

Aus dem  
Charité Comprehensive Cancer Center  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Ulrich Keilholz  
und dem  
CharitéCentrum für Tumormedizin,  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie,  
Campus Benjamin Franklin  
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Antonio Pezzutto

## **Habilitationsschrift**

# **Gerichtete T-Zelltherapie bei der akuten myeloischen Leukämie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin und  
Hämatologie und Onkologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Sebastian Ochsenreither  
aus Karlsruhe

Eingereicht: April 2016  
Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries  
1. Gutachter: Prof. Dr. Wolf-K. Hofmann, Mannheim  
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Brossart, Bonn

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Immunsystem und Tumorgenese	3
1.2	Elemente der zellulären antineoplastischen Immunantwort	4
1.3	T-Zellrezeptoren, T-Zellepitope und zentrale Selektion	5
1.4	Prinzipien der gerichteten T-Zelltherapie	7
1.5	Die leukämische Stammzelle bei der AML	10
1.6	Leukämie-assoziierte Antigene bei der AML	11
1.7	Zielsetzung	12
<b>2</b>	<b>Eigene Arbeiten</b>	<b>14</b>
2.1	Peptidvakzinierung gegen WT1: Charakterisierung Vakzine-induzierter T-Zellantworten und potentielle Resistenzmechanismen	14
2.2	Vakzinierung mit dendritischen Zellen: Optimierung der Prozessierung und Präsentation	41
2.3	Adoptiver Transfer von WT1-spezifischen T-Zellklonen: Machbarkeit, klinische Wirksamkeit und möglicher Einfluss des Herstellungsprozesses auf Phänotyp und Persistenz des Zellprodukts	52
2.4	Neue T-Zell-Antigene bei der AML: Identifikation von Zielproteinen im leukämischen Stammzellkompartiment	66
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
3.1	Aktueller Stand der Immuntherapie maligner Erkrankungen	78
3.2	Autologe Konzepte der gerichteten T-Zelltherapie bei der AML	80
3.3	Aspekte der adoptiven Therapie jenseits von Spezifität und Affinität	83
3.4	Neue T-Zellantigene für die AML und andere Tumorentitäten	84
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem und Tumorgenese

Die Hypothese, dass kontinuierlich maligne Zellen in unserem Körper entstehen, die Etablierung von manifesten Tumoren aber durch immunologische Reaktionen verhindert wird, wurde erstmals von Paul Ehrlich 1909 formuliert. Darauf aufbauend wurde von Burnet und Thomas 1957 der Begriff der *immunosurveillance* geprägt. Die Autoren postulierten, dass es im gesunden Organismus kontinuierlich zur malignen Transformation somatischer Zellen kommt, die Etablierung einer manifesten Tumorerkrankung jedoch durch effiziente Elimination dieser initiierten neoplastischen Zellen durch eine suffiziente antitumorale Immunantwort verhindert wird<sup>1</sup>. Diese Hypothese wurde später durch die klinische Beobachtung gestützt, dass bei Patienten mit sekundärem T-Zelldefekt z. B. durch medikamentöse Immunsuppression oder durch Infektion mit dem HI-Virus sehr viel häufiger maligne Erkrankungen auftraten als bei immunkompetenten Individuen<sup>2-4</sup>. Die Etablierung eines Malignoms erfolgt nach diesem Modell entweder bei initial insuffizienter *immunosurveillance* oder bei erfolgreicher Evasion der neoplastischen Zellpopulation, wobei durch initial effiziente immunologische Reaktionen gegen genetisch alterierte präneoplastische und neoplastische Zellen Subpopulationen selektioniert werden, die durch Modifikationen in der Antigen-Präsentation oder durch die Entwicklung immunmodulatorischer Mechanismen einer suffizienten *immunosurveillance* entgehen.

Eine antitumorale, zellvermittelte Immunantwort hat auch bei bereits etablierten Tumoren klinische Relevanz. In vielen Tumorentitäten sind Tumor-infiltrierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit einer besseren Prognose, jedoch die Infiltration durch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) mit negativer Prognose vergesellschaftet<sup>5-7</sup>. Der selektive Druck einer effizienten T- oder ‚Natürliche Killer‘ (NK)-Zell-vermittelten Immunantwort z. B. im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation (HSCT) oder einer gerichteter T-Zelltherapie kann zu einer Modulation des immunologischen Phänotyps der malignen Zellen führen (*immunoediting*), bei der die Malignome im Rezidiv oder bei Therapie-Refraktärität oft das Antigen oder Proteine der Prozessierungsmaschinerie herunterregulieren und so einer T-Zellantwort entkommen<sup>2</sup>.

## 1.2 Elemente der zellulären antineoplastischen Immunantwort

Die zelluläre Komponente des Immunsystems lässt sich in Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunität unterteilen. Zellen der angeborenen Immunität sind Zellpopulationen wie Makrophagen, Monozyten oder NK-Zellen, die unspezifisch körperfremde Pathogene erkennen und eliminieren; Zellen der erworbenen Immunität sind T- und B-Zellen, welche Epitop-spezifisch Pathogene opsonieren oder direkt Zielzellen mit verändertem oder fremdem Protein-Repertoire lysieren. Die unspezifische Immunreaktion beginnt in der Regel schneller, wohingegen die erworbene Immunität in der Lage ist, ein ‚Gedächtnis‘, also ein *memory*-Kompartiment zu bilden. Die beiden Komponenten sind eng miteinander verknüpft. Eine adäquate T-Zellantwort setzt immer die Antigen-Präsentation durch eine professionelle Antigen-präsentierende Zelle (APC) im Kontext mit einer adäquaten Kostimulation voraus. Die Entzündungsreaktion, die mit Hypervaskularisierung, Chemotaxis und Aktivierung von APC einhergeht, wird vor allem durch die Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt<sup>8</sup>.

Die wichtigste Effektor-Zellpopulation der erworbenen antitumoralen Immunantwort ist die der CD8<sup>+</sup> CTL. Viele T-Zelltherapie-Strategien zielen auf die Generierung und / oder Aktivierung tumorspezifischer CTL zur Elimination neoplastischer Zellen und gegebenenfalls Entwicklung eines robusten *memory*-Kompartiments zur Verhinderung eines Rezidivs oder metastatischer Absiedlungen ab. Für eine effektive antitumorale T-Zellantwort spielt neben der absoluten Zahl spezifischer T-Zellen eine Reihe von weiteren Faktoren eine Rolle:

1. Die Funktionalität der zytotoxischen T-Zellantwort beschreibt den Anteil an T-Zellen in der spezifischen Population, der nach Stimulation mit dem jeweiligen Antigen mehrere oder alle Zytokine der klassischen Typ 1 T-Helfer (T<sub>H1</sub>)-Zellen (IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ ) produzieren, also polyfunktional sind. Polyfunktionale CTL haben eine höhere proliferative Kapazität und exprimieren mehr Granzym B und Perforin. Polyfunktionalität ist ein wesentlicher Faktor für eine suffiziente Kontrolle chronischer Virusinfektionen und spielt wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle für eine klinisch relevante antineoplastische Immunantwort<sup>9</sup>.
2. Die Differenzierung der T-Zellen gibt unter anderem Aufschluss über einen stattgehabten Antigenkontakt und eine mögliche Antigenpersistenz. Im Gegensatz zu Antigen-naiven CTL (T<sub>N</sub>), bei welchen keinerlei Differenzierung in Richtung *memory*- oder *effector* (T<sub>eff</sub>)-Zellen stattgefunden hat, wird bei Patienten mit Leukämie-assoziierten Antigen (LAA)-exprimierenden Malignomen eine Differenzierung in Richtung *effector memory* (T<sub>em</sub>) oder T<sub>eff</sub> beobachtet<sup>10,11</sup>. Die Prädominanz von *central memory*-Zellen (T<sub>cm</sub>) ist assoziiert mit Elimination des Antigens und in Einzelfällen mit einer dauerhaften Tumorkontrolle<sup>12-14</sup>. Daneben ist der Verlust der

Oberflächenmarker CD27, CD28 und CD127 ein Indikator für die Differenzierung in Richtung Effektorzelle<sup>15</sup>.

3. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum einer suffizienten T-Zellantwort ist die Migration ins Tumorkompartiment, bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) also das Knochenmark<sup>16</sup>.

CD4<sup>+</sup> T<sub>H1</sub>-Zellen unterstützen die zellvermittelte Zerstörung von Zellen und Zellverbänden und die Entwicklung eines T<sub>H1</sub>-*memory*-Kompartiments. Darüber hinaus können CD4<sup>+</sup> T-Zellen selbst Zytotoxizität entwickeln. Typ 2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>H2</sub>-Zellen) hingegen begünstigen eine humorale Polarisierung der Immunreaktion, unterstützen also die Antikörperproduktion, während eine zytotoxische Reaktion gebremst wird. Chronische Entzündungen, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen, gehen meist mit einer T<sub>H2</sub>-Polarisierung einher<sup>17</sup>.

Natürlich vorkommende oder Antigen-induzierte T<sub>reg</sub> hemmen die Funktion von CTL und NK-Zellen bzw. erschweren deren Aktivierung. Eine Reihe von Mediatoren, welche bei chronischen Entzündungen freigesetzt werden (z. B. Prostaglandin E2, IL-2) führt zur Aktivierung und Proliferation von T<sub>reg</sub> und somit zur Verstärkung des hemmenden Effekts auf Immunzellen des angeborenen wie auch des erworbenen Immunsystems.

### 1.3 T-Zellrezeptoren, T-Zellepitope und zentrale Selektion

In jeder vitalen Zelle im Organismus findet kontinuierlich die Synthese und Degradation von Proteinen statt. Letztere wird vor allem durch Proteasomen und extraproteasomale Aminopeptidasen durchgeführt, welche die Proteine in kurze Peptide spalten (Prozessierung) und diese ins endoplasmatische Retikulum (ER) sezernieren. Durch hoch-affine Bindung von Peptiden von meist neun, manchmal auch mehr Aminosäuren (AA) Länge an Moleküle des humanen Leukozytenantigen (HLA)-Systems (Synonym: *Major Histocompatibility Complex*, MHC) der Klasse I kommt es zu einer Stabilisierung des Peptid-MHC-Komplexes (pMHC), einer Transition der pMHC vom ER zur Zelloberfläche und zu einer Präsentation des Peptids, welches im Falle von Immunogenität im Kontext mit dem MHC-Molekül Epitop genannt wird. Epitope, die von Klasse-I-MHC präsentiert werden, werden ausschließlich von CD8<sup>+</sup> CTL erkannt, wobei der T-Zellrezeptor (TCR) mit Epitop und MHC-Molekül und CD8 mit dem MHC-Molekül interagiert. Die Affinität eines Peptids zum einem MHC-Molekül hängt entscheidend von der AA-Sequenz des Peptids und von den geometrischen und sterischen Verhältnissen des jeweiligen MHC ab. Das häufigste MHC Klasse-I-Molekül in der

kaukasischen Population ist HLA A\*02:01. Wenn einzelne Epitope als Ziel für eine gerichtete T-Zelltherapie verwendet werden, wird deshalb in der Regel ein HLA A\*02:01-restringiertes Epitop gewählt.

Der TCR definiert die Spezifität der T-Zelle. Er setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen, deren Diversität durch somatische Rekombination während der T-Zellentwicklung im Thymus generiert wird. Hierbei wird jeweils ein *variable* (V)-, ein *joining* (J)- und im Falle der  $\beta$ -Kette ein *diversity* (D)-Segment an das *constant* (C)-Segment rekombiniert, wobei zusätzlich zufällige Deletionen und Insertationen von Nukleotiden zwischen den Segmenten auftreten. Durch die somatischen Rekombinationsschritte entsteht ein höchst diverses T-Zellrepertoire. Theoretisch sind auf Basis dieses Mechanismus'  $10^{15-20}$  unterschiedliche T-Zellklonotypen denkbar, eine Zahl, welche die absolute Anzahl an T-Zellen im menschliche Organismus um mehrere Zehnerpotenzen überschreitet<sup>18</sup>. Die C-Segmente bilden die transmembrane Domäne und sind extrazellulär durch eine Disulfidbrücke verbunden. Beide Ketten interagieren an je drei Punkten, den *complementary determining regions* (CDR), mit dem pMHC. Die CDR1 und CDR2 der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette werden allein vom V-Segment kodiert und interagieren vor allem mit Strukturen des MHC. Die hoch-variablen CDR3 werden von Teilen der V- und J-Segmente, den *random nucleotides* und im Falle von der  $\beta$ -Kette zusätzlich durch das komplette D-Segment gebildet und interagieren hauptsächlich mit dem gebundenen Epitop<sup>19</sup>.

Die Affinität eines TCR (also die Stärke der monomere Bindung eines TCR an ein pMHC) hängt von diversen Faktoren ab und ist deshalb nicht zu prädiktieren. Die Konformation des TCR wird durch die AA-Sequenz beider Ketten definiert; die Position des TCR auf dem pMHC hängt von der relativen Position und der AA-Sequenz aller sechs CDR, vom Epitop und vom MHC-Molekül ab<sup>19</sup>. Im Gegensatz zur Affinität des TCR beschreibt die Avidität einer T-Zelle die Stärke der multimeren Interaktion diverser TCR und CD8 mit diversen pMHC. Die funktionelle Avidität beschreibt die Sensitivität einer T-Zelle für ein Antigen und wird in der Regel als Peptid-Konzentration angegeben, welche eine halb-maximale Aktivierung der T-Zellen (z. B. zytotoxische Aktivität, Proliferation, Zytokin-Produktion) auslöst ( $EC_{50}$ ). Avidität und funktionelle Avidität korrelieren häufig miteinander, aber die funktionelle Avidität ist neben der Affinität des TCR auch von der Expression von TCR und Korezeptoren und von Alterationen im TCR-*signaling* abhängig<sup>20</sup>. Auf Ebene des Epitops sind weitere kritische Faktoren für die Auslösung einer effizienten T-Zellantwort die Affinität des Peptids zur HLA-Bindungstasche, das Proteasomen-Repertoire der Zellen (Standardproteasom, Immunoproteasom, intermediäre Proteasomen) sowie extraproteosomale Aminopeptidasen und deren jeweiligen Sequenz-spezifischen Proteaseaktivitäten und die Affinität der Epitop-

Vorläuferpeptide zu *transporter associated with antigen processing* (TAP)-Molekülen, die für die Beladung der MHC-Moleküle mit den Peptiden wichtig sind<sup>21</sup>.

Neben der Selektion von T-Zellen mit funktionell rekombiniertem TCR und der Definition der Linienzugehörigkeit (CD8<sup>+</sup> T-Zelle, CD4<sup>+</sup> T-Zelle,  $\gamma\delta$ -T-Zelle, NKT-Zelle) findet im Thymus die zentrale negative Selektion statt, bei der T-Zellen mit hoch-aviden Bindung zu APC, die Epitope des physiologischen Proteinrepertoires präsentieren, eliminiert werden. Vorausgesetzt, dass das gesamte Proteom repräsentativ im Thymus exprimiert, prozessiert und präsentiert wird, führt dies zu einem peripheren T-Zellrepertoire mit deutlich niedriger Avidität gegenüber Selbstantigenen verglichen mit Fremdanitigenen wie viralen Peptiden oder Malignom-assoziierten somatischen Mutationen<sup>22</sup>. Inwieweit onko-fetale oder Gametopoese-assoziierte Selbstantigene im Thymus-Mark ähnlich stringent exprimiert werden wie das klassische vizerale Proteom, ist derzeit nicht abschließend geklärt<sup>23</sup>.

#### 1.4 Prinzipien der gerichteten T-Zelltherapie

Die gerichtete T-Zelltherapie ist eine Immuntherapie, bei der T-Zellen mit bekannter Spezifität gegen Malignome eingesetzt werden. Sie unterscheidet sich von ungerichteten T-Zelltherapie-Konzepten wie dem adoptiven Transfer von *in vitro* expandierten Tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TIL), Vakzinierung mit Tumorlysaten oder Checkpoint-Inhibition, bei denen die Spezifität der TCR in der Regel nicht bekannt ist.

Typische Strategien einer gerichteten T-Zelltherapie sind:

1. eine Vakzinierung mit Peptiden, Proteinen oder autologen dendritischen Zellen (DC). Bei Vakzinierungen mit Peptiden oder Proteinen werden in der Regel Adjuvantien verwendet, welche zu einer Aktivierung und Maturierung professioneller APC, vor allem der lokalen DC *in vivo* führt<sup>24</sup>. Bei der Vakzinierung mit DC werden DC *in vitro* aus autologen mononukleären Zellen (PBMC) durch Selektion und Differenzierung gewonnen und mit dem Antigen transfiziert<sup>25</sup>.
2. der adoptive Transfer von spezifischen T-Zelllinien oder -klonen. Für die adoptive Zelltherapie mit autologen T-Zelllinien oder -klonen werden spezifische CTL *in vitro* durch Stimulation mit dem jeweiligen Epitop expandiert. Dieser Ansatz wird im Kontext mit HSCT auch mit allogenen T-Zellen des Spenders verfolgt<sup>26</sup>.
3. der adoptive Transfer von genetisch modifizierten T-Zellen. Für die adoptive T-Zelltherapie mit genetisch modifizierten Zellen werden autologe T-Zellen *in vitro* unspezifisch stimuliert, mit einem TCR oder einem chimären Antigenrezeptor (CAR) transfiziert und nach Lymphodepletion dem Patienten reinfundiert<sup>27</sup>. CAR sind

artifizielle Hybridproteine, bei denen ein *single chain-Fv*-Fragment (scFv) eines Antikörpers über einen *spacer* an die CD3 $\zeta$  transmembranöse Domäne gekoppelt wird. Dieses Konstrukt wird zusätzlich mit kostimulatorischen Elementen versehen, sodass hier die Aktivierung eines TCR simuliert wird, die aber nicht durch ein pMHC-Molekül sondern durch eine membranständige Struktur ausgelöst wird<sup>28</sup>.

4. die Applikation eines bispezifische T-Zellaktivatoren, welcher T-Zellen *in vivo* unabhängig von der eigenen Spezifität in Anwesenheit eines Zielproteins aktiviert. Bispezifische T-Zell-Aktivatoren sind synthetische Antikörper oder gekoppelte scFv-Elemente, welche gleichzeitig CD3 auf der T-Zelle und das Antigen auf der Zielzelle binden, und so zu einer Antigen-spezifischen, TCR-Spezifität-unabhängigen Aktivierung von T-Zellen *in vivo* führen<sup>29</sup>.

Die wichtigsten Vor- bzw. Nachteile der unterschiedlichen Strategien der gerichteten T-Zelltherapie sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

**Tabelle 1: Vor- und Nachteile gerichteter T-Zelltherapie-Strategien**

		HLA- Restriktion	Intrazelluläre Antigene	Negative Selektion	Zellkultur <i>in vitro</i>
Vakzinierung	Peptid	+	+	+	-
	Protein, Peptid- <i>pool</i>	-	+	+	-
	DC	-	+	+	+
Adoptive T-Zelltherapie	T-Zelllinien / -klone	+	+	+	+
	TCR-transgene T-Zellen	+	+	-/+	+
	CAR-transgene T-Zellen	-	-	-	+
	Bispezifische T-Zellaktivatoren	-	-	-	-

Die Vakzinierung mit HLA-restringierten Epitopen ist die in der klinischen Praxis am einfachsten durchführbare Methode einer gerichteten T-Zelltherapie bei malignen Erkrankungen. Es erfolgt keinerlei Prozessierung von vitalen Zellen *in vitro*; alle Schritte des T-Zell-*primings* erfolgen *in vivo* in den lokalen Lymphknoten, welche das vakzinierete Hautareal drainieren. Die Aktivierung und Maturierung der DC erfolgt durch die Applikation von Zytokinen und / oder *toll-like receptor* (TLR)-Agonisten. Danach wird das Peptid appliziert, welches im aktivierten Lymphknoten den CTL präsentiert wird. Nachteil der

Methode ist, dass nur die T-Zellen stimuliert werden, die in der Peripherie des Patienten zum Zeitpunkt der Vakzinierung vorhanden sind. Das bedeutet im Falle einer Vakzinierung mit einem Selbstantigen, dass prinzipiell nur zentral negativ selektionierte T-Zellen, also T-Zellen mit einem potentiell niedrig-affinen TCR stimuliert werden, was die Effektivität der CTL-Antwort speziell bei geringer Expression des Antigens im malignen Zellkompartiment deutlich limitieren kann. Darüber hinaus hängt die Effektivität der Vakzinierung von einer Reihe anderer Faktoren ab. Diese beinhalten neben der Funktionalität der CTL, die bei Patienten mit AML sowohl durch die Grunderkrankung als auch durch vorangegangene Therapien beeinträchtigt sein kann, auch immunsuppressive Faktoren im Tumorkompartiment, z. B. Aktivierung von Checkpoint-Rezeptoren, ein suppressives Zytokinmilieu und regulatorische Zellelemente.

Die DC-Vakzinierung hat den Vorteil, dass auf die Differenzierung der DC mehr Einfluss genommen werden kann, da diese *in vitro* erfolgt. Darüber hinaus kann das Antigen in die DC transfiziert werden, was zur endogenen Prozessierung und Präsentation des Antigens führt. So besteht keine Restriktion des HLA-Typs, und es können diverse T-Zellpopulation gegen unterschiedliche Epitope im Kontext mit mehreren autologen MHC-Molekülen *in vivo* stimuliert werden. Die Polyspezifität dieser Antwort soll eine Anpassungsreaktion durch den Tumor z. B. durch Herunterregulation einzelner HLA-Moleküle erschweren. Dennoch bleibt der Nachteil eines potentiell negativ selektierten T-Zellrepertoires mit konsekutiv niedrig-affinen TCR und die oben aufgeführten weiteren Faktoren, die eine suffiziente T-Zellantwort speziell im Falle einer AML weiter beeinträchtigen, erhalten.

Die Therapie mit adoptiven T-Zelltransfer hat den Vorteil, dass die eigentlichen Effektoren (die CTL) außerhalb des Patienten aktiviert und expandiert werden. So wird eine insuffiziente Stimulation, eine Exposition mit immunsuppressiven Zytokinen und Zellpopulationen und eine frühzeitige Inaktivierung durch Checkpoint-Liganden vermieden<sup>27</sup>. Des Weiteren kann durch unterschiedliche Protokolle für die Stimulation und Kultivierung der Zellen direkt Einfluss auf Funktionalität und Differenzierung genommen werden<sup>15</sup>. Ein adoptiver Transfer von T-Zellen erfolgt häufig nach chemotherapeutischer Lymphodepletion. Diese führt zu einer deutlichen Reduktion der  $T_{reg}$ , einer unspezifischen inflammatorischen Reaktion und einem relativen Überschuss an homöostatischen Zytokinen. Alle diese Mechanismen tragen dazu bei, dass lokale immunsuppressive Faktoren im Tumorkompartiment überwunden werden<sup>30</sup>. Wird mit autologen T-Zelllinien oder -klonen therapiert, bleibt das Problem des vorselektierten Repertoires und der damit verbundenen niedrigen TCR-Affinität bestehen. Wird eine T-Zellprodukt appliziert, welches mit einem TCR transfiziert wurde, ist die Affinität dieses TCR nicht mehr abhängig vom TCR-Repertoire des Spenders, und es besteht die

Möglichkeit, einen alloreaktiven oder affinitätsmaturierten TCR zu verwenden. In diesem Fall besteht in erster Linie die Gefahr einer *on target/off tumor*-Toxizität (die T-Zellen erkennen auf Grund der hohen Avidität der T-Zellen das Epitop in gesundem Gewebe, was zu immunvermittelter Toxizität führt)<sup>31</sup> sowie einer *off target*-Toxizität (durch fehlende negative Selektion des alloreaktiven Repertoires oder des modifizierten initial autologen TCR<sup>32</sup> oder durch Fehlpaarung der endogenen mit den exogenen TCR-Ketten<sup>33</sup> kommt es zu Reaktivität gegen andere Epitope). Bei der adoptiven T-Zelltherapie ist neben der LAA-spezifischen Avidität der T-Zellen vor allem deren Persistenz im Patienten entscheidend für einen klinischen Therapieerfolg<sup>34</sup>. Neben der Lymphodepletion vor Therapie<sup>35</sup> oder einer Zytokinapplikation<sup>36</sup> nach dem Transfer spielt die verwendete T-Zellsubpopulation eine maßgebliche Rolle. Daten zur *in vivo*-Persistenz, proliferativen Kapazität und *memory*-Formation nach Transfer implizieren, dass sich T<sub>cm</sub> am besten für eine adoptive Therapie eignen<sup>37</sup>.

## 1.5 Die leukämische Stammzelle bei der AML

Analog zur gesunden Hämatopoese finden sich in der AML hierarchisch strukturierte Subpopulationen maligner hämatopoetischer Zellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade, die auf das sogenannte leukämische Stammzell-(LSC)-Kompartiment aufbauen. LSC sind neben unbegrenzter proliferativer Kapazität unter anderem durch Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Noxen und radioaktiver Strahlung charakterisiert<sup>38,39</sup>. Bei AML-Patienten mit intermediärem oder hohem Risiko ist die Elimination dieses LSC-Kompartiments und somit eine langanhaltende Remission meist nur durch Zell-vermittelte Zytotoxizität (den *graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekt) im Rahmen einer HSCT oder durch Gabe von Donorlymphozyten (DLI) nach HSCT zu erreichen<sup>40</sup>. Auf Grund der hohen Toxizität dieser Therapien sowohl wegen der intensiven Konditionierung als auch der Alloimmunphänomene (*graft-versus-host* (GvH)-Reaktion) nach Transplantation ist die HSCT durch hohe Morbidität und Mortalität ausgezeichnet und bei vielen Patienten kontraindiziert.

Theoretisch lässt sich der zellvermittelte anti-LSC-Effekt auch durch eine gerichtete T-Zelltherapie im Sinne einer Peptidvaksinierung oder eines Transfers von T-Zellen mit definierter Spezifität erreichen. Der Vorteil dieser Therapieansätze ist, dass statt eines kompletten alloreaktiven T-Zellrepertoires lediglich T-Zellen spezifisch für ein oder wenige definierte Epitope expandiert oder übertragen werden. So kann bei selektiver Expression des entsprechenden Antigens bzw. Epitops ein GvL-Effekt ohne relevanten GvH-Effekt erreicht werden<sup>26</sup>.

Bei AML-Patienten finden sich spontane T-Zellantworten gegen LAA sehr viel häufiger als in gesunden Probanden<sup>10</sup>. Daraus lässt sich folgern, dass LAA-Epitope adäquat prozessiert und präsentiert werden, und dass diese Präsentation eine Expansion LAA-spezifischer CTL zur Folge hat. Dies impliziert, dass auch die aktive Immunisierung zu einer Expansion und Aktivierung LAA-spezifischer CTL führen kann. Der adoptive Transfer eines autologen T-Zellklons hat bisher keinen klinischen Vorteil im Vergleich zur Vakzinierung gezeigt. Die wahrscheinlich wirksamere Option der adoptiven T-Zelltherapie ist der retro- oder lentivirale Transfer eines TCR gegen ein LAA mit hoher Affinität in polyklonale T-Zellen des Patienten (bei Kontraindikation gegen HSCT) oder des Spenders (nach allogener HSCT). Der Transfer von autologen T-Zelllinien oder -klonen kann ebenso wie der Transfer von TCR-transgenen, polyklonalen T-Zellen bei älteren oder komorbiden Patienten eine Alternative zur HSCT darstellen. Im Falle von allogenen transplantierten Patienten stellt er eine adjuvante Option in hochrisiko-Konstellationen oder eine Therapieoption in der Rezidiv-Situation nach HSCT dar<sup>41</sup>.

## 1.6 Leukämie-assoziierte Antigene bei der AML

Der erste essentielle Schritt zur Entwicklung einer jeden gerichteten T-Zelltherapie ist die Identifikation eines geeigneten Antigens. Ein optimales T-Zellantigen zur Behandlung der AML sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

1. hohe Expression in AML-LSC (mit oder ohne Expression in Blasten)
2. minimale / keine Expression in gesunden Geweben und der Hämatopoese insbesondere der hämatopoetischen Stammzelle (HSC)
3. Überexpression in einem hohen Prozentsatz der Patienten
4. funktionelle Relevanz für die malignen Zellen ohne essentielle Funktion in gesunden Geweben
5. innerhalb der Zielzellpopulation homogenen Expression
6. zytoplasmatische bzw. nukleäre Expression<sup>42</sup>

Neben Rezeptoren wie CD33 oder CD123 als potentielle Kandidaten für Antikörper- oder CAR-basierte Therapieansätze wurden eine Reihe von Selbstantigenen als LAA für TCR-basierte Therapie für die AML beschrieben, welche sich jedoch alle entsprechend der oben genannten Kriterien als eingeschränkt geeignet erwiesen haben. So ist ‚*Wilms' tumor protein 1'* (WT1) und HMMR zwar in LSC exprimiert, jedoch auch relevant in gesunden Geweben (WT1) oder HSC (HMMR) [<sup>43-46</sup>, eigene unpublizierte Daten]. PRTN3 ist aberrant in AML-Blasten, jedoch kaum in LSC exprimiert<sup>47</sup>. Survivin und hTERT sind beide in proliferierenden

T-Zellen exprimiert [<sup>48</sup>, Greenberg, persönliche Mitteilung], und PRAME ist nur in einem Bruchteil der Patienten in LSC signifikant höher als in gesunden Geweben nachweisbar [eigene unpublizierte Daten].

Es wurde in der Vergangenheit eine Reihe von klinischen Studien mit Vakzinierung oder adoptivem Transfer von spezifischen T-Zelllinien oder –klonen gegen die oben genannten LAA durchgeführt. Das einzige LAA bei der AML, für das eine Expression in LSC nachgewiesen ist, und für das klinische Daten von T-Zelltherapiestudien vorliegen, ist das Selbstantigen WT1. In ersten klinischen Peptidvakzinierungsstudien, die in unserer Arbeitsgruppe und in der Gruppe von Sugiyama in Osaka, Japan initiiert wurden, konnten Vakzine-induzierte T-Zellantworten in der Mehrzahl der Patienten detektiert werden. Klinisch kam es in unserer Kohorte zwar zur Krankheitsstabilisierung bei einer Reihe von Patienten und einer Vakzine-vermittelten kompletten Remission bei einer Patientin, eine dauerhafte Remission wurde jedoch in keinem der Patienten erreicht<sup>16,49,50</sup>.

Die AML stellt eine biologisch ausgesprochen heterogene Erkrankung dar, und die aberrante Überexpression eines LAA lässt sich niemals in allen Patienten nachweisen<sup>51,52</sup>. Klonale Heterogenität und Therapie-induzierte Alterationen im Genom und somit im Proteom sind häufig beobachtete Phänomene bei der AML. Darüberhinaus muss vor allem im Kontext mit der HSCT von *immunoediting*-Prozessen ausgegangen werden, welche sowohl die Antigenexpression als auch deren Präsentation betreffen<sup>53</sup>. Aus diesen Gründen ist es für die T-Zell-basierte Immuntherapie der AML essentiell, weitere in LSC hoch-selektiv exprimierte Antigene zu identifizieren um (a) möglichst in alle Patienten zumindest ein geeignetes Zielantigen zur Verfügung zu haben, und (b) wenn möglich simultan mehrere Antigene gleichzeitig zu treffen, um *immunoediting* zu verhindern.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel der hier zusammengefassten Arbeiten war die Analyse der Wirkungsweise unterschiedlicher autologer T-Zelltherapiekonzepte wie Peptid- und DC-Vakzinierung sowie die Applikation LAA-spezifischer T-Zellklone bei der AML. Auf Basis der daraus resultierenden Erkenntnissen sollten bei den genannten T-Zelltherapie-Strategien Modifikationen zur Erhöhung der klinischen Wirksamkeiten durchgeführt werden.

An einer Kohorte Patienten mit AML bzw. MDS wurde die immunologische Wirkung einer Vakzinierung mit einem WT1-Peptid im Hinblick auf Möglichkeiten der Optimierung der Wirksamkeit bzw. Umgehung potentieller Resistenzmechanismen analysiert. Untersuchte

Aspekte beinhalteten die Quantität, die Funktionalität, die Differenzierung, die Klonalität und das *homing* der Vakzine-induzierten CTL einerseits und AML-spezifische Resistenzmechanismen wie Antigenverlust und Verlust der Epitop-Präsentation andererseits. Für die Konzeption zukünftiger Vakzinestudien sollten Erkenntnisse bezüglich Antigen, Adjuvans und möglicher Kombinationspartner gewonnen werden.

Die optimale Präsentation des LAA ist ein kritischer Faktor für die klinische Wirksamkeit einer DC-Vakzinierung. Am Beispiel von WT1 sollte untersucht werden, welche Modifikationen des mRNA-Konstrukts zur Transfektion der DC zu einer verbesserten Präsentation der entsprechenden Epitope führen. Ziel war neben der Entwicklung eines optimierten Vektors für die DC-Vakzinierung mit WT1 auch die Untersuchung der Anwendbarkeit der Modifikationen bei anderen LAA.

Im Zusammenhang mit einer Studie, bei der WT1-spezifische T-Zellklone appliziert wurden, sollten neben den klinischen Endpunkten und prädiktiven Faktoren für ein Ansprechen der Einfluss des Herstellungsprozesses des Zellprodukts auf die klinische Wirksamkeit untersucht werden.

Das Antigen spielt bei der gerichteten T-Zelltherapie unabhängig von der Therapiemodalität (Peptid- oder DC-Vakzinierung, adoptiver Transfer von T-Zellen) eine entscheidende Rolle. Speziell vor dem Hintergrund der Heterogenität der AML als Entität und den bekannten Einschränkungen in der Eignung von WT1 als T-Zellantigen war ein letztes Ziel die Identifikation eines neuen Antigens für die gerichtete T-Zelltherapie bei der AML.

## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Peptidvakzinierung gegen WT1: Charakterisierung Vakzine-induzierter T-Zellantworten und potentielle Resistenzmechanismen

Die Vakzinierung mit HLA-restringierten Epitopen ist die in der klinischen Praxis am einfachsten durchführbare Methode einer gerichteten T-Zelltherapie bei malignen Erkrankungen. Das entsprechende Peptid wird zusammen mit Adjuvantien (z. B. TLR-Agonisten, GM-CSF) intra- und / oder subkutan appliziert.

An unserer Klinik werden seit 2002 im Rahmen einer Phase II-Studie Patienten mit AML und Hochrisiko-MDS, inzwischen auch Patienten mit WT1-positiven soliden Tumoren mit dem HLA A\*02:01-restringierten Epitop WT1<sub>126-134</sub> vakziniert. Hierbei erhalten die Patienten intra- und subkutan 0,2 mg Peptid sowie *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) (Tag 0) und zur Maturierung der DC zusätzlich GM-CSF subkutan Tag -2 bis Tag +1. In einer ersten Kohorte mit 17 AML-Patienten und zwei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS), welche 2009 publiziert wurde, wurde viermal zweiwöchentlich, danach monatlich vakziniert. In je acht Patienten kam es zu einem signifikanten Anstieg der WT1<sub>126-134</sub>-spezifischen CTL in peripherem Blut und Knochenmark. Zehn AML-Patienten waren unter Vakzinierung stabil, vier weitere zeigten klinisches Ansprechen bei initial progredienter AML. Eine Patientin (*Patientin 1*) erreichte eine komplette hämatologische Remission. In einem Drittel der Patienten kam es zu einem Abfall der WT1-Transkripte im Knochenmark um mindestens Faktor 3<sup>49</sup>.

Diese Studienpopulation ermöglichte detaillierte Untersuchungen der Vakzine-induzierten T-Zellantworten *in vivo*. Wichtige Aspekte waren hierbei die Qualität der T-Zellantwort im Hinblick auf Quantität, Differenzierung, Funktionalität, Klonalität und *homing* der CTL einerseits und mögliche Resistenzmechanismen durch Mutation, Verlust der Antigenexpression, insuffizienter Präsentation des Epitopes und immunsuppressive Mechanismen wie regulatorische Zellpopulationen und Zytokine im Tumorkompartiment andererseits.

**Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, Bauer S, Scheibenbogen C, Stather D, Thiel E, Keilholz U, Letsch A:** "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow. *J Immunother.* 2011 Jan;34(1):85-91.

Die erste Patientin (*Patientin 1'*) in oben genannter klinischer Peptidvaksinierungsstudie erreichte nach initialem Progress ihrer AML, die sich zu Beginn der Vakzinierung in partieller Remission befand, nach drei Monaten eine komplette Remission. Nach insgesamt zwölf Monaten wurde die Vakzinierung beendet. Als es nach weiteren drei Monaten zu einem Rezidiv kam, wurde die Vakzinierung wieder aufgenommen. Diese führte jedoch nur kurzfristig zu einer Stabilisierung der Erkrankung. Die dem klinischen Verlauf zu Grunde liegende T-Zellantwort wurde sowohl auf zellbiologischer als auch auf molekularer Ebene untersucht und im Kontext mit hämatologischen Parametern und WT1-Verlauf auf mRNA-Ebene analysiert.

Beim Immunmonitoring gelang es zwar, die WT1<sub>126-134</sub>-spezifischen CTL mittels Tetramer nachzuweisen, eine *ex vivo*-Expansion der spezifischen Zellen war jedoch nicht möglich. Dieses ist am ehesten dem terminal differenzierten Phänotyp der spezifischen Zellen geschuldet. Um den spezifischen T-Zellklon zu identifizieren und auf molekularer Ebene im Knochenmark und im peripheren Blut zu verfolgen, entwickelten wir eine Methode, bei der zunächst CD8<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* isoliert und mittels Tetramer-Färbung oder IFN $\gamma$ -Sekretionsassay gefolgt von magnetischer *bead*-Separation in eine spezifische und eine unspezifische Fraktion aufgeteilt werden. Danach werden in jeder dieser Fraktionen die relativen Konzentrationen der TCR-V $\beta$ -Ketten auf molekularer Ebene mittels *reverse transcribed* quantitativer realtime-PCR (qRT PCR) bestimmt<sup>54</sup>. Im Falle einer Vakzine-induzierten mono- oder oligoklonalen Expansion kommt es zu einer Verschiebung der relativen V $\beta$ -Konzentrationen zu Gunsten einer oder weniger V $\beta$ -Familien, welche von den spezifischen T-Zellen in ihrem TCR exprimiert werden. Diese Familien werden durch direkten Vergleich der relativen Konzentration in der spezifischen und der unspezifischen Fraktion identifiziert. TCR- $\beta$ -Ketten mit den entsprechenden V $\beta$ -Familien werden kloniert und sequenziert. In der spezifischen Fraktion von mehr als zwanzig Patientenproben fand sich pro analysierte V $\beta$ -Familie maximal eine prädominante  $\beta$ -Kette [<sup>12,16,54,55</sup> und eigene unpublizierte Daten]. Bei Vorliegen eines spezifischen prädominanten TCR- $\beta$ -Transkripts kann eine Klon-spezifische qRT PCR aufgebaut werden, mit welcher der entsprechende T-Zellklon *ex vivo* verfolgt werden kann.

Bei *Patientin 1* konnte zum Zeitpunkt maximalen Ansprechens eine prädominante monoklonale  $\beta$ -Ketten in der spezifischen T-Zellfraktion identifiziert werden, wohingegen sich zu einem späteren Zeitpunkt keine spezifisch IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen isolieren ließen. Eine Expansion des prädominanten Klons konnte auf mRNA-Ebene zunächst im Blut, dann im Knochenmark nachgewiesen werden. Parallel war ein prozentual geringerer Anstieg der Tetramer-positiven CTL zu verzeichnen. Diese Zellen waren funktionell aktiv, das heißt sie produzierten nach Stimulation mit dem Epitop IFN $\gamma$ . Während der kompletten Remission kam es zu einem Abfall des spezifischen Klons und der Tetramer-positiven Zellen im Knochenmark. Im Rezidiv kam es noch vor Reinitiierung der Vakzinierung zu einem deutlichen Anstieg von Tetramer-positiven, aber afunktionellen T-Zellen in Blut und Knochenmark. Der initial prädominante Klon expandierte nochmals deutlich im peripheren Blut, jedoch ohne *homing* ins Knochenmark.

Die Untersuchung des klinischen Materials von *Patient 1* eröffnete uns detaillierte Einblicke in die Dynamik, Funktionalität und Topologie der Vakzine-Induzierten T-Zellantwort, speziell im Hinblick auf die Unterschiede zwischen initialer, effektiver T-Zellantwort, die zur kompletten Remission führte und der zweiten, insuffizienten Antwort im Zusammenhang mit der erneuten Progression. Erstere war vergesellschaftet mit der Expansion eines funktionellen T-Zellklons mit *homing* ins Tumorkompartiment, letztere zeichnete sich durch Diversifizierung des Repertoires mit Expansion afunktioneller polyklonaler T-Zellen im peripheren Blut ohne *homing* ins Tumorkompartiment aus.

"Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow.

Ochsenreither S, Fusi A, Busse A, Bauer S, Scheibenbogen C, Stather D, Thiel E, Keilholz U, Letsch A.

J Immunother. 2011 Jan;34(1):85-91.

doi: <http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181f3cc5c>

**Ochsenreither S**, Fusi A, Geikowski A, Stather D, Busse A, Stroux A, Letsch A, Keilholz U: Wilms' tumor protein 1 (WT1) peptide vaccination in AML patients: predominant TCR CDR3 $\beta$  sequence associated with remission in one patient is detectable in other vaccinated patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Mar;61(3):313-22.

Oligoklonale Expansionen von CTL spezifisch für ein einzelnes Epitop führen immer zu einer Dediversifizierung des TCR-Repertoires. Im Kontext mit chronischen viralen Infektionen kann es spontan oder Vakzine-induziert in unterschiedlichen Individuen zum Auftreten identischer Strukturen innerhalb der TCR-Ketten kommen (*TCR bias*). Turner et al. haben folgende Klassifizierung des *TCR bias* vorgeschlagen:

Typ 1: prädominante Utilisierung einer  $V\alpha$ - und / oder  $V\beta$ -Kette bei erhaltener CDR3-Diversität,

Typ 2: identische CDR3-Segmente mit oder ohne erhaltene V-Diversität,

Typ 3: Identische AA-Sequenz in allen CDR-loops in einer oder beider TCR-Ketten<sup>56</sup>.

Im Kontext mit antitumoralen T-Zellantworten ist dieses Phänomen äußerst selten und wurde bisher ausschließlich bei Melanomen beobachtet<sup>57,58</sup>.

Der in *Patient 1* identifizierte T-Zellklon wies neben dem eindrucklichen klinischen Ansprechen der Patientin die Besonderheit eines extrem kurzen CDR3-loops der  $\beta$ -Kette auf. Dieses ist am ehesten auf die komplette Deletion des *D*-Segmentes bei der Rekombination dieses speziellen TCR zurückzuführen. Da unter den vakzinierten Patienten mehrere deutliche T-Zellantworten gegen das Vakzine-Epitop entwickelt hatten, wurde die Patientenpopulation auf interindividuell identische Motive der  $V\alpha$ - und / oder  $V\beta$ -Ketten im Sinne eines *TCR bias* untersucht.

In der vorliegenden Studie konnten wir in vier weiteren Patienten mit klinischem und / oder immunologischem Ansprechen eine Deviation des spezifischen TCR-Repertoires zu Gunsten der  $V\beta$ -Familie TRBV11 im Sinne eines Typ 1-*TCR bias* nachweisen. In zwei weiteren Patienten ließen sich  $V\beta$ -Ketten mit der exakten AA der prädominanten  $\beta$ -Kette von *Patient 1* detektieren. In allen drei Fällen wurde der CDR3-loop durch dieselbe Keimbahn-nahe Nukleotidsequenz mit unmutiertem *V*, unmutiertem *J* und mit der einzigen Nukleotid-Insertion, die in eine saure Seitenkette in zentraler Position des CDR3-loops resultiert, kodiert. Im Gegensatz zu *Patientin 1* waren diese Klone in den anderen Patienten nicht expandiert; eine CDR3-spezifische qRT PCR zeigte Transkript-Frequenzen zwei bis vier Zehnerpotenzen unter der von *Patient 1*. Andere  $\beta$ -CDR3-Ketten mit gleicher Länge und identischen biochemischen Eigenschaften wie beim prädominanten Klon von *Patientin 1* ließen sich weder in Patientenmaterial noch in gesunden Kontrollen nachweisen. In einem

Patienten fand sich neben TRBV11 eine Expansion von TRBV29-1 in der spezifischen Fraktion. Auch hier fand sich ein prädominanter Klonotyp, welcher trotz unterschiedlichem V-Segment für einen identischen CDR3-*loop* kodierte (Typ 2 *bias*) [eigene unpublizierte Daten].

Insgesamt konnten wir erstmalig zeigen, dass eine Vakzinierung mit einem einzelnen Epitop im Kontext mit einer hämatologischen Neoplasie mit einem deutliche Typ-1 *bias* assoziiert ist, was die Vermutung nahelegt, dass hier eine direkte Interaktion von CDR1 oder 2 mit dem präsentierten Peptid eine Rolle spielt. In einem Patienten ließ sich eine Expansion des prädominanten CDR3-Motivs im Kontext mit einem anderen V-Segment nachweisen; Typ 1 und Typ 2 *bias* scheinen hier unabhängig voneinander aufzutreten. Der Grund für die fehlende Expansion der T-Zellen mit TCR- $\beta$ -Ketten, die komplett identisch zu der von *Patient 1* sind, lässt sich nicht sicher benennen. Die Sequenz der korrespondierenden TCR- $\alpha$ -Kette sowie periphere Selektionsmechanismen können hierbei eine Rolle spielen.

Wilms' tumor protein 1 (WT1) peptide vaccination in AML patients: predominant TCR CDR3 $\beta$  sequence associated with remission in one patient is detectable in other vaccinated patients.

Ochsenreither S, Fusi A, Geikowski A, Stather D, Busse A, Stroux A, Letsch A, Keilholz U.  
Cancer Immunol Immunother. 2012 Mar;61(3):313-22.

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1099-y>

Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, **Ochsenreither S**, Thiel E, Keilholz U: Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. J Transl Med. 2010 Jan 21;8:5.

Neben der eingeschränkten funktionellen Avidität des T-Zellrepertoires gegen Epitope von Selbstantigenen werden diverse Mechanismen sekundärer Resistenz gegen Peptidvakzinierungen diskutiert. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit an Hand von Material von zehn AML-Patienten aus der bereits beschriebenen WT1-Peptidvakzinierungsstudie untersucht<sup>49</sup>.

Mögliche sekundäre Resistenzmechanismen können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: T-Zell-assoziierte Faktoren, die Funktionalität, Migration und Expansion beinhalten, und Faktoren assoziiert mit der Zielzellpopulation. Letztere beinhalten den Verlust oder die Mutation des Antigens und die Herunterregulierung der Prozessierung / Präsentation des Epitops, speziell der Verlust der HLA A\*02:01-Expression. In acht Patienten ließen sich Tetramer-positive T-Zellen nachweisen, und in CTL von acht der Patienten ließ sich eine spezifische Zytokin-Sekretion (IFN $\gamma$  und / oder TNF $\alpha$ ) induzieren. In einem der zehn Patienten konnte auf mRNA- und Proteinebene der Verluste der WT1-Expression nachgewiesen werden. Nicht-synonyme Mutationen des Epitops oder der flankierenden Regionen wurden in keinem Patienten detektiert. Ein Verlust von HLA A\*02:01 auf den leukämischen Blasten ließ sich ebenfalls nicht nachweisen.

Daraus schließen wir, dass bei der AML eine Mutation des Epitops WT1<sub>126-134</sub> keinen häufigen Resistenzmechanismus darstellt. Der Verlust von WT1 unter T-Zell-vermitteltem immunologischem Druck kann trotz funktioneller Relevanz von WT1 für den malignen Phänotypen der AML selten auftreten. Eine Herunterregulierung von HLA-Klasse-I-Molekülen, wie sie z. B. beim Melanom oft beobachtet wird, spielt bei der AML zumindest bei der Peptidvakzinierung mit WT1<sub>126-134</sub> keine Rolle.

Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination.

Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, Keilholz U.

J Transl Med. 2010 Jan 21;8:5.

doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-8-5>

## 2.2 Vakzinierung mit dendritischen Zellen: Optimierung der Prozessierung und Präsentation

Benteyn D, Anguille S, Van Lint S, Heirman C, Van Nuffel AM, Corthals J, **Ochsenreither S**, Waelput W, Van Beneden K, Breckpot K, Van Tendeloo V, Thielemans K, Bonehill A: Design of an Optimized Wilms' Tumor 1 (WT1) mRNA Construct for Enhanced WT1 Expression and Improved Immunogenicity In Vitro and In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Nov 19;2:e134.

Der Schritt von der Peptidvakzinierung hin zur Vakzinierung mit DC hat mehrere Vorteile. Einerseits kann durch Selektion und *in vitro*-Maturierung der DC direkter Einfluss auf deren Phänotyp und Funktionalität genommen werden. Andererseits wird, wenn autologe DC mit DNA oder RNA des T-Zellantigens transfiziert werden, die HLA-Restriktion einzelner Epitope umgangen, und eine Immunisierung gegen mehrere Epitope des selben Antigens entsprechend des autologen HLA-Typs ist möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektorsystem optimiert, welches zur *in vitro*-Transkription zur Gewinnung von mRNA zur konsekutiven Transfektion von DC benutzt werden sollte. Ziel war eine optimale Präsentation von WT1-Epitopen in *in vitro*-generierten DC für eine klinische DC-Vakzinierung. Ausgangskonstrukt war ein pGEM-Vektor, der ein komplettes WT1-Transkript inklusive der 5'- und 3' untranslatierten Regionen (UTR) und einen poly(a)-Schwanz enthielt, und der bereits klinisch im Rahmen einer Phase I-Studie angewendet worden war<sup>59</sup>. In der aktuellen Arbeit wurden schrittweise folgende Modifikationen vorgenommen: (1) anstelle der 3'-UTR wurde die lysosomale Zielsignatur von ‚*dendritic cell lysosomal-associated membrane protein*‘ (DC-LAMP) eingebracht, anstelle der 5'-UTR ein Signalpeptid (*sig*) zur besseren Translokation ins ER, (2) die nukleäre Zielsignatur (‚*nuclear localization sequence*‘, NLS) wurde aus der WT1-Sequenz deletiert, (3) die gesamte kodierende Region wurde Kodon-optimiert, und (4) der pGEM-Vektor wurde durch den pST1-Vektor ersetzt, was dazu führte, dass am 3'-Ende der DC-LAMP-Sequenz zusätzlich zwei  $\beta$ -globin-UTR von *X. laevis* und ein definierter, 120 Nukleotide langer poly(a)-Schwanz angefügt wurden. Für diese letzte Modifikation ist eine höhere und länger anhaltende Expression des Antigens vorbeschrieben<sup>60</sup>.

Durch Testung der unterschiedlichen Konstrukte konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme der Kodon-Optimierung jede konsekutive Modifikation des Vektors zu einer länger anhaltenden Expression des Antigens und einer höheren Dichte der entsprechenden pMHC-Komplexe auf der Zelloberfläche führte. Während sich die Kodon-Optimierung nicht auf die Proteinexpression auswirkte, waren die Modifikationen, die sich auf Translationsaktivität,

Transkript-Stabilität und subzelluläre Lokalisation auswirken, im Bezug auf Proteinexpression in ihrer Wirkung additiv. Auch im Mausmodell sahen wir eine verbesserte antileukämische Aktivität der modifizierten Konstrukte ohne detektierbare immunvermittelte Toxizität. Durch diese Arbeit steht ein optimierter Vektor für die klinische Anwendung im Sinne einer WT1-spezifischen DC-Vakzinetherapie zur Verfügung. Das Vektorsystem mit den beschriebenen Modifikationen lässt sich leicht auf andere T-Zellantigene übertragen und hat so praktische Relevanz auch für DC-Therapien gegen andere LAA.

Design of an Optimized Wilms' Tumor 1 (WT1) mRNA Construct for Enhanced WT1 Expression and Improved Immunogenicity In Vitro and In Vivo.

Bentejn D, Anguille S, Van Lint S, Heirman C, Van Nuffel AM, Corthals J, Ochsenreither S, Waelput W, Van Beneden K, Breckpot K, Van Tendeloo V, Thielemans K, Bonehill A.

Mol Ther Nucleic Acids. 2013 Nov 19;2:e134.

doi: <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2013.54>

### 2.3 Adoptiver Transfer von WT1-spezifischen T-Zellklonen: Machbarkeit, klinische Wirksamkeit und möglicher Einfluss des Herstellungsprozesses auf Phänotyp und Persistenz des Zellprodukts

Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, Duerkopp N, Roberts IM, Pogosov GL, Ho WY, **Ochsenreither S**, Wöfl M, Bar M, Radich JP, Yee C, Greenberg PD: Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med.* 2013 Feb 27;5(174):174ra27.

Eine Weiterentwicklung der gerichteten T-Zellantwort nach Peptid- und DC-Vakzinierung im klinischen Setting ist die Applikation eines LAA-spezifischen Zellprodukts nach Expansion *in vitro* im Sinne einer adoptiven T-Zelltherapie. Am Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA) wurde eine entsprechende klinische Studie durchgeführt, im Rahmen derer elf Patienten mit AML, ALL und MDS nach allogener Stammzelltransplantation im Rezidiv oder in Hochrisiko-Konstellation mit WT1<sub>126-134</sub>-spezifische T-Zellklonen behandelt wurden, welche zuvor aus den CTL der Stammzellspender isoliert worden waren. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien, bei denen polyklonale T-Zellprodukte appliziert und entsprechende immunologische Toxizitäten beobachtet wurden<sup>61</sup>, wurden in der aktuellen Studie klonale, also unispezifische T-Zellen appliziert. Entsprechend trat hier keinerlei GvH-Symptomatik bei den Patienten auf.

Das Protokoll sah initial die Stimulation und Expansion der T-Zellen lediglich mit den Zytokinen IL-2, IL-7 und IL-15 vor. Im Verlauf zeigte sich, dass die Hinzunahme von IL-21 zu den Stimulationen zu einem höheren Anteil spezifischer T-Zellen bei weniger terminalen Differenzierung der CTL führte, sodass die T-Zellklone der letzten vier Patienten in Anwesenheit von IL-21 stimuliert wurden. Die T-Zellen vor Infusion entsprachen bei allen Patienten einem Antigen-erfahrenen aber nicht terminal differenzierten Immunphänotyp. Dennoch zeigten sich signifikant höhere Expressionen von CD27, CD28 und CD127 in den Produkten, welche mit IL-21 hergestellt worden waren. Dies entspricht immunphänotypisch einer weniger terminal differenzierten CTL-Population, am ehesten einer Population mit Anreicherung von T<sub>cm</sub> entsprechend. Bei diesen Zellprodukten beobachteten wir eine höhere replikative Kapazität und eine längere Persistenz im Patienten. Die Stimulation in Anwesenheit von IL-21 stellt wahrscheinlich eine einfach durchzuführende Methode dar, aus T<sub>N</sub> *in vitro* T<sub>cm</sub>-ähnliche T-Zellpopulationen für den adoptiven Transfer zu generieren.

Direkte antileukämische Aktivität wurde in einem Patienten beobachtet, wobei die erreichte Remission nur kurz anhielt. Ein weiterer Patient in der IL-21-Kohorte mit positiver *minimal*

*residual disease* (MRD) wurde nach Applikation des T-Zellklons MRD-negativ. Die drei weiteren Patienten in der IL-21-Kohorte wurden in Hochrisiko-Konstellation in adjuvanter Intention behandelt; hier kam es bei keinem der Patienten zum Rezidiv der Grunderkrankung. Immunologische Endpunkte wie Persistenz der spezifischen CTL und deren prozentualer Anteil an allen CD3<sup>+</sup> Zellen waren für die IL-21-Kohorte den Ergebnissen der Vakzinestudien deutlich überlegen<sup>49</sup>. Die Anzahl der Patienten ist definitiv zu gering um eine belastbare Aussage bezüglich klinischer Endpunkte zu machen.

Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients.

Chapuis AG, Ragnarsson GB, Nguyen HN, Chaney CN, Pufnock JS, Schmitt TM, Duerkopp N, Roberts IM, Pogosov GL, Ho WY, Ochsenreither S, Wöfl M, Bar M, Radich JP, Yee C, Greenberg PD.

Sci Transl Med. 2013 Feb 27;5(174):174ra27.

doi: <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3004916>.

## 2.4 Neue T-Zell-Antigene bei der AML: Identifikation von Zielproteinen im leukämischen Stammzellkompartiment

**Ochsenreither S**, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, Akatsuka Y, Weissman IL, Greenberg PD: Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5492-501.

Bisher ist kein Leukämie-assoziiertes Selbstantigen bekannt, das tatsächlich selektiv nur in der Zielzelle, also der LSC (und eventuell den AML-Blasten) exprimiert wird. Speziell WT1, für das die meisten klinischen Daten zu einer gerichteten T-Zelltherapie in der Klinik vorliegen, und das nachweislich in LSC exprimiert wird<sup>46</sup>, ist hoch auch in den Glomeruli der Niere sowie Ovar, Hoden und Milz exprimiert<sup>62</sup>. Entsprechend muss einerseits davon ausgegangen werden, dass sowohl zentrale als auch periphere Toleranzmechanismen die Wirksamkeit einer Vakzine-Strategie deutlich limitieren. Andererseits droht bei Induktion einer effektiven T-Zellantwort gegen das Antigen z. B. durch den adoptiven Transfer von mit einem hochaffinen LAA-spezifischen TCR-tranzfuzierten CTL klinisch relevante *on target/off tumor*-Toxizität.

Wir haben deshalb eine systematische Analyse von Expressionsdaten gesunder Gewebe, LSC, HSC und weiteren Zellpopulationen der Hämatopoese durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die möglichst selektiv in LSC exprimiert werden. Auf diese Weise konnten wir Cyclin A1 als Testis-selektives Cancer-Testis-Gen identifizieren, welches aberrant in AML-Zellen inclusive des LSC-Kompartiments exprimiert wird. Nach Bestätigung dieses Expressionsmuster auf mRNA- und Protein-Ebene wurden durch Stimulation von T-Zellen gesunder Spender mit einer Cyclin A1-Peptidbibliothek T-Zellklone generiert, die diverse Epitope von Cyclin A1 erkannten (*reverse immunology approach*). Zwei dieser Epitope (CCNA1<sub>227-235</sub> und CCNA1<sub>341-351</sub>) sind HLA A\*02:01-restringiert und werden endogen prozessiert und präsentiert. T-Zellklone gegen beide Epitope lysierten die Cyclin A1-exprimierende, HLA A\*02:01-positive AML-Zelllinie THP-1. Für einen Klon konnte zusätzlich eine deutliche MHC-restringierte Zytotoxizität gegen primäre AML-Zellen *in vitro* gezeigt werden.

Das so identifizierte Antigen bietet gegenüber WT1 eine Reihe von Vorteilen. Verglichen mit WT1 findet sich eine deutlich niedrigere Expressionen in gesunden Geweben. Die Expression in AML-Blasten ist dagegen ca. 10-fach höher, wenn absolute mRNA-

Kopienzahlen betrachtet werden<sup>62</sup>. Auch die zytotoxische Aktivität Cyclin A1-spezifischer Klone gegenüber primären Blasten *in vitro* übersteigt die von WT1-spezifischen T-Zellklonen deutlich [eigene unpublizierte Daten]. Diese Ergebnisse machen Cyclin A1 zu einem vielversprechenden neuen Zielantigen für eine gerichtete, LSC-wirksame T-Zelltherapie bei der AML.

Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen.

Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, Akatsuka Y, Weissman IL, Greenberg PD.

Blood. 2012 Jun 7;119(23):5492-501.

doi: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-365890>

### 3 Diskussion

#### 3.1 Aktueller Stand der Immuntherapie maligner Erkrankungen

Nach vielen Jahren, in denen die Immuntherapie maligner Erkrankungen in der täglichen Praxis nur eine marginale Rolle gespielt hat, hat sich die T-Zelltherapie in Form der unspezifischen Immuntherapie durch Checkpoint-Blockade neben Chirurgie, Strahlentherapie, zytostatischer Therapie und *targeted therapy* definitiv als fünfte Säule der Tumorthherapie etabliert. Immuncheckpoint-Moleküle sind regulatorische Moleküle, die nach adäquater Aktivierung von T-Zellen auf deren Oberfläche exprimiert werden und ein hemmendes Signal an die T-Zelle übermitteln. Die Blockade von Checkpoint-Molekülen stellte eine vielversprechende Methode dar, zelluläre Toleranzmechanismen im Tumorkompartiment zu umgehen. Diese beinhalten neben der Suppression der Funktionalität zytotoxischer Zellpopulationen durch Tumor- und Stromazellen auch die durch regulatorische Zellelemente<sup>63</sup>. Für jegliche Form der gerichteten T-Zelltherapie eröffnet dieses Wirkprinzip vielfältige Kombinationsmöglichkeiten, wobei es derzeit noch nicht klar ist, in wie weit die Blockade von inhibitorischen Checkpoint-Molekülen klassischen Strategien der gerichteten T-Zelltherapie wie Vakzinierung und adoptiven Therapieansätzen zu mehr klinischen Wirksamkeit verhelfen kann. Auch die spezifischen Therapieansätze mit CAR und T-Zellaktivatoren, die Epitope auf der Zelloberfläche binden und derzeit vor allem bei B-Zell-Neoplasien eingesetzt werden, und mit adoptivem Transfer von TCR-transgenen T-Zellen drängen mehr und mehr in die klinische Praxis und könnten zu einem Wendepunkt vor allem bei der Therapie hämatologischer Neoplasien führen<sup>64,65</sup>. Im Gegensatz zur klassischen Tumorstabilisierung wird beim Transfer von genetisch modifizierten T-Zellen und bei Therapien mit bispezifischen T-Zellaktivatoren deutlich mehr Wirkung aber auch mehr Toxizität beobachtet<sup>31,32,66</sup>. Im Gegensatz zur Checkpoint-Blockade, die gegen periphere Toleranzmechanismen gerichtet ist, zielen die gerichteten T-Zelltherapien mit transgenen Rezeptoren oder T-Zellaktivatoren primär auf die Umgehung der zentralen Toleranz ab.

Noch vor wenigen Jahren wurde postuliert, dass es einige wenige potentiell immunogene Tumorentitäten gäbe, welche von immuntherapeutischen Interventionen profitierten. Eine klare Definition der klinischen Immunogenität gab es nicht; es wurden vielmehr Entitäten wie Melanom und Nierenzellkarzinom als immunogen eingestuft, weil bei diesen Entitäten Remissionen entweder spontan oder induziert durch Applikation von Zytokinen oder Vakzinierungen beschrieben worden waren, und Zytokine einen therapeutischen Stellenwert besaßen. Das Melanom ist die einzige Entität, die auf die erste Generation Checkpoint-

Blockade, der Blockade von CTLA4 anspricht; beim Nierenzellkarzinom hat die allogene HSCT eine klinische Wirksamkeit<sup>67,68</sup>. Die Einführung der zweiten Generation der Checkpoint-Blockade mit Antikörpern gegen PD1 und PD-L1 erweiterte das Wirksamkeitsspektrum dieser Therapien auf eine Vielzahl von Entitäten, die vorher als definitiv nicht zugänglich für Immuntherapien eingestuft worden waren. Während die Interaktion von CTLA4 mit seinen Liganden nach adäquater Aktivierung der T-Zellen vor allem im Kontext mit professionellen APC stattfindet, ist die Inhibierung potentiell Tumorantigen-spezifischer T-Zellen über die PD1/PD-L1-Interaktion vor allem im Tumorkompartiment relevant<sup>63</sup>.

Eine Sonderstellung in der ungerichteten T-Zelltherapie spielen die Hämatoblastosen. Hier hat die allogene HSCT mit ihrem T- und NK-Zell-vermittelten zytotoxischen Effekt unter anderem gegen potentielle neoplastische Stammzellen seit vielen Jahren einen festen Stellenwert speziell bei kurative intendierten Therapiestrategien<sup>40</sup>. Neben Selbstantigenen und durch somatische Mutationen generierten Neoantigenen subsummiert das alloreaktive TCR-Repertoire auch TCR gegen *minor antigens* (MiHA), also präsentierte nicht-synonyme *single nucleotide polymorphisms*<sup>69</sup>. Eine erste Therapiestudie mit adoptiven Transfer AML LAA-spezifischer Spender-T-Zellen nach allogener HSCT in der rezidiv- oder Hochrisikosituation wurde bereits unternommen<sup>26</sup>. Das kurative Potential der allogenen HSCT macht Hoffnung, dass die adoptive T-Zelltherapie in Zukunft in ausgewählten Fällen erstere ersetzen und so Therapie-assoziierte Morbidität und Mortalität verringern kann.

Eine wichtige Erkenntnis aus den Erfahrungen mit dem adoptiven Transfer von TCR- oder CAR-transgenen T-Zellen ist, dass ihre klinische Wirksamkeit vor allem von der stabilen, selektiven Expression des Antigens im Zielkompartiment, nicht jedoch von negativer Selektion oder Tolerogenität abhängt. Die Therapie mit einem transgenen TCR gegen NY-ESO-1 hat in einer Studie des *National Institute of Health* vergleichbare Ansprechraten beim malignen Melanom und beim Synovialsarkom gezeigt, obwohl sich beide Entitäten deutlich in Tumorbiologie und Immunogenität unterscheiden; gemeinsam ist beiden Entitäten lediglich die hohe, stabile Expression des Antigens<sup>65</sup>. In der klinischen Praxis noch relevanter ist die Kompartiment-spezifische gerichtete T-Zelltherapie für die Behandlung der B-Zell-Neoplasien. Durch den Einsatz von anti-CD19-CAR-transfizierten autologen T-Zellen und durch den Einsatz von T-Zellaktivatoren wurde erstmals eine Therapiestrategie eingesetzt, die eine Zellpopulation oder ein Organsystem inclusive der daraus hervorgegangenen Neoplasie eradiziert<sup>29,64</sup>. Solche Kompartiment-spezifischen T-Zelltherapien sind auch für andere nicht-essentielle oder ersetzbare Organsysteme z. B. Prostata, Ovar, Hoden oder

hämatopoetische Stammzelle vor allogener HSCT denkbar sofern sich hochselektiv exprimierte Antigene identifizieren lassen<sup>70</sup>.

### 3.2 Autologe Konzepte der gerichteten T-Zelltherapie bei der AML

Die Vakzinierung bei etablierten Tumoren und speziell bei der AML hat in der Vergangenheit begrenzte klinische Wirksamkeit gezeigt unabhängig davon, ob Peptid- oder DC-basiert immunisiert wurde<sup>11,49</sup>. Klinische Vakzinierungsstudien haben mehrfach bewiesen, dass sich funktionelle, LAA-spezifische T-Zellen *in vivo* expandieren lassen. Leider resultiert aus diesem immunologischen Ansprechen nur bei wenigen Patienten klinische Wirksamkeit<sup>49,71,72</sup>. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Substanzen für die Klinik verfügbar, welche die Wirkung einer klassischen Vakzinierung substanziell erhöhen könnten, sodass vor diesem Hintergrund der Stellenwert der Vakzinierung bei der AML-Therapie neu bewertet werden muss. Die Analyse möglicher Ursachen der eingeschränkten Wirksamkeit der passiven Immunisierung sollte als Rationale für die Auswahl der immuntherapeutischen Kombinationspartner dienen. Demethylierende Substanzen wie 5-Azacytidine führen zu einer Überexpression von LAA sowie dem Prozessierungs- und Präsentationsapparat, was zu einer verbesserten T-Zellaktivierung führt<sup>73</sup>; Imide wie Lenalidomid und Pomalidomid führen zu einer verstärkten T- und NK-Zellaktivierung unter anderem durch Hochregulation der Kreuzpräsentation und Kostimulation durch DC<sup>74</sup>. PD-1/PD-L1-Blocker inhibieren nicht nur die Interaktion von Vakzine-induzierten T-Zellen mit Zellen des Tumorkompartiments, sie unterhalten auch ein T<sub>H1</sub>-Zytokinmilieu und senken Anzahl und Aktivität regulatorischer Zellen im Tumorkompartiment<sup>75</sup>.

Mögliche Ursachen für die eingeschränkte Wirksamkeit einer Vakzinierungstherapie lassen sich einteilen in Effektor-assoziierte Effekte (von den DC oder der T-Zelle ausgehend) und Target-assoziierte Effekte (von der Zielzelle oder dem Stroma ausgehend) sowie spezifische (das LAA betreffend) und unspezifische (LAA-unabhängig) Effekte:

1. Unspezifische Mechanismen auf Seiten der Effektoren betreffen in erster Linie die Funktionalität der T-Zellen im Patienten, welche durch die Grunderkrankung und mögliche Vortherapien beeinträchtigt sein kann. Wie auch in vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen führte die WT1-Peptidvakzine unserer Klinik (Epitop WT1<sub>126-134</sub>) zu einer Expansion funktioneller spezifischer CTL in mehr als 40% der Patienten<sup>49,50,76</sup>. Der Verlust von *homing* und Funktionalität war direkt mit einem sekundären Therapieversagen assoziiert<sup>16</sup>. Bei der Peptidvakzinierung spielt für die Funktionalität der T-Zelle das Adjuvans eine zentrale Rolle, da eine adäquat

maturierte DC nicht nur die Präsentation von Antigenen aktiviert, sondern auch die kostimulatorischen Rezeptoren exprimiert, die eine suffiziente Aktivierung und die Proliferation der CTL gewährleistet<sup>24</sup>. Eine suboptimale Aktivierung der lokalen DC *in vivo* dagegen führt im ungünstigsten Falle zu einer kompletten Depletion einer vorbestehenden spezifischen T-Zellpopulation<sup>77</sup>. Auch der adoptive Transfer von WT1<sub>126-134</sub>-spezifischen T-Zellklonen nach HSCT zeigte eingeschränkte klinische Wirksamkeit<sup>26</sup>. Hier kann nicht von einer funktionellen Einschränkung durch die Grunderkrankung ausgegangen werden, da die expandierte T-Zelle vom gesunden Spender stammt. Anergie durch chronische Antigenexposition bei inadäquater Kostimulation spielt ebenfalls keine Rolle, da der T-Zellklon *in vitro* expandiert wurde, und sowohl Zytokin-Sekretion als auch zytolytische Funktionalität getestet wurden. T-Zell-assoziierte, unspezifische Resistenzmechanismen bei der Vakzinierung und beim adoptiven Transfer von autologen T-Zellklonen zumindest im Kontext mit dem besagten WT1-Epitop spielen somit bei der AML eine untergeordnete Rolle.

2. Unspezifische, nicht Effektor-assoziierte Resistenzmechanismen beinhalten neben der Expansion und Aktivierung von regulatorischen Zellelementen, einem T<sub>H2</sub>-polarisierten Zytokinmilieu und der Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf Tumor- und Stromazellen vor allem die Herunterregulation der Prozessierungs- und Präsentationsmaschinerie<sup>4</sup>. Während erstere Mechanismen möglicherweise durch die zusätzliche Applikation von Checkpoint-Inhibitoren antagonisiert werden können, ist z. B. die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf leukämischen Blasten nicht immer durch proinflammatorische Enzyme induzierbar. Aus diesem Grunde wurden Blasten von Patienten mit Progress nach initialem immunologischem und / oder klinischem Ansprechen auf WT1-Peptidvakzinierung untersucht. Obwohl der komplette Verlust eines Klasse-I-Haplotyps leukämischer Blasten nach haploidenter HSCT im Sinne eines *escape*-Mechanismus häufig beobachtet wird<sup>53</sup>, ließ sich ein Verlust der HLA\*A02:01-Expression nach Vakzinierung mit einem HLA A\*02:01-restringierten Epitop nicht nachweisen. Daraus lässt sich folgern, dass der immunologische Selektionsdruck nach haploidenter HSCT deutlich höher ist als der nach Peptidvakzinierung.
3. LAA-spezifische Resistenzmechanismen auf Seiten der Zielzelle beinhalten die Herunterregulierung oder den kompletten Verlust des LAA oder Mutation bzw. Deletion des entsprechenden Epitops. Die Herunterregulierung von WT1 konnten wir in einem von zehn untersuchten Vakzine-Patienten beobachten, was ein Indiz dafür sein kann, dass ein gewisser immunologischer Druck durch die Expansion spezifische T-Zellen gegen WT1 bestand, welcher zumindest in einem Patienten zu Auswachsen eines WT1-negativen Subklons geführt hat. Aber auch andere Faktoren

können eine Rolle spielen. So hat sich gezeigt, dass das am häufigsten verwendete WT1-Epitop 126-134 wahrscheinlich weniger effizient prozessiert und präsentiert wird, als andere HLA A\*02:01-restringierte Epitope auf WT1 [<sup>78</sup> und eigene unpublizierte Daten].

4. LAA-spezifische Resistenzmechanismen auf Seite der Effektoren spielen für die Wirksamkeit der Vakzinebehandlung die wahrscheinlich größte Rolle. Diese beinhalten vor allem das vorbestehende T-Zellrepertoire, das durch die Vakzine *in vivo* expandiert wird. Häufig diskutiert wird die Tatsache, dass eine Vakzinierung mit Selbstantigenen auf ein zentral negativ selektioniertes T-Zellrepertoire zurückgreift, welches keine TCR mit hoher Affinität enthalten sollte<sup>79</sup>. Speziell im Kontext mit soliden Tumoren wird davon ausgegangen, dass die gute Wirksamkeit der PD-1/PD-L1-Blockade durch Neoantigen-spezifische T-Zellen, also T-Zellen gegen somatisch mutierte Epitope erreicht wird, deren TCR keine thymische Selektion durchlaufen haben. Belastbare Daten zur Spezifität von unter PD-1/PD-L1-Blockade aktivierter, Tumor-spezifischer CTL fehlen. Untersuchungen der TCR-Spezifitäten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei Melanomen zeigten jedoch sowohl spezifische CTL gegen Neoantigene als auch gegen klassische Selbstantigene<sup>80,81</sup>, wobei beide Gruppen mehr PD-1 exprimierten als nicht-spezifische TIL<sup>82</sup>. Spontane Expansionen LAA-spezifischer T-Zellen in Patienten mit AML wurden beobachtet<sup>24,78</sup>; Daten zu T-Zellen gegen Patientenspezifische Neoantigene jenseits bekannter Translokationen bei der AML gibt es derzeit nicht. Im Kontext mit der HSCT spielen zusätzlich MiHA-spezifische T-Zellen eine Rolle für den GvL und den GvH-Effekt<sup>83</sup>, aber auch hier finden sich spontane Expansionen LAA-spezifischer T-Zellen nach Transplantation<sup>84,85</sup>. Es ist derzeit unklar, welchen Anteil am GvL-Effekt die T-Zellen gegen die unterschiedlichen Antigengruppen (Selbstantigene, Neoantigene und MiHA) bei der AML spielen. Auch die Präkursor-Frequenz spezifischer T-Zellen kann eine Rolle spielen. Der effektive T-Zellklonotyp in *Patient 1* z. B. hatte in seinem TCR eine  $\beta$ -Kette mit deletiertem *D*-Segment, einer Anomalie, deren Entstehung als seltenes Ereignis während der Rekombination angesehen wird<sup>16</sup>.

Unsere eigenen Daten implizieren ebenso wie die Ergebnisse anderer Gruppen, dass die alleinige Aktivierung autologer T-Zellen durch Vakzine oder der adoptive Transfer von LAA-spezifischen T-Zellen im Kontext mit der AML zwar wenig toxisch, aber auch sehr eingeschränkt wirksam ist. Daraus ergibt sich die Indikation einer solchen Behandlung vor allem in palliativer Intention bei polymorbiden oder schwer vorbehandelten Patienten. Die eigentliche Stärke eines T-Zell-therapeutischen Ansatzes, das kurative Potential durch die LSC-Wirksamkeit der Zellen, kann dadurch nicht genutzt werden. Die Untersuchung von

möglichen Resistenzmechanismen ermöglicht die rationale Kombination mit modernen immunmodulatorischen Therapieprinzipien wie Checkpoint-Inhibition, Bestrahlung oder Imiden. Entsprechend unserer Erfahrung mit WT1-Peptidvakzinierung und dem adoptiven Transfer von WT1-spezifischen T-Zellklonen reduzieren vor allem lokale immunsuppressive Mechanismen (z. B. Zytokinmilieu, Checkpoint-Expression von Stroma und Blasten und suppressive Zellelemente), die eingeschränkte Avidität LAA-spezifischer CTL und möglicherweise eine eingeschränkte Präsentation des Epitops die Wirksamkeit dieser Therapien. Sollte erster Mechanismus eine relevante Rolle spielen, kann eine Kombinationstherapie mit unspezifischen immunmodulatorischen Substanzen sinnvoll sein. Das Problem der Avidität lässt sich, unabhängig davon, ob Präkursor-Frequenz oder zentrale Selektion die entscheidende Rolle spielt, nur durch den Transfer transgener T-Zellen sinnvoll umgangen werden.

### **3.3 Aspekte der adoptiven Therapie jenseits von Spezifität und Affinität**

Der adoptive Transfer von autologen oder allogenen T-Zellen nach allogener HSCT in Form von LAA-spezifischen T-Zellklonen oder -linien ist dann sinnvoll, wenn davon ausgegangen werden muss, dass zwar T-Zellen mit ausreichender Avidität gegen ein LAA vorhanden sind, diese aber auf Grund von peripheren Resistenzmechanismen, Vortherapien oder durch die Grunderkrankung in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Unsere Erfahrungen mit WT1 zeigen, dass sich zwar spezifische und funktionell aktive T-Zellen in AML-Patienten expandieren lassen, sich dieses immunologische Ansprechen aber selten in einem klinischen Ansprechen widerspiegelt<sup>49,50,76</sup>. Klinische erfolge in diesem Zusammenhang beschränken sich mit Ausnahme von *Patient 1* auch bei adoptivem Transfer spezifischer Klone lediglich in Krankheitsstabilisierungen, Reduktion der Transfusionsfrequenzen im MDS und in das Ausbleiben von Rezidiven in Hochrisikosituationen<sup>16,26</sup>. Die wahrscheinlichste Ursache für die eingeschränkte Wirksamkeit liegt nach den Erfahrungen mit den adoptive transferierten T-Zellklonen nicht bei lokaler Immunsuppression oder eingeschränkter Funktionalität sondern bei der limitierten funktionellen Avidität und sehr wahrscheinlich der eingeschränkten Affinität des TCR zum pMHC.

Der einzige Weg, die zentrale negative Selektion von T-Zellen gegen Epitope von Selbstantigenen zu umgehen, ist der Transfer von TCR-transgenen autologen Zellprodukten. Hierbei werden allogene TCR in polyklonale T-Zellen des Patienten transfiziert. Hier können alloreaktive oder affinitätsmaturierte TCR verwendet werden, welche zusätzlich sekundär modifiziert werden um die Translation in der Zielzelle zu maximieren und Fehlpaarungen mit

endogenen TCR zu vermeiden<sup>27</sup>. Eine internationale Studie mit transgenen WT1-spezifischen alloreaktiven TCR ist derzeit in Vorbereitung.

Unabhängig von der Natur des Zellproduktes (TIL, CAR-modifizierte T-Zellen, TCR-transgene T-Zellen) spielen die Differenzierung der Ausgangszellen und der Immunphänotyp des fertigen Produktes vor Transfer eine entscheidende Rolle für die Persistenz der spezifischen T-Zellen *in vivo*<sup>37</sup>. Die Persistenz im Patienten gilt sowohl bei TIL als auch bei der Therapie mit transgenen T-Zellen als Surrogatmarker für klinisches Ansprechen<sup>86,87</sup>. Viele Gruppen arbeiten heute mit T<sub>cm</sub> als Ausgangszellpopulation für die Herstellung transgener T-Zellprodukte. Es konnte gezeigt werden, dass auch wenn die Zellen nach *in vitro*-Stimulation weitestgehend vollständig einen T<sub>eff</sub>-Phänotypen annehmen, die transgene Zellen *in vivo* zumindest teilweise den T<sub>cm</sub>-Phänotypen zurückerlangen<sup>88</sup>. Die Anreicherung von T<sub>cm</sub> in *good medical practice* (GMP)-Standard ist jedoch extrem aufwendig. Bei pädiatrischen Patienten finden sich darüber hinaus häufig nicht ausreichend T<sub>cm</sub> für eine solche Strategie. Wir konnten in unserer adoptiven T-Zellstudie zeigen, dass wir durch Hinzunahme von IL-21 zur Stimulation *in vitro* ein Zellprodukt generieren können, welches ohne initiale Anreicherung von T<sub>cm</sub> phänotypisch dieser T-Zellpopulation sehr nahe kommt, und klassische Marker weniger terminal differenzierter T-Zellen wie CD28, CD27 und CD127 retiniert. Interessanterweise zeigten die IL-21-stimulierten Zellklone eine deutlich längere Persistenz *in vivo*<sup>26</sup>. Auch wenn das klinische Ansprechen auf den Transfer der WT1<sub>126-134</sub>-spezifischen T-Zellklone in unserer Studie kritisch bewertet werden muss, ist die Stimulation mit IL-21 eine vielversprechende Alternative zur T<sub>cm</sub>-Anreicherung für eine längere Persistenz da, und sollte auch im Kontext mit den Herstellungsprotokollen für genetisch modifizierte T-Zellprodukte evaluiert werden. Dies gilt vor allem für pädiatrische Protokolle, wo die Anreicherung von T<sub>cm</sub> wegen der geringen Zellzahlen im Ausgangsmaterial schwierig durchzuführen ist.

### **3.4 Neue T-Zellantigene für die AML und andere Tumorentitäten**

Für die Entwicklung einer gerichteten T-Zelltherapie ist der wichtigste Schritt unabhängig von der Behandlungsmodalität (Peptid-Vakzinierung, DC-Vakzinierung, adoptiver Transfer von T-Zelllinien/-klonen oder TCR- oder CAR-transgenen T-Zellen) zunächst die Auswahl eines geeigneten Tumorantigens. Mit Ausnahme von Peptidvakzinierung ist eine T-Zelltherapie mit definierten Spezifitäten der T-Zellen gegen Patienten-spezifische Neoantigene technisch und praktisch schwierig und nur im Sinne eines *proof of principle* im Rahmen von Studien durchführbar. Speziell im Kontext mit transgenen T-Zellen rückt die sogenannte klinische

Immunogenität und die zentrale Toleranz gegenüber Epitopen von Selbstantigenen als Auswahlkriterium für ein T-Zellantigen in den Hintergrund, wohingegen die selektive Expression und Präsentation eines Epitops im malignen Zellkompartiment und die funktionelle Relevanz des Zielproteins an Bedeutung gewinnen.

Für WT1 ist zwar die funktionelle Relevanz und die Expression im LSC-Kompartiment vorbeschrieben, die Expression ist im Gesunden aber nicht auf die AML beschränkt<sup>46,62</sup>. Auf mRNA-Ebene ist die Expression nicht nur in Ovar, Hoden und Milz sondern auch in den Glomeruli der Niere deutlich über den Expressionen in AML-Blasten, sodass das komplette Ausbleiben von immunvermittelten Nebenwirkungen im Sinne eines *on target/off tumor*-Effekts in den klinischen Studien an der prinzipiellen Wirksamkeit einer Vakzine oder einem Transfer von unmodifizierten T-Zellen eines HLA-identen Spenders zweifeln lässt<sup>49,50,62,76</sup>. Darüber hinaus ist die AML eine äußerst heterogene Erkrankung. Alle vorbeschriebenen LAA bei der AML sind nur in einem Bruchteil der Patienten relevant überexprimiert<sup>51,52</sup>. Mögliche *escape*-Varianten können langfristig möglicherweise durch die synchrone T-Zelltherapie gegen mehrere LAA umgangen werden. All diese Überlegungen zeigen, dass dringend neue LAA identifiziert und evaluiert werden müssen.

Da bei der Entwicklung von unmutierten Selbstantigenen in erster Linie das Expressionsmuster eine Rolle spielt, bietet sich ein *reversed immunology*-Ansatz an. Hierbei werden zunächst Proteine identifiziert, die ein möglichst optimales Expressionsmuster aufweisen. In einem zweiten Schritt werden dann die Immunogenität nachgewiesen und T-Zellepitope identifiziert. Für den ersten Schritt, also für die Identifikation von Kandidatengenen stehen Genom-weite Verfahren wie *microarray*-Analysen oder RNA-Seq zur Verfügung<sup>89,90</sup>. Das Expressionsmuster muss dann zunächst mittels eines quantitativen PCR-Verfahrens bestätigt werden, wobei das Hauptaugenmerk auf der Selektivität der Expression liegt<sup>62</sup>. Zusätzlich ist der Nachweis der Expression in den Zielzellen auf Proteinebene notwendig. Die tatsächliche Präsentation kann durch eine Ligandom-Analyse im Tumorgewebe bestätigt werden<sup>52</sup>. Eine funktionelle Relevanz des Zielproteins ist wünschenswert, aber nicht zwingend erforderlich (Viele *cancer testis antigens* wie z. B. NY-ESO-1 qualifizieren sich als T-Zellantigene ausschließlich durch das selektive Expressionsmuster; für wenige dieser Gene ist eine funktionelle Relevanz für die neoplastische Zelle gezeigt<sup>42</sup>). Ist das Kandidatenprotein identifiziert, wird die Immunogenität durch *in vitro*-Stimulation von T-Zellen oder Immunisierung im Tiermodell nachgewiesen. T-Zellepitope lassen sich *in silico* prädikieren<sup>91</sup> oder durch die Testung von Peptid-Bibliotheken identifizieren<sup>62</sup>.

Unter Verwendung von *microarray*-Datensätzen von LSC konnten wir so eine Vielzahl von Kandidatengen identifizieren, die selektiv in dieser Zellpopulation exprimiert sind. Das bedeutet dass sich keine relevante Expression in gesunden Geweben inclusive HSC nachweisen ließ. Obwohl sich bei vielen Kandidatengen diese selektive Expression in der qRT PCR nicht bestätigt, stehen derzeit noch diverse so identifizierte Kandidatengene zur Weiterentwicklung zur Verfügung [<sup>62</sup>, eigene unpublizierte Daten]. Auf diese Weise wurde auch Cyclin A1 als Kandidatengen identifiziert, welches basierend auf unseren Daten ein äußerst vielversprechendes LAA darstellt. Cyclin A1-spezifische Klone zeigten verglichen mit Klonen gegen WT1 auch *in vitro* eine deutlich höhere zytolytische Aktivität sowohl gegenüber AML-Zelllinien als auch primären Blasten [eigene unpublizierte Daten]. Entsprechend besteht ein großes Interesse, dieses LAA im klinischen Kontext bei der AML weiter zu verfolgen.

Prinzipiell kann sich der Entwicklung einer gerichteten T-Zelltherapie von zwei unterschiedlichen Blickwinkeln genähert werden:

- Von Seiten des Antigens, das heißt, es wird ein sehr selektiv exprimiertes Protein identifiziert. Sekundär wird dann untersucht, in welchen Tumorentitäten dieses Antigen am häufigsten und/oder am höchsten exprimiert wird.
- Von Seiten der Tumorentität, das heißt, man sucht gezielt nach potentiellen Antigenen, die in einer vordefinierten Tumorentität exprimiert werden.

Zusätzlich spielt bei der Auswahl der Zielentität immer auch der klinische Kontext und die Behandlungsmodalität eine Rolle. Während Peptidvakzinierungen während des klinischen Verlaufs praktisch bei allen malignen Erkrankungen eine systemische Therapie komplementieren können, sind adoptive Konzepte abhängig von Apherese und Lymphodepletion, die nicht immer in standardisierten Therapiealgorithmen zu integrieren sind. Cyclin A1 wurde primär gezielt als LAA bei der AML identifiziert. Hintergrund war die prinzipielle Wirksamkeit zellulärer Therapiekonzepte bei der AML und die Integrierbarkeit in die etablierten Behandlungsabläufe entweder als adjuvantes Konzept nach HSCT allogon oder als Therapieoption für Patienten mit Kontraindikationen gegen die HSCT im autologen Setting. Entsprechend wurde gezielt nach Proteinen mit Expression in LSC gesucht<sup>62</sup>.

Ist die selektive Expression und die Immunogenität eines Antigens im Kontext mit einer Tumorentität gezeigt, sollte dieses gezielt auf potentielle klinische Applizierbarkeit in anderen Entitäten geprüft werden. So konnten wir eine relevante Cyclin A1-Überexpression auch in den meisten Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen zeigen. Hier war die Expression von Cyclin A1 vom molekularen Subtyp abhängig und bezüglich des progressionsfreien Überlebens nach Platin-basierter Therapie prädiktiv<sup>92</sup>. Ausstehend sind derzeit die Untersuchung der funktionellen Relevanz und die Expression im Stammzellkompartiment

von Ovarialkarzinomen. Es werden derzeit weitere Tumorentitäten vor allem aus dem pädiatrischen Formenkreis auf die Expression von Cyclin A1 untersucht.

## 4 Zusammenfassung

Sowohl im Bereich der gerichteten als auch der ungerichteten Immuntherapien steht aktuell eine Vielzahl an neuen, klinisch wirksamen Therapiekonzepten zur Verfügung, wobei die Kombination dieser Wirkprinzipien in der klinischen Anwendung noch am Anfang steht. Die Vakzine oder der adoptive Transfer von LAA-spezifischen autologen T-Zellen im Kontext mit der AML ist wenig toxisch, aber in seiner Wirksamkeit limitiert. Für die rationale Auswahl von immuntherapeutischen Kombinationspartnern ist die Kenntnis der Resistenzmechanismen bei gerichteten T-Zelltherapien der AML essentiell. Speziell bei WT1 verdichten sich die Hinweise, dass sowohl Expressionsmuster als auch Präsentation des Epitops problematisch sind. Generell bleiben die Hauptprobleme der autologen T-Zelltherapie wahrscheinlich die niedrige Avidität der T-Zellen und lokale immunsuppressive Faktoren.

Adoptive T-Zelltherapien mit transgenen TCR oder CAR können das Problem der niedrigen Avidität autologer T-Zellen umgehen. Hier spielt die Tumorbiologie und die Immunogenität des Tumors eine untergeordnete Rolle. Mit steigender Wirksamkeit steigt auch die Gefahr von Toxizität. Die hohe und vor allem Tumor-selektive Expression des Antigens wird dadurch wichtigstes Kriterium für die Auswahl bzw. Entwicklung eines T-Zellantigens.

Nicht nur die Affinität des TCR oder des CAR-Konstrukts sind für die klinische Wirksamkeit relevant. Bei der adoptiven T-Zelltherapie spielt auch die Art und die Prozessierung des Zellprodukts und die Konditionierung des Patienten eine wichtige Rolle. Eine Selektion von  $T_{cm}$  oder die Stimulation in Anwesenheit von IL21 können ebenso wie die Lymphodepletion des Patienten zu einer längeren Persistenz und somit zu einer besseren Wirksamkeit der Therapie beitragen.

Probleme mit Expression von LAA in gesunden Geweben lassen sich nur durch Entwicklung neuer Antigene lösen. Cyclin A1 ist ein vielversprechender Antigenkandidat, der WT1 im präklinischen Entwicklungsstand als LAA bei der AML in vielerlei Hinsicht überlegen ist. Auch Cyclin A1 ist nicht in allen AML immuntherapeutisch relevant exprimiert. Deshalb ist es unerlässlich, dass weitere LSC-wirksame Antigenkandidaten identifiziert und charakterisiert werden.

## 5 Literatur

- 1 Burnet, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British medical journal* **1**, 779-786 (1957).
- 2 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* **3**, 991-998, doi:10.1038/ni1102-991 (2002).
- 3 Guiguet, M. *et al.* Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. *The Lancet. Oncology* **10**, 1152-1159, doi:10.1016/S1470-2045(09)70282-7 (2009).
- 4 Mapara, M. Y. & Sykes, M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 1136-1151, doi:10.1200/JCO.2004.10.041 (2004).
- 5 Haanen, J. B. *et al.* Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **55**, 451-458, doi:10.1007/s00262-005-0018-5 (2006).
- 6 Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18538-18543, doi:10.1073/pnas.0509182102 (2005).
- 7 Tabira, Y. *et al.* Predicting initial recurrence pattern of esophageal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Hepato-gastroenterology* **47**, 1315-1318 (2000).
- 8 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* **16**, 343-353, doi:10.1038/ni.3123 (2015).
- 9 Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781-4789, doi:10.1182/blood-2005-12-4818 (2006).
- 10 Scheibenbogen, C. *et al.* CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 2132-2137, doi:10.1182/blood-2002-01-0163 (2002).
- 11 Nakae, Y. *et al.* Two distinct effector memory cell populations of WT1 (Wilms' tumor gene 1)-specific cytotoxic T lymphocytes in acute myeloid leukemia patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **64**, 791-804, doi:10.1007/s00262-015-1683-7 (2015).

- 12 Ochsenreither, S. *et al.* Long term presence of a single predominant tyrosinase-specific T-cell clone associated with disease control in a patient with metastatic melanoma. *International journal of cancer* **126**, 2497-2502, doi:10.1002/ijc.24939 (2010).
- 13 Scheibenbogen, C. *et al.* Long-term freedom from recurrence in 2 stage IV melanoma patients following vaccination with tyrosinase peptides. *International journal of cancer* **99**, 403-408, doi:10.1002/ijc.10328 (2002).
- 14 Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology* **4**, 225-234, doi:10.1038/ni889 (2003).
- 15 Albrecht, J. *et al.* IL-21-treated naive CD45RA<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**, 235-248, doi:10.1007/s00262-010-0936-8 (2011).
- 16 Ochsenreither, S. *et al.* "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow. *Journal of immunotherapy* **34**, 85-91, doi:10.1097/CJI.0b013e3181f3cc5c (2011).
- 17 Ivanova, E. A. & Orekhov, A. N. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *BioMed research international* **2015**, 327470, doi:10.1155/2015/327470 (2015).
- 18 Laydon, D. J., Bangham, C. R. & Asquith, B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **370**, doi:10.1098/rstb.2014.0291 (2015).
- 19 Garcia, K. C. & Adams, E. J. How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* **122**, 333-336, doi:10.1016/j.cell.2005.07.015 (2005).
- 20 Corse, E., Gottschalk, R. A. & Allison, J. P. Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *Journal of immunology* **186**, 5039-5045, doi:10.4049/jimmunol.1003650 (2011).
- 21 Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 1503-1520, doi:10.1007/s00018-011-0658-x (2011).
- 22 Sandberg, J. K. *et al.* T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity. *Journal of immunology* **165**, 25-33 (2000).
- 23 Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401, doi:10.1126/science.1075958 (2002).

- 24 Scheibenbogen, C. *et al.* Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *International journal of cancer* **104**, 188-194, doi:10.1002/ijc.10961 (2003).
- 25 Anguille, S., Lion, E., Smits, E., Berneman, Z. N. & van Tendeloo, V. F. Dendritic cell vaccine therapy for acute myeloid leukemia: questions and answers. *Human vaccines* **7**, 579-584 (2011).
- 26 Chapuis, A. G. *et al.* Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Science translational medicine* **5**, 174ra127, doi:10.1126/scitranslmed.3004916 (2013).
- 27 Schmitt, T. M., Stromnes, I. M., Chapuis, A. G. & Greenberg, P. D. New Strategies in Engineering T-cell Receptor Gene-Modified T cells to More Effectively Target Malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 5191-5197, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0860 (2015).
- 28 Maude, S. & Barrett, D. M. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *British journal of haematology* **172**, 11-22, doi:10.1111/bjh.13792 (2016).
- 29 Stieglmaier, J., Benjamin, J. & Nagorsen, D. Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert opinion on biological therapy* **15**, 1093-1099, doi:10.1517/14712598.2015.1041373 (2015).
- 30 Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 5233-5239, doi:10.1200/JCO.2008.16.5449 (2008).
- 31 Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *Journal of immunotherapy* **36**, 133-151, doi:10.1097/CJI.0b013e3182829903 (2013).
- 32 Cameron, B. J. *et al.* Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Science translational medicine* **5**, 197ra103, doi:10.1126/scitranslmed.3006034 (2013).
- 33 van Loenen, M. M. *et al.* Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10972-10977, doi:10.1073/pnas.1005802107 (2010).
- 34 Robbins, P. F. *et al.* Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* **173**, 7125-7130 (2004).

- 35 Wrzesinski, C. *et al.* Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother* **33**, 1-7.
- 36 Perna, S. K. *et al.* Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma. *Clin Cancer Res* **19**, 106-117.
- 37 Berger, C. *et al.* Adoptive transfer of effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *The Journal of clinical investigation* **118**, 294-305, doi:10.1172/JCI32103 (2008).
- 38 Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648, doi:10.1038/367645a0 (1994).
- 39 Misaghian, N. *et al.* Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia* **23**, 25-42, doi:10.1038/leu.2008.246 (2009).
- 40 Dohner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453-474, doi:10.1182/blood-2009-07-235358 (2010).
- 41 Chapuis, A. G. *et al.* Transferred WT1-reactive CD8<sup>+</sup> T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Science translational medicine* **5**, 174ra127.
- 42 Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5323-5337, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0737 (2009).
- 43 Ochsenreither, S. *et al.* Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood* **119**, 5492-5501.
- 44 Snauwaert, S. *et al.* RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Haematologica* **97**, 1539-1547.
- 45 Spranger, S. *et al.* TCR-transgenic lymphocytes specific for HMMR/Rhamm limit tumor outgrowth in vivo. *Blood* **119**, 3440-3449.
- 46 Xue, S. A. *et al.* Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica* **95**, 126-134, doi:10.3324/haematol.2009.006486 (2010).
- 47 Yong, A. S. *et al.* Hematopoietic stem cells and progenitors of chronic myeloid leukemia express leukemia-associated antigens: implications for the graft-versus-leukemia effect and peptide vaccine-based immunotherapy. *Leukemia* **22**, 1721-1727 (2008).

- 48 Leisegang, M. *et al.* MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors. *The Journal of clinical investigation* **120**, 3869-3877.
- 49 Keilholz, U. *et al.* A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* **113**, 6541-6548, doi:10.1182/blood-2009-02-202598 (2009).
- 50 Oka, Y. *et al.* Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13885-13890, doi:10.1073/pnas.0405884101 (2004).
- 51 Schneider, V. *et al.* Leukemic progenitor cells are susceptible to targeting by stimulated cytotoxic T cells against immunogenic leukemia-associated antigens. *International journal of cancer* **137**, 2083-2092, doi:10.1002/ijc.29583 (2015).
- 52 Berlin, C. *et al.* Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* **29**, 647-659, doi:10.1038/leu.2014.233 (2015).
- 53 Villalobos, I. B. *et al.* Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **115**, 3158-3161, doi:10.1182/blood-2009-11-254284 (2010).
- 54 Ochsenreither, S. *et al.* Relative quantification of TCR Vbeta-chain families by real time PCR for identification of clonal T-cell populations. *Journal of translational medicine* **6**, 34, doi:10.1186/1479-5876-6-34 (2008).
- 55 Ochsenreither, S. *et al.* Comparison of T-cell receptor repertoire restriction in blood and tumor tissue of colorectal cancer patients. *Journal of translational medicine* **8**, 35, doi:10.1186/1479-5876-8-35 (2010).
- 56 Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J. & Rossjohn, J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature reviews. Immunology* **6**, 883-894, doi:10.1038/nri1977 (2006).
- 57 Derre, L. *et al.* Distinct sets of alphabeta TCRs confer similar recognition of tumor antigen NY-ESO-1157-165 by interacting with its central Met/Trp residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15010-15015, doi:10.1073/pnas.0807954105 (2008).
- 58 Trautmann, L. *et al.* Dominant TCR V alpha usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *European journal of immunology* **32**, 3181-3190, doi:10.1002/1521-4141(200211)32:11<3181::AID-IMMU3181>3.0.CO;2-2 (2002).

- 59 Van Driessche, A. *et al.* Clinical-grade manufacturing of autologous mature mRNA-electroporated dendritic cells and safety testing in acute myeloid leukemia patients in a phase I dose-escalation clinical trial. *Cytotherapy* **11**, 653-668, doi:10.1080/14653240902960411 (2009).
- 60 Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009-4017, doi:10.1182/blood-2006-04-015024 (2006).
- 61 Bornhauser, M. *et al.* Prophylactic transfer of BCR-ABL-, PR1-, and WT1-reactive donor T cells after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **117**, 7174-7184, doi:10.1182/blood-2010-09-308569 (2011).
- 62 Ochsenreither, S. *et al.* Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood* **119**, 5492-5501, doi:10.1182/blood-2011-07-365890 (2012).
- 63 Nicodemus, C. F. Antibody-based immunotherapy of solid cancers: progress and possibilities. *Immunotherapy* **7**, 923-939, doi:10.2217/imt.15.57 (2015).
- 64 Zhu, Y. *et al.* Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trials. *European journal of haematology*, doi:10.1111/ejh.12602 (2015).
- 65 Robbins, P. F. *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 917-924, doi:10.1200/JCO.2010.32.2537 (2011).
- 66 Davila, M. L., Sauter, C. & Brentjens, R. CD19-Targeted T Cells for Hematologic Malignancies: Clinical Experience to Date. *Cancer journal* **21**, 470-474, doi:10.1097/PPO.000000000000153 (2015).
- 67 Massenkeil, G. *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: delayed graft-versus-tumor effect is associated with chimerism conversion but transplantation has high toxicity. *Bone marrow transplantation* **34**, 309-316, doi:10.1038/sj.bmt.1704587 (2004).
- 68 van Bergen, C. A. *et al.* Durable remission of renal cell carcinoma in conjuncture with graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusion: rule or exception? *PloS one* **9**, e85198, doi:10.1371/journal.pone.0085198 (2014).
- 69 Griffioen, M., van Bergen, C. A. & Falkenburg, J. H. Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets. *Frontiers in immunology* **7**, 100, doi:10.3389/fimmu.2016.00100 (2016).

- 70 Hillerdal, V. & Essand, M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **29**, 75-89, doi:10.1007/s40259-015-0122-9 (2015).
- 71 Sakai, K. *et al.* Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of neurosurgery* **123**, 989-997, doi:10.3171/2015.1.JNS141554 (2015).
- 72 Sawada, A. *et al.* Feasibility of Cancer Immunotherapy with WT1 Peptide Vaccination for Solid and Hematological Malignancies in Children. *Pediatric blood & cancer* **63**, 234-241, doi:10.1002/pbc.25792 (2016).
- 73 Srivastava, P. *et al.* Induction of cancer testis antigen expression in circulating acute myeloid leukemia blasts following hypomethylating agent monotherapy. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.7326 (2016).
- 74 Henry, J. Y. *et al.* Enhanced cross-priming of naive CD8+ T cells by dendritic cells treated by the IMiDs(R) immunomodulatory compounds lenalidomide and pomalidomide. *Immunology* **139**, 377-385, doi:10.1111/imm.12087 (2013).
- 75 Rosenblatt, J. *et al.* PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine. *Journal of immunotherapy* **34**, 409-418, doi:10.1097/CJI.0b013e31821ca6ce (2011).
- 76 Rezvani, K. *et al.* Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* **111**, 236-242, doi:10.1182/blood-2007-08-108241 (2008).
- 77 Kuball, J. *et al.* Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**, 161-171, doi:10.1007/s00262-010-0929-7 (2011).
- 78 Rezvani, K. *et al.* T-cell responses directed against multiple HLA-A\*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 8799-8807, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1314 (2005).
- 79 Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology* **14**, 377-391, doi:10.1038/nri3667 (2014).
- 80 Huang, J. *et al.* T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *Journal of immunology* **172**, 6057-6064 (2004).

- 81 Lu, Y. C. *et al.* Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 3401-3410, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0433 (2014).
- 82 Gros, A. *et al.* PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2246-2259, doi:10.1172/JCI73639 (2014).
- 83 Turpeinen, H. *et al.* Minor histocompatibility antigens as determinants for graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *International journal of immunogenetics* **40**, 495-501, doi:10.1111/iji.12051 (2013).
- 84 Casalegno-Garduno, R. *et al.* Immune responses to WT1 in patients with AML or MDS after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *International journal of cancer* **138**, 1792-1801, doi:10.1002/ijc.29909 (2016).
- 85 Kapp, M. *et al.* CD8+ T-cell responses to tumor-associated antigens correlate with superior relapse-free survival after allo-SCT. *Bone marrow transplantation* **43**, 399-410, doi:10.1038/bmt.2008.426 (2009).
- 86 Kershaw, M. H. *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 6106-6115, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1183 (2006).
- 87 Rosenberg, S. A. *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 4550-4557, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116 (2011).
- 88 Sommermeyer, D. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8(+) and CD4(+) subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* **30**, 492-500, doi:10.1038/leu.2015.247 (2016).
- 89 McElwaine, S. *et al.* Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megakaryoblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker. *British journal of haematology* **125**, 729-742, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04982.x (2004).
- 90 Yang, Z. H., Zheng, R., Gao, Y., Zhang, Q. & Zhang, H. Abnormal gene expression and gene fusion in lung adenocarcinoma with high-throughput RNA sequencing. *Cancer gene therapy* **21**, 74-82, doi:10.1038/cgt.2013.86 (2014).
- 91 Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O. & Rosales-Mendoza, S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine

development. *Journal of biomedical informatics* **53**, 405-414, doi:10.1016/j.jbi.2014.11.003 (2015).

- 92 Arsenic, R. *et al.* Cancer-testis antigen cyclin A1 is broadly expressed in ovarian cancer and is associated with prolonged time to tumor progression after platinum-based therapy. *BMC cancer* **15**, 784, doi:10.1186/s12885-015-1824-6 (2015).

## 6 Abkürzungen

AA	Aminosäure
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
C	<i>Constant</i> -Segment (TCR)
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CDR	<i>Complement determining region</i>
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
D	<i>Diversity</i> -Segment (TCR)
DC	Dendritische Zelle
DLI	<i>Donor derived lymphocyte infusion</i>
EC <sub>50</sub>	Konzentration halb-maximaler Effektivität
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GvH	<i>Graft versus host</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
J	<i>Joining</i> -Segment (TCR)
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LSC	Leukämische Stammzelle
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	<i>Major histocomparability complex</i>
MiHA	<i>Minor antigen</i>
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle
NKT-Zelle	Natürliche-Killer-T-Zelle
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle
pMHC	<i>Peptide-Major histocomparability complex</i>
qRT PCR	<i>quantitative reverse transcribed polymerase chain reaction</i>
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>

TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zellrezeptor
T <sub>cm</sub>	<i>Central memory</i> T-Zelle
T <sub>eff</sub>	<i>Effektor</i> T-Zelle
T <sub>em</sub>	<i>Effector memory</i> T-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T <sub>N</sub>	Naive T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
UTR	Untranslatierte Region
V	<i>Variable</i> -Segment (TCR)
WT1	„Wilms‘ Tumor“-Protein 1

## 7 Danksagung

Mein Dank gilt unseren Patienten für die Unterstützung unserer Forschung, meinen Mentoren Ulrich Keilholz, Gabriele Schönian, Eckhard Thiel, Philip Greenberg, Antonio Pezzutto und Wolfgang Uckert sowie den Kollegen Anne Letsch, Antonia Busse, Alberto Fusi, Johannes Tucholsky, Anika Nonnenmacher, Thomas Burmeister, Kathrin Kuhls, Jan Schwenkenbecher, Carola Schweynoch, Alexander Schmittel, Carmen Scheibenbogen, Dirk Nagorsen, Susanne Wojtke, Mark Reinwald, Sandra Bauer, David Stather, Anne Geikowski, Andrea Stroux, Thomas Schmitt, Ravindra Majeti, Irving Weissman, Dirk Stirewalt, Keith Loeb, Brent Wood, Yoshiki Akatsuka, Michael Hudecek, Edus ‚Hootie‘ Warren, Aude Chapuis, Gunnar Ragnarsson, Jeff Pufnock, Natalie Duerkopp, Hieu Nguyen, Rebecca Yoda, Louise Badenhorst, Daphne Benteyn, Aude Bonehill, Kris Thielemanns, Ruza Arsenic, Manfred Dietel, Elena Braicu, Andreas Kaufmann, Jalid Sehouli, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg begleitet haben.

## 8 Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur guten wissenschaftlichen Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, 28.04.2016

Dr. Sebastian Ochsenreither