beiden Gruppen zunächst eine Zunahme der EM-Anteile bei gleichzeitiger Abnahme der naiven T-Zellen (siehe Abschnitt 4.3.4). Zum Ende des ersten Therapiezyklus kehrte sich das Verhältnis wieder um. CM und EMRA T-Zellen zeigten sich in beiden Gruppen unter der Therapie auf konstantem Niveau stabil (siehe Abschnitt 4.3.4). Anders als in unserer Kohorte konnte bei Patienten unter Blinatumomab-Therapie eine Proliferation von EM-T-Zellen mit einem positiven Therapieansprechen in Verbindung gebracht werden.(54)

Die Aktivierung der T-Zellen kann mit dem Aktivierungsmarker CD69 erfasst werden.(47) T-Zellen von Non-Respondern zeigten unter Therapie eine anfängliche Zunahme der CD69-Expression, welche zum Ende der Therapie wieder abfiel. Die CD69-Expression bei Respondern zeigte sich auf einem niedrigerem, aber konstantem Niveau stabil (siehe Abschnitt 4.3.4). Die Expression von CD69 auf T-Zellen führt zu diversen zellulären Veränderungen, unter anderem wird die Expression von PD-1 auf CD4-positiven T-Zellen hochreguliert.(55) Die Expression des Checkpoint-Markers PD-1 auf T-Zellen nahm bei Non-Respondern bis zum Ende der Therapie zu, während sie bei Respondern (bis auf einen Einzelwert bei der Hälfte des Therapiefortschritts) auf konstantem Level blieb (siehe Abschnitt 4.3.4). PD-1, TIGIT, LAG-3 und TIM3 werden durch T-Zellen bei persistierendem Antigen-Kontakt verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert und gelten als Immun-Checkpoint-Marker. Nach Bindung durch ihre Liganden führen sie zu einem nicht-funktionellen Zustand der T-Zellen, der in der Literatur als "*Exhaustion*", also "Erschöpfung", bezeichnet wird. Dabei kommt es zu einem Verlust der Effektor-Funktion der T-Zellen, sodass diese bspw. der mikrobiellen Abwehr oder der Tumorkontrolle nicht nachkommen können.(56-58) Die Analyse der Immun-Checkpoint-Marker TIGIT,

LAG-3 und TIM3 zeigte unter der Therapie zunächst eine Erhöhung der Expression auf T-Zellen, die jedoch zum Ende der Therapie wieder abnahm. Der Effekt des initialen Anstiegs mit darauffolgendem Abstieg trat bei T-Zellen von Non-Respondern in stärkerem Umfang oder früher ein. In der Literatur wurde dies bereits als möglicher Mechanismus eines Therapieversagens bzw. einer Immunevasion der Leukämie diskutiert.(59, 60)

5.3.3 Proliferation und Zytotoxizität von T-Zellen *in vitro* nehmen im Therapieverlauf ab

Bei Betrachtung der zytotoxischen und proliferativen Aktivität der T-Zellen in den BiTE-vermittelten Zellkultur-Experimenten *in vitro* zeigte sich der Trend, dass beide Parameter zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme unter der Therapie (im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiestart) deutlich abnahmen. Auch zum zweiten Zeitpunkt unter der Therapie waren die Werte noch deutlich erniedrigt, konnten sich jedoch im Vergleich zum ersten Zeitpunkt unter Therapie in geringem Umfang regenerieren (siehe Abschnitt 4.4.1.2 und 4.4.1.3). Genauso verhielt es sich mit den Zytokinen in den Überständen der Zellkultur, welche im Therapieverlauf zunächst abnahmen und zum Therapieende allenfalls leicht anstiegen (siehe Abschnitt 4.4.1.4). Der Abfall vom Zeitpunkt vor Therapiestart zum ersten Zeitpunkt unter Therapie zeigte sie bei Non-Respondern oftmals verstärkt. Zusätzlich fiel die Erholung vom ersten zum zweiten Therapiezeitpunkt bei Non-Respondern meistens in geringerem Umfang aus. Ein ähnlicher Effekt konnte, wenn auch in reduziertem Ausmaß, in den Bead-vermittelten Experimenten beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.4.2). Die Beobachtung dieser T-Zell-Dysfunktion nach Einleitung der Therapie, welche bei Non-Respondern verstärkt ausgeprägt war und sich langsamer reversibel zeigte, deckt sich mit Untersuchungen in Langzeitkulturen mit Blinatumomab, wobei eine prolongierte Exposition der T-Zellen gegenüber eine Tumorzelllinie in Anwesenheit des BiTEs zu abnehmender Zytotoxizität und abnehmenden Zytokinen im Überstand führte. Diese abnehmende zytotoxische und proliferative Kapazität wird als Folge der hochregulierten Checkpoint-Marker und folglich der T-Zell-Erschöpfung angesehen.(61)

5.3.4 Veränderung von CD33 und PD-L1 auf Myeloblasten *in vivo* im Therapieverlauf

Die Myeloblasten im peripheren Blut zeigten im Therapieverlauf eine unspezifische Veränderung der CD33-Expression in beiden Gruppen mit tendenziell höherer Expression bei Non-Respondern (siehe Abschnitt 4.3.4). Die regelmäßige Untersuchung der CD33-Expression auf der Zelloberfläche war relevant, da ein potenzielles Verschwinden von CD33 auf Myeloblasten mit einem Funktionsverlust der CD3/CD33 BiTEs einhergeht. Ein solcher Escape-Mechanismus der Leukämie wurde in der Literatur erwähnt,(62) konnte in unserer Kohorte aber nicht beobachtet werden. Das Verschwinden von CD33 auf Targetzellen kann bedingt sein durch die starke Tendenz dieses Rezeptors zur Internalisierung. Im Falle einer Internalisierung von CD33 ist eine höhere Dosis von BiTEs zur ausreichenden Lyse der Zielzellen erforderlich, da eine suffiziente Aktivierung der T-Zellen bei fehlender Bindung des BiTE am N-terminalen Ende nicht stattfindet. Dieser Effekt wird als "Antigen-Sink" bezeichnet und wurde in anderen Studien bei der AML-Therapie beobachtet.(30, 62)

Die Expression von PD-L1 auf Myeloblasten im Therapieverlauf zeigte sich in beiden Gruppen unspezifisch (siehe Abschnitt 4.3.4). Dem widersprechend konnte in der Literatur gezeigt werden, dass die Einleitung einer Therapie mit AMG 330 eine relevante Expression von PD-L1 auf Myeloblasten hervorruft, was einen potenziellen Immunevasions-Mechanismus der Leukämie darstellt.(45)

5.4 Ausblick: Beeinflussung des Therapieerfolges

Bei der Beobachtung der Therapieverläufe stellt sich die Frage, warum Patienten auf denselben BiTE in unterschiedlichem Ausmaß ansprechen. Die zuvor aufgeführten Ergebnisse und deren Interpretation im Rahmen der aktuellen Literatur erwecken den Eindruck einer multifaktoriellen Grundlage des Therapieansprechens. So zeigten sich der Anteil an Myeloblasten, T-Zellen und deren Verhältnis als therapierelevant. Gleichzeitig sind im Therapieverlauf eine erhöhte Expression von Immun-Checkpoint-Markern auf T-Zellen von Non-Respondern zu verzeichnen, die vermutlich einen Zustand der funktionellen Erschöpfung induzieren, welcher sich in reduzierter proliferativer und zytotoxischer Kapazität widerspiegelt. Der LDH-Wert konnte als prädiktiver Marker mit hoher Signifikanz für ein Therapieansprechen identifiziert werden und bestätigt damit die in Abschnitt 2 formulierte Hypothese teilweise. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob nach Identifikation eines Patienten als Therapieversager eine Modifikation der Therapie vorgenommen werden kann. Basierend auf den Ergebnissen dieser Dissertation und der Literatur sollen an dieser Stelle als Ausblick theoretisch denkbare Interventionen aufgeführt werden.

Wie bereits erwähnt zeigten Patienten mit einem hohen Myeloblasten-Anteil ein schlechteres Therapieansprechen auf BiTEs. Ähnliche Ergebnisse wurden bei ALL-Patienten, die mit Blinatumomab behandelt wurden, verzeichnet.(63) Aus diesem Grund liegt die Idee nahe, vor oder mit Einleitung einer BiTE-Therapie eine Zytoreduktion mittels einer Chemotherapie durchzuführen. Eine BiTE-Therapie wird zwar bei bestimmten Patienten angesichts der hohen Mortalität einer intensiven Chemotherapie vorgezogen, jedoch gibt es bereits Studien im Setting der ALL mit Hinweisen auf Therapieerfolg bei Behandlungen mit reduzierten Chemotherapie-Regimen.(64) Allerdings beeinflusst eine Chemotherapie auch die Wirksamkeit von T-Zell-basierten Therapiestrategien, weshalb die Auswahl des richtigen Medikaments entscheidend ist.(65)

Weiterhin zeigten Patienten mit einer erhöhten Anzahl an T-Zellen ein besseres Therapieansprechen auf BiTE-Therapien. Unter Berücksichtigung, dass eine hohe Anzahl an T_{reg} das Therapieansprechen vermindert,(53) erscheint eine prätherapeutische T-Zell-Expansion als sinnvolle Intervention. Eine zusätzliche Verabreichung von IL-2 könnte diesen Effekt durch Potenzierung der T-Zell-

Aktivierung vermitteln und wurde in einer Studie mit einer verbesserten Anti-Tumor-Immunität assoziiert.(66)

Gleichzeitig ist bei zu starker und stetiger T-Zell-Aktivierung die Induktion einer T-Zell-Erschöpfung zu beachten. Dieses Phänomen wurde bei der kontinuierlichen Therapie mit Blinatumomab beobachtet und konnte in einer Publikation durch Einführung eines Therapie-freien Intervalls behoben werden. Hierbei wurde die Hypothese verfolgt, dass das Therapie-Ansprechen auf Blinatumomab bereits in den ersten Therapietagen stattfindet, während die darauffolgenden Tage bei kontinuierlicher Stimulation überwiegend zu einer Erschöpfung der T-Zellen beitragen.(61) Dieses Phänomen wurde bereits bei kontinuierlicher Exposition von T-Zellen gegenüber von Infektionserregern beobachtet.(57) Das Einführen von behandlungsfreien Intervallen konnte in der Zellkultur und im Mausmodell vollständig funktionsfähige T-Zellen über eine lange Therapiedauer erhalten.(61)

Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung einer T-Zell-Erschöpfung steht durch die Inhibition der Immun-Checkpoints und deren Liganden zur Verfügung. Obwohl zunächst angenommen wurde, dass BiTEs unabhängig von anderen Ko-Rezeptoren T-Zellen aktivieren können, wurden zuletzt Publikationen veröffentlicht, die dennoch eine wesentliche Rolle von Ko-Rezeptoren vermuten lassen. So konnte eine PD-L1 und PD-L2 -Expression auf Myeloblasten mit einer verminderten BiTE-vermittelten Lyse von Zielzellen und verminderter Proliferation von T-Zellen in Verbindung gebracht werden.(67, 68) Inhibition der PD-1/PD-L1 -Achse mit blockierenden Antikörpern zusätzlich zur BiTE-Therapie,(45, 69) oder BiTE-Konstrukte mit einer zusätzlichen Domäne zur Checkpoint-Blockade - sogenannte "CiTE" -Antikörper (*Checkpoint Inhibitory T-cell Engager*) - konnten diese Effekte revidieren.(58) Andere Modelle fokussieren sich auf die TIGIT-PVR/PVRL2-Achse, wodurch ebenfalls eine verbesserte Lyse gezeigt werden konnte.(48)

Ebenso wie die Blockade von inhibitorischen Signalen existieren Modelle zur verbesserten Stimulation von T-Zellen durch Aktivierung von stimulierenden Ko-Rezeptoren. So konnte eine verbesserte BiTE-vermittelte Lyse durch Aktivierung der Ko-Rezeptoren CD80, CD86 und CD28 gezeigt werden.(67) Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Modifikation der Tumor-Mikro-Umgebung, bspw.

durch Aktivierung von Stroma-Zellen mittels Antikörpern. Beispielsweise führte der Agonist 4-1BB zu einer vermehrten Stimulation von T-Zellen, wodurch im Zellversuch eine verbesserte BiTE-vermittelte Lyse von Zielzellen erreicht werden konnte.(70)

Eine letzte hier aufgeführte Möglichkeit bietet die Kombination von BiTEs mit zielgerichteten Medikamenten, welche eine Immunmodulation hervorrufen. Diese Medikamente zielen ebenfalls auf eine Verhinderung oder Verzögerung einer T-Zell-Erschöpfung ab. Zum einen besteht die Möglichkeit einer Kombination mit Dasatinib, einem Tyrosin-Kinase-Inhibitor, welcher auf Zielzellen die Expression von inhibierenden Ko-Rezeptoren vermindert.(69) Zum anderen kann Lenalidomid, ein immunmodulatorisches Medikament mit mehreren, zum Teil unbekanntem Wirkmechanismen, die immunologische Synapse zwischen T-Zellen und deren Zielzellen verstärken. Auf diese Weise konnte eine verbesserte Zytotoxizität von T-Zellen in Kombination mit AMG 330 erzielt werden.(68)

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Mechanismen hinter unterschiedlichem Therapieansprechen auf BiTEs bei Patienten mit rezidivierender und refraktärer AML weiter erforscht werden müssen. Diese Doktorarbeit vermittelt Einblicke in die T-Zell-(Dys)-Funktion bei mit AMG 330 oder AMG 673 behandelten AML-Patienten als Beispiel für eine BiTE-Therapie. Neben der T-Zell-Quantität (insbesondere im Hinblick auf das Verhältnis von Effektor- zu Target-Zellen) stellt auch die Qualität der T-Zell-Funktion (gemessen an Proliferation und Zytotoxizität inklusive Produktion von Zytokinen) eine therapie-relevante Grundlage für ein Therapie-Ansprechen dar. Damit leistet diese Doktorarbeit einen Beitrag zur Abschätzung eines Therapie-Ansprechens bei künftigen Patienten und liefert wichtige Informationen zur Entwicklung von neuen Therapie-Strategien.

Literaturverzeichnis

1. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*. 1951;4(1):39-59.
2. Newell LF, Cook RJ. Advances in acute myeloid leukemia. *Bmj*. 2021;375:n2026.
3. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
4. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Schönfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, von Berenberg-Gossler P, Wienecke A. Krebs in Deutschland für 2017/2018, 13. Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2021.
5. Röllig C, Ayuk FA, Braess J, Heuser M, Manz MG, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF, Zebisch A. Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML). Berlin: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; September 2022.
6. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt AS, Hagberg O, Höglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890-9.
7. Hao Q, Foroutan F, Han MA, Devji T, Nampo FK, Mukherjee S, Alibhai SMH, Rosko A, Sekeres MA, Guyatt GH, Brignardello-Petersen R. Prognosis of older patients with newly diagnosed AML undergoing antileukemic therapy: A systematic review. *PLoS One*. 2022;17(12):e0278578.
8. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien H-F, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
9. Schlenk RF, Döhner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:324-30.
10. Arfons LM, Tomblyn M, Rocha V, Lazarus HM. Second hematopoietic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(2):112-23.
11. Mohamed Jiffry MZ, Kloss R, Ahmed-Khan M, Carmona-Pires F, Okam N, Weeraddana P, Dharmaratna D, Dandwani M, Moin K. A review of treatment options employed in relapsed/refractory AML. *Hematology*. 2023;28(1):2196482.
12. Chen Y, Wang J, Zhang F, Liu P. A perspective of immunotherapy for acute myeloid leukemia: Current advances and challenges. *Front Pharmacol*. 2023;14:1151032.
13. Abaza Y, Zeidan AM. Immune Checkpoint Inhibition in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Cells*. 2022;11(14).
14. Taksin AL, Legrand O, Raffoux E, de Revel T, Thomas X, Contentin N, Bouabdallah R, Pautas C, Turlure P, Reman O, Gardin C, Varet B, de Botton S, Pousset F, Farhat H, Chevret S, Dombret H, Castaigne S. High efficacy and safety profile of fractionated doses of Mylotarg as induction therapy in patients with relapsed acute myeloblastic leukemia: a prospective study of the alfa group. *Leukemia*. 2007;21(1):66-71.
15. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-62.
16. Ogasawara M, Nozu R, Miki K, Sugimura S, Kojima K, Hidaka D, Ogasawara R, Okada K, Sugita J, Kobayashi N, Imamura M, Ota S. Donor Lymphocyte Infusion for Relapsed Acute Leukemia or Myelodysplastic Syndrome after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single-Institute Retrospective Analysis. *Intern Med*. 2023.
17. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, Ikeda H, Tanimoto K, Terakura S, Murata M, Inaguma Y, Masuya M, Inoue N, Kidokoro T, Okamoto S, Tomura D,

- Chono H, Nukaya I, Mineno J, Naoe T, Emi N, Yasukawa M, Katayama N, Shiku H. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood*. 2017;130(18):1985-94.
18. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359(6382):1361-5.
19. Ravandi F, Walter RB, Subklewe M, Buecklein V, Jongen-Lavrencic M, Paschka P, Ossenkoppele GJ, Kantarjian HM, Hindoyan A, Agarwal SK, Dai T, Khaldoyanidi S, Stein AS. Updated results from phase I dose-escalation study of AMG 330, a bispecific T-cell engager molecule, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (R/R AML). *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15_suppl):7508-.
20. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:139-76.
21. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994;76(2):287-99.
22. Stanley JO, Mohamed SA. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead*. 2017;3:250-61.
23. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323-70.
24. Haabeth OA, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lorvik KB, Hofgaard PO, Omholt H, Munthe LA, Dembic Z, Corthay A, Bogen B. How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol*. 2014;5:174.
25. Sun H, Li Y, Zhang ZF, Ju Y, Li L, Zhang BC, Liu B. Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2015;102(5):579-86.
26. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3(11):999-1005.
27. Zhou S, Liu M, Ren F, Meng X, Yu J. The landscape of bispecific T cell engager in cancer treatment. *Biomark Res*. 2021;9(1):38.
28. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmüller G, Dörken B, Bargou RC. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*. 2000;95(6):2098-103.
29. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619.
30. Daver N, Alotaibi AS, Buecklein V, Subklewe M. T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments. *Leukemia*. 2021;35(7):1843-63.
31. Einsele H, Borghaei H, Orłowski RZ, Subklewe M, Roboz GJ, Zugmaier G, Kufer P, Iskander K, Kantarjian HM. The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. *Cancer*. 2020;126(14):3192-201.
32. Haas C, Krinner E, Brischwein K, Hoffmann P, Lutterbüse R, Schlereth B, Kufer P, Baeuerle PA. Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*. 2009;214(6):441-53.
33. Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol*. 2001;22(6):337-42.
34. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy-Martin JP, Deconinck E, de Tilly PD, Bulabois B, Poulet J, Kuhlein E, Jacob MC, Salaun V, Arock M, Drenou B, Schillinger F, Seilles E, Tiberghien P, Bensa JC, Plumas J, Saas P. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2005;105(3):1256-64.

35. Vitale C, Romagnani C, Puccetti A, Olive D, Costello R, Chiossone L, Pitto A, Bacigalupo A, Moretta L, Mingari MC. Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5764-9.
36. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, Köhnke T, Lichtenegger FS, Schneider S, Metzeler KH, Fiegl M, Spiekermann K, Baeuerle PA, 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;123(3):356-65.
37. Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*. 2012;119(26):6198-208.
38. Maakaron JE, Rogosheske J, Long M, Bachanova V, Mims AS. CD33-Targeted Therapies: Beating the Disease or Beaten to Death? *J Clin Pharmacol*. 2021;61(1):7-17.
39. Aigner M, Feulner J, Schaffer S, Kischel R, Kufer P, Schneider K, Henn A, Rattel B, Friedrich M, Baeuerle PA, Mackensen A, Krause SW. T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct. *Leukemia*. 2013;27(5):1107-15.
40. Laszlo GS, Gudgeon CJ, Harrington KH, Dell'Aringa J, Newhall KJ, Means GD, Sinclair AM, Kischel R, Frankel SR, Walter RB. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. *Blood*. 2014;123(4):554-61.
41. Laszlo GS, Beddoe ME, Godwin CD, Bates OM, Gudgeon CJ, Harrington KH, Walter RB. Relationship between CD33 expression, splicing polymorphism, and in vitro cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin and the CD33/CD3 BiTE® AMG 330. *Haematologica*. 2019;104(2):e59-e62.
42. Amgen. A Phase 1 Study of AMG 330 in Subjects With Myeloid Malignancies. ClinicalTrials.gov identifier: NCT02520427. Updated November 14, 2022. Accessed June 11, 2023. [Available from: <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT02520427>].
43. Subklewe M, Stein A, Walter RB, Bhatia R, Wei AH, Ritchie D, Bücklein V, Vachhani P, Dai T, Hindoyan A, Agarwal S, Anderson A, Khaldoyanidi S, Ravandi F. Preliminary Results from a Phase 1 First-in-Human Study of AMG 673, a Novel Half-Life Extended (HLE) Anti-CD33/CD3 BiTE® (Bispecific T-Cell Engager) in Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2019;134(Supplement_1):833-.
44. Amgen. Study of AMG 673 in Subjects With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. ClinicalTrials.gov identifier: NCT03224819. Updated March 18, 2022. Accessed June 11, 2023. [Available from: <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT03224819>].
45. Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Lichtenegger FS, Köhnke T, Vick B, Jeremias I, Metzeler KH, Altmann T, Schneider S, Fiegl M, Spiekermann K, Bauerle PA, Hiddemann W, Riethmüller G, Subklewe M. Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. *Leukemia*. 2016;30(2):484-91.
46. Harrington KH, Gudgeon CJ, Laszlo GS, Newhall KJ, Sinclair AM, Frankel SR, Kischel R, Chen G, Walter RB. The Broad Anti-AML Activity of the CD33/CD3 BiTE Antibody Construct, AMG 330, Is Impacted by Disease Stage and Risk. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135945.
47. Friedrich M, Henn A, Raum T, Bajtus M, Matthes K, Hendrich L, Wahl J, Hoffmann P, Kischel R, Kvesic M, Slootstra JW, Baeuerle PA, Kufer P, Rattel B. Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33-bispecific T-cell-engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(6):1549-57.
48. Stamm H, Klingler F, Grossjohann E-M, Muschhammer J, Vettorazzi E, Heuser M, Mock U, Thol F, Vohwinkel G, Latuske E, Bokemeyer C, Kischel R, Dos Santos C, Stienen S, Friedrich M, Lutteropp M, Nagorsen D, Wellbrock J, Fiedler W. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene*. 2018;37(39):5269-80.

49. Kuusisto S, Tikkanen A, Lappi-Blanco E, Väisänen T, Knuutila A, Tiainen S, Ahvonen J, Iivanainen S, Koivunen JP. The prognostic and predictive roles of plasma C-reactive protein and PD-L1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* 2023.
50. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, Loeffler M. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2373-80.
51. Van Wilpe S, Koornstra R, Den Brok M, De Groot JW, Blank C, De Vries J, Gerritsen W, Mehra N. Lactate dehydrogenase: a marker of diminished antitumor immunity. *Oncoimmunology.* 2020;9(1):1731942.
52. Jain MD, Zhao H, Wang X, Atkins R, Menges M, Reid K, Spittler K, Faramand R, Bachmeier C, Dean EA, Cao B, Chavez JC, Shah B, Lazaryan A, Nishihori T, Hussaini M, Gonzalez RJ, Mullinax JE, Rodriguez PC, Conejo-Garcia JR, Anasetti C, Davila ML, Locke FL. Tumor interferon signaling and suppressive myeloid cells are associated with CAR T-cell failure in large B-cell lymphoma. *Blood.* 2021;137(19):2621-33.
53. Duell J, Dittrich M, Bedke T, Mueller T, Eisele F, Rosenwald A, Rasche L, Hartmann E, Dandekar T, Einsele H, Topp MS. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia.* 2017;31(10):2181-90.
54. Zugmaier G, Gökbuget N, Klinger M, Viardot A, Stelljes M, Neumann S, Horst HA, Marks R, Faul C, Diedrich H, Reichle A, Brüggemann M, Holland C, Schmidt M, Einsele H, Bargou RC, Topp MS. Long-term survival and T-cell kinetics in relapsed/refractory ALL patients who achieved MRD response after blinatumomab treatment. *Blood.* 2015;126(24):2578-84.
55. Jiménez-Fernández M, de la Fuente H, Martín P, Cibrián D, Sánchez-Madrid F. Unraveling CD69 signaling pathways, ligands and laterally associated molecules. *Excli j.* 2023;22:334-51.
56. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
57. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99.
58. Herrmann M, Krupka C, Deiser K, Brauchle B, Marcinek A, Ogrinc Wagner A, Rataj F, Mocikat R, Metzeler KH, Spiekermann K, Kobold S, Fenn NC, Hopfner KP, Subklewe M. Bifunctional PD-1 × α CD3 × α CD33 fusion protein reverses adaptive immune escape in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2018;132(23):2484-94.
59. Knaus HA, Berglund S, Hackl H, Blackford AL, Zeidner JF, Montiel-Esparza R, Mukhopadhyay R, Vanura K, Blazar BR, Karp JE, Luznik L, Gojo I. Signatures of CD8+ T cell dysfunction in AML patients and their reversibility with response to chemotherapy. *JCI Insight.* 2018;3(21).
60. Qiu D, Liu X, Wang W, Jiang X, Wu X, Zheng J, Zhou K, Kong X, Wu X, Jin Z. TIGIT axis: novel immune checkpoints in anti-leukemia immunity. *Clin Exp Med.* 2023;23(2):165-74.
61. Philipp N, Kazerani M, Nicholls A, Vick B, Wulf J, Straub T, Scheurer M, Muth A, Hänel G, Nixdorf D, Sponheimer M, Ohlmeyer M, Lacher SM, Brauchle B, Marcinek A, Rohrbacher L, Leutbecher A, Rejeski K, Weigert O, von Bergwelt-Baildon M, Theurich S, Kischel R, Jeremias I, Bücklein V, Subklewe M. T-cell exhaustion induced by continuous bispecific molecule exposure is ameliorated by treatment-free intervals. *Blood.* 2022;140(10):1104-18.
62. Nixdorf D, Sponheimer M, Berghammer D, Engert F, Bader U, Philipp N, Kazerani M, Straub T, Rohrbacher L, Wange L, Dapa S, Atar D, Seitz CM, Brandstetter K, Linder A, von Bergwelt M, Leonhardt H, Mittelstaet J, Kaiser A, Bücklein V, Subklewe M. Adapter CAR T cells to counteract T-cell exhaustion and enable flexible targeting in AML. *Leukemia.* 2023;37(6):1298-310.
63. Queudeville M, Stein AS, Locatelli F, Ebinger M, Handgretinger R, Gökbuget N, Gore L, Zeng Y, Gokani P, Zugmaier G, Kantarjian HM. Low leukemia burden improves blinatumomab efficacy in patients with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2023;129(9):1384-93.
64. Liu Y, Duong VH. Approach to the Treatment of Philadelphia Chromosome-Negative B-cell ALL in Older Adults: Is Age Becoming just a Number? *Curr Hematol Malig Rep.* 2023;18(3):68-74.

65. Iacoboni G, Navarro V, Martín-López AÁ, Rejeski K, Kwon M, Jalowiec KA, Amat P, Reguera-Ortega JL, Gallur L, Blumenberg V, Gutiérrez-Herrero S, Roddie C, Benzaquén A, Delgado-Serrano J, Sánchez-Salinas MA, Bailén R, Carpio C, López-Corral L, Hernani R, Bastos M, O'Reilly M, Martín-Martín L, Subklewe M, Barba P. Recent Bendamustine Treatment Before Apheresis Has a Negative Impact on Outcomes in Patients With Large B-Cell Lymphoma Receiving Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(10):JCO.23.01097.
66. LaPorte KM, Hernandez R, Santos Savio A, Malek TR. Robust IL-2-dependent antitumor immunotherapy requires targeting the high-affinity IL-2R on tumor-specific CD8(+) T cells. *J Immunother Cancer*. 2023;11(6).
67. Laszlo GS, Gudgeon CJ, Harrington KH, Walter RB. T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330. *Blood Cancer J*. 2015;5(8):e340.
68. Marcinek A, Brauchle B, Rohrbacher L, Hänel G, Philipp N, Märkl F, Strzalkowski T, Lacher SM, Udiljak D, Spiekermann K, Theurich S, Kobold S, Kischel R, James JR, Bücklein VL, Subklewe M. CD33 BiTE(®) molecule-mediated immune synapse formation and subsequent T-cell activation is determined by the expression profile of activating and inhibitory checkpoint molecules on AML cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(7):2499-512.
69. Philipp N, Subklewe M, Muth A, Bergwelt-Baildon MV, Bücklein V. 897 Partners for bispecifics: combinatorial approaches to augment T-cell function and mitigate exhaustion. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2022;10(Suppl 2):A934-A.
70. Hänel G, Neumann A-S, Pulko V, Claus C, Leutbecher A, Marcinek A, Zieger N, Buecklein VL, Umana P, Klein C, Subklewe M. Augmenting Efficacy of T-Cell Bispecific Antibodies in AML through a Tumor Stroma-Targeted 4-1BB Agonist. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):1178-.

Anhang: Patienteninformation

T-Zell Funktion bei Patient*innen mit akuten Leukämien und Lymphomen

Patienteninformation und Einverständniserklärung

Studienleiterin:

Prof. Dr. Marion Subklewe
Medizinische Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Universität München
Marchioninstr. 15
81377 München

Stellvertreter:

Dr. Veit Bücklein
Medizinische Klinik und Poliklinik III
Klinikum der Universität München
Marchioninstr. 15
81377 München
Tel.: 089/4400-71-2697

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

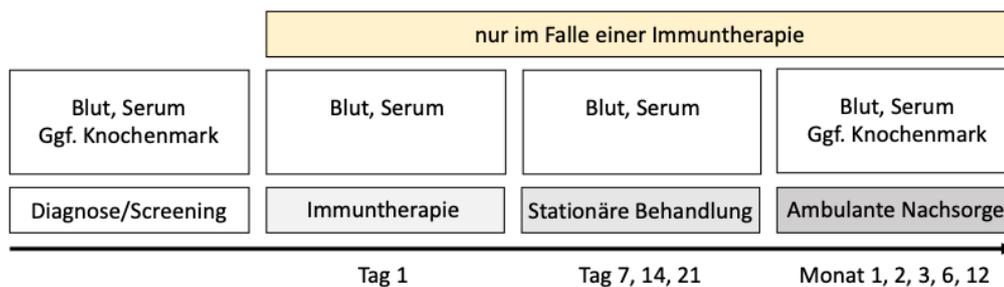
im Rahmen Ihrer Behandlung mit einer T-Zell-rekrutierenden Immuntherapie bieten wir Ihnen die Teilnahme an einer begleitenden Studie an. Durch Blutuntersuchungen wollen wir herausfinden, welchen Einfluss die Immuntherapie auf Ihr Immunsystem hat.

Die Teilnahme an diesem Immunprofiling ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen mit sofortiger Wirkung durch Sie beendet werden. Als Entscheidungsgrundlage möchten wir Sie neben der mündlichen Aufklärung durch Ihren behandelnden Arzt mit diesem Text über die Inhalte, Vorteile und Risiken sowie die Bedeutung dieser Untersuchung informieren. Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung dieser Untersuchung ist, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich erklären. Wir bitten Sie daher, sich Zeit zu nehmen, die folgenden Informationen sorgfältig durchzulesen, und Unsicherheiten und Fragen mit einer vertrauten Person und Ihrem behandelnden Arzt zu besprechen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur, wenn Sie Art und Ablauf der Untersuchung vollständig verstanden haben und wenn Sie Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser Untersuchung kennen. Das Projekt, die Probandeninformation und die Einverständniserklärung wurden von der zuständigen Ethikkommission geprüft.

Bei Ihnen soll eine Leukämie oder ein Lymphom behandelt werden. Ggf. ist für Sie auch eine Behandlung mit einer T-Zellrekrutierenden Immuntherapie geplant. Immuntherapien sind Therapieformen, die eine Zerstörung von Tumorzellen durch das Immunsystem bewirken. Im Rahmen dieses Projekts möchten wir weitere Informationen über die Funktion Ihrer Immunzellen, und dabei insbesondere Ihrer T-Zellen als für Immuntherapien wichtige Untergruppe Ihrer weißen Blutkörperchen gewinnen. Immuntherapien stellen eine neue Therapieform dar, die zwar sehr vielversprechende Erfolge erzielt, bei der bisher jedoch die Mechanismen, die zu einem Versagen der Therapie führen können oder die für das Auftreten von Nebenwirkungen verantwortlich sind, noch nicht vollständig verstanden sind. Ziel dieses Projektes ist es deshalb, zu verstehen, inwieweit sich Ihr Immunsystem z.B. bezüglich der Zusammensetzung unterschiedlicher Populationen von Immunzellen und Immunbotenstoffen vom Immunsystem gesunder Menschen unterscheidet. Dieses gewonnene Wissen könnte in Zukunft die Grundlage dafür bilden, diese neuen Immuntherapien noch wirksamer und besser verträglicher zu machen.

Dazu möchten wir insbesondere vor der aktuell für Sie geplanten Therapie Informationen zu Ihren Immunzellen gewinnen. Sollten Sie mit einer T-Zell-rekrutierenden Immuntherapie behandelt werden, möchten wir Sie fragen, ob wir durch serielle Blutentnahmen unter der laufenden Immuntherapie ein besseres Verständnis dafür erlangen können, wie sich Ihr Immunsystem unter der Therapie verändert. Im Rahmen der Behandlung Ihrer Erkrankung werden bereits routinemäßig Blut und Knochenmark entnommen. Für dieses Projekt möchten wir zu keinem zusätzlichen Zeitpunkt Material entnehmen, sondern wir möchten zu den Zeitpunkten, zu denen ohnehin Untersuchungsmaterial gewonnen wird, zusätzlich geringe Mengen für das geplante Monitoringprogramm entnehmen. Ein schematischer Ablauf ist in folgendem Schaubild dargestellt.



Was beinhaltet die Teilnahme an dieser Studie?

Erfassung von Daten: Im Rahmen dieser Studie werden Ihre Daten (Alter, Geschlecht, Art der Tumorerkrankung, Vortherapien, Therapiedauer, Nebenwirkungen, Laborbefunde etc.) pseudonymisiert gespeichert. Dies bedeutet, dass diese Daten – ebenso wie Untersuchungsmaterial wie z.B. Blut – nur unter Verwendung eines Codes gespeichert bzw. eingelagert werden. Anhand dieses Codes sind keine unmittelbaren Rückschlüsse auf Ihre Person möglich. Um eine Zuordnung von Untersuchungsergebnissen (z.B. dem Ansprechverhalten des Lymphoms oder der Leukämie auf die Therapie) mit den Ergebnissen von Labormessungen zu ermöglichen, wird eine Pseudonymisierungsliste angelegt. Der Zugang zu dieser Liste ist jedoch streng reglementiert.

Wissenschaftliche Untersuchung von Blut- und Knochenmarkproben: Die zusätzlich zu der im Rahmen der Routinediagnostik entnommenen Materialien werden für wissenschaftliche Untersuchungen im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik III sowie im Labor für translationale Tumorimmunologie der LMU München analysiert und aufbewahrt. Es sind keine zusätzlichen Punktionen notwendig. Zu den oben genannten Zeitpunkten der Standarddiagnostik werden jeweils zusätzlich 54ml Blut (= vier Esslöffel) und 4,5ml Serum entnommen. Vor und ggf. nach Beendigung der Immuntherapie (wenn Sie eine Immuntherapie erhalten) werden zudem bei Leukämiepatient*innen Knochenmarkpunktionen im Rahmen der Routineversorgung durchgeführt. Hier möchten wir ebenfalls zusätzliches Material (5-10ml = 1 Esslöffel Knochenmarksblut) entnehmen.

Was wird mit den Proben genau gemacht?

Aus den Proben werden Immunzellen isoliert und auf Veränderungen ihrer Oberflächenproteine sowie auf Veränderungen der Proteinherstellung untersucht. Weiterhin wird das Verhalten Ihrer Immunzellen in Zellkulturexperimenten untersucht. Zudem wird Ihr Blut auf das Vorhandensein wichtiger Immunbotenstoffe analysiert. Anhand von genetischen Analysen soll die Aktivität von Genen, die die T-Zell-Funktion beeinflussen, überprüft werden. Außerdem sollen mit Hilfe der Genschere (CRISPR/Cas9 Technologie) bestimmte Gene, die die T-Zell Funktion negativ beeinflussen, ausgeschaltet werden. Die genetischen Analysen dienen nicht der Diagnostik von Krankheiten oder Genmutationen. Es wird lediglich ihr Erbgut am Ort des ausgeschalteten Gens analysiert.

Hat meine Einwilligung Auswirkungen auf meine Behandlung?

Nein, die Behandlung Ihrer Tumorerkrankung obliegt weiterhin Ihrem behandelnden Arzt. Dazu gehört auch die Therapie von Nebenwirkungen nach international empfohlenen Leitlinien sowie die Kombination mit anderen Medikamenten oder die Umstellung auf andere Therapien im Falle eines fehlenden Ansprechens auf die (Immun-) Therapie. Ihre Einwilligung – oder auch die Verweigerung Ihrer Einwilligung – ändert daran nichts. Insofern ist nicht zu erwarten, dass sich aus der Teilnahme an diesem Forschungsprojekt ein persönlicher Vorteil für Sie ergibt. Wenngleich Sie selbst von diesen Untersuchungen also keinen unmittelbaren Nutzen haben, so ist Ihre Teilnahme in jedem Fall wertvoll für den wissenschaftlichen Fortschritt. Sie helfen damit anderen Patient*innen und Forscher*innen in der Weiterentwicklung einer persönlichen Krebsmedizin.

Wie läuft die Untersuchung ab?

Im Rahmen von Routineuntersuchungen werden Ihnen Blut und ggf. auch Knochenmark abgenommen. Es sind keine zusätzlichen Entnahmen vorgesehen (d.h. es wird Ihnen nicht häufiger Blut abgenommen werden, als es im Rahmen der Routineversorgung so oder so erfolgen muss). Über die Risiken und den Ablauf von Knochenmarkpunktionen werden Sie gesondert aufgeklärt.

Kann die Untersuchung abgebrochen werden?

Ja, Sie haben jederzeit die Möglichkeit, von der Teilnahme an der Untersuchung zurückzutreten. Hierfür ist es nicht notwendig, dass Sie uns eine Begründung mitteilen. Der verantwortliche Leiter des Projekts hat darüber

hinaus das Recht, Ihre Teilnahme an der Untersuchung zu beenden, wenn schwerwiegende Begleiterkrankungen, unannehmbar unerwünschte Ereignisse, Verletzungen des Untersuchungsprotokolls oder andere Gründe vorliegen, denen zufolge der Abbruch im besten medizinischen Interesse liegt.

Wie wird mein Persönlichkeitsrecht geschützt?

Rechtsgrundlage für die Datenverarbeitung ist Ihre freiwillige Einwilligung (Art. 6 Abs. 1 Buchst. a, Art. 9 Abs. 2 Buchst. a) DSGVO). Die Daten werden also nur dann erhoben, gespeichert, ausgewertet und weitergegeben, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Auch wenn Sie Ihre Einwilligung zunächst erteilen, können Sie sie ohne Angabe von Gründen widerrufen. Die Verantwortliche für die Datenverarbeitung ist die Studienleiterin Prof. Dr. Marion Subklewe.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde von Ihnen verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, verarbeitet und an die Initiatorin der Studie (Frau Prof. Dr. Subklewe) weitergeleitet. Zugriff auf die personenbezogenen Daten haben nur die Studienleitung und die Stellvertretung (Dr. Veit Bücklein), sowie vom Studienleiter zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitglieder des Studienteams.

Pseudonymisieren bedeutet, dass die erhobenen Daten ohne Hinzuziehung einer Liste nicht mehr einer spezifischen betroffenen Person zugeordnet werden können. Die personenbezogenen Daten, wie z. B. der Name und das Geburtsdatum, werden durch einen Nummerncode ersetzt. Im Studienzentrum ist eine Liste hinterlegt, auf der die Namen den Nummern- und Buchstabencodes zugeordnet sind. Diese Liste wird im Studienzentrum gesondert aufbewahrt und unterliegt dort technischen und organisatorischen Maßnahmen, die gewährleisten, dass die von Ihnen erhobenen Daten Ihnen durch unbefugte Personen nicht zugeordnet werden können. Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Eine Weitergabe Ihrer persönlichen Daten ist nicht geplant.

Sofern der Forscher eine Entschlüsselung aus wissenschaftlichen Gründen vornehmen möchte, wird zuvor eine Zustimmung der Ethikkommission eingeholt.

Die pseudonymisierten Daten werden 10 Jahre nach Beendigung oder Abbruch der Studie im Klinikum der Universität München sowie im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität in München aufbewahrt. Sie sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Sie werden gelöscht, wenn sie nicht mehr benötigt werden. Spätestens nach 10 Jahren werden sie gelöscht.

Im Falle von Veröffentlichungen bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Sie können Ihre jeweilige Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen schriftlich oder mündlich widerrufen, ohne dass Ihnen daraus ein Nachteil entsteht. Wenn Sie Ihre Einwilligung widerrufen, werden keine weiteren Daten mehr erhoben. Die bis zum Widerruf erfolgte Datenverarbeitung bleibt jedoch rechtmäßig.

Sollten Sie im Verlauf der Studie Ihre Einwilligung widerrufen, werden Sie gefragt, ob Sie mit der anonymisierten Weiterverwendung Ihrer Daten und ggf. Proben einverstanden sind oder ob eine Löschung der Daten bzw. Vernichtung der Proben erfolgen soll.

Sie haben das Recht, vom Verantwortlichen Auskunft über die von Ihnen gespeicherten personenbezogenen Daten (einschließlich einer kostenlosen Überlassung einer Kopie der Daten) zu verlangen. Ebenfalls können Sie die Berichtigung unzutreffender Daten sowie gegebenenfalls eine Übertragung der von Ihnen zur Verfügung gestellten Daten und die Einschränkung ihrer Verarbeitung verlangen. Darüber hinaus besteht ein Beschwerderecht bei der Datenschutz-Aufsichtsbehörde (s.u.).

Behördlicher Datenschutzbeauftragter
Klinikum der Universität München
Pettenkofersstraße 8
80336 München
datschutz@med.uni-munehen.de

Bayerische Landesbeauftragter für Datenschutz (BayLfD)
Postfach 221219
80502 München
oder
Wagmüllerstraße 18
80538 München
Tel.: 089212672-0

Bin ich im Rahmen dieser Studie versichert?

Nein, eine verschuldensunabhängige Versicherung wurde nicht abgeschlossen, da im Rahmen dieser Studie keine zusätzlichen Maßnahmen erfolgen, die nicht ohnehin im Rahmen Ihrer Krankheitsversorgung notwendig sind.

Wenn Sie diese Patienteninformation in Ruhe gelesen und mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden sind, dann bestätigen Sie dieses bitte mit Ihrer Unterschrift auf der Einwilligungserklärung. Dieses Einverständnis kann von Ihnen jederzeit und ohne Angaben von Gründen widerrufen werden.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten / der Patientin

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Versuchsteilnehmer/in am _____ über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken dieser klinischen Prüfung mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes / der Ärztin

Danksagung

Zunächst möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich mein Studium nicht hätte wahrnehmen und diese Dissertation schreiben können. Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Freundin, die mir Beistand geleistet und als gesunde Spender-Kontrollen gedient haben. Ein besonderes Dankeschön geht an Matthias Oettle für die aufgebrauchte Zeit und Mühe beim Korrekturlesen dieser Dissertation. Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Medizinischen Klinik III der Ludwigs-Maximilians-Universität gilt mein Dank für die Mithilfe bei der Koordination der Studienpatienten. Insbesondere danke ich dem Leiter Herrn Professor Michael von Bergwelt für die Zurverfügungstellung der Promotion, sowie Frau Professor Elfriede Nößner und Herrn Professor Karsten Spiekermann für die Supervision meiner Dissertation. Hervorzuheben ist Frau Professor Marion Subklewe, die mir diese Arbeit in ihrem Labor im Genzentrum der LMU ermöglichte. Für ihre zahlreichen Ideen, Einwände und die Geduld spreche ich meinen Dank aus. Unendlicher Dank geht an meinen Betreuer Dr. med. Veit Bücklein, der trotz seines enormen Arbeitspensums die Zeit für meine Begleitung durch die Laborzeit und zahlreiche Besprechungen auch im weiteren Verlauf finden konnte. Durch sein Wissen konnte er experimentelle Beobachtungen aus einer neuen Perspektive interpretieren und exzellente Ratschläge vermitteln. Auch allen anderen Personen im Labor möchte ich danken. Ob zur Einarbeitung, bei technischen Problemen, wenn mehr Hände zum Pipettieren benötigt wurden, wenn mal der Blutdienst nicht wahrgenommen werden konnte, oder beim Brainstorming von Problemen im Rahmen des Labmeeting, ich konnte mich immer auf alle Kollegen verlassen. Besonderer Dank geht an Sabine, die im Hintergrund für einen reibungslosen Laborbetrieb gesorgt und sich um unzählige organisatorische Dinge gekümmert hat. Dem Personal auf den Stationen der Medizinischen Klinik und Poliklinik III sind die Aufnahme der Patienten, Durchführung von Untersuchungen und Behandlungen im Rahmen der Studien zu verdanken. Auch allen anderen beteiligten Personen im LfL möchte ich für ihre Geduld bei meinen zahlreichen Fragen und Besuchen zur Datensammlung danken. Zuletzt gilt mein Dank den Patienten und ihren Angehörigen, welche ihre Daten freundlicherweise für die Studienzwecke im Rahmen der universitären Forschung zur Verfügung gestellt haben und damit zur Verbesserung der Therapie beitragen.

Affidavit



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Wulf, Jan

Name, Vorname

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

Identifikation prädiktiver und prognostischer Biomarker für das Ansprechen von Patienten mit refraktärer oder rezidivierter Akuter Myeloischer Leukämie auf Therapien mit bispezifischen T-Zell-Engagern (BiTE®)

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen 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.

München, 30.05.2025

Ort, Datum

Jan Wulf

Unterschrift Jan Wulf

Publikationsliste

- Nora Zieger, Alyssa Nicholls, Jan Wulf, Gerulf Hänel, Maryam Kazerani Pasikhani, Veit L. Buecklein, Bettina Brauchle, Anetta Marcinek, Daniel Nixdorf, Lisa Rohrbacher, Michaela Scheurer, Roman Kischel, Karsten Spiekermann, Oliver Weigert, Sebastian Theurich, Michael von Bergwelt, Marion Subklewe; Treatment-Free Intervals Mitigate T-Cell Exhaustion Induced By Continuous CD19xCD3-BiTE[®] Construct Stimulation in Vitro. *Blood* 2020; 136 (Supplement 1): 44–45. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2020-137421>
- Nora Zieger, Maryam Kazerani Pasikhani, Tobias Straub, Alyssa Nicholls, Gerulf Hänel, Jan Wulf, Michaela Scheurer, Daniel Nixdorf, Monika Sponheimer, Sonja M Lacher, Bettina Brauchle, Anetta Marcinek, Lisa Rohrbacher, Alexandra Leutbecher, Michael von Bergwelt, Karsten Spiekermann, Oliver Weigert, Sebastian Theurich, Veit L. Buecklein, Roman Kischel, Marion Subklewe; Treatment-Free Intervals during CD19xCD3 BiTE[®] Construct-Mediated T-Cell Stimulation Induce Functional Reinvigoration and Transcriptional Reprogramming of Exhausted T Cells. *Blood* 2021; 138 (Supplement 1): 513. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2021-150178>
- Nora Philipp, Maryam Kazerani, Alyssa Nicholls, Binje Vick, Jan Wulf, Tobias Straub, Michaela Scheurer, Amelie Muth, Gerulf Hänel, Daniel Nixdorf, Monika Sponheimer, Malte Ohlmeyer, Sonja M. Lacher, Bettina Brauchle, Anetta Marcinek, Lisa Rohrbacher, Alexandra Leutbecher, Kai Rejeski, Oliver Weigert, Michael von Bergwelt-Baildon, Sebastian Theurich, Roman Kischel, Irmela Jeremias, Veit L. Buecklein, Marion Subklewe; T-cell exhaustion induced by continuous bispecific molecule exposure is ameliorated by treatment-free intervals. *Blood* 2022; 140 (10): 1104–1118. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2022015956>
- Viktoria Blumenberg, Maryam Kazerani, Stephan Baumann, Tobias Straub, Francesco Corrado, Jan Wulf, Galina Busch, Kai Rejeski, Lisa Fröhlich, Christian Schmidt, Michael von Bergwelt-Baildon, Veit L. Buecklein, Marion Subklewe; Phenotypic, Transcriptomic and Proteomic Characteristics of CAR T-Cell Dysfunction Are Associated with Inferior CAR T-Cell Expansion and Treatment Failure in r/r B-NHL. *Blood* 2023; 142 (Supplement 1): 3439. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2023-187495>
- Francesco Corrado, Jan Wulf, Tobias Straub, Daniel Nixdorf, Anetta Marcinek, Nora Philipp, Chang-Feng Chu, Christina Zielinski, Michael von Bergwelt-Baildon, Viktoria Blumenberg, Maryam Kazerani, Marion Subklewe, Veit L. Buecklein; Single-Cell Transcriptomic Profiling of T Cells from Blinatumomab-Treated Patients with B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) Reveals Circulating CD8 T Cell Subsets Associated with Treatment Response. *Blood* 2023, 142 (Supplement 1): 600. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2023-188970>