

**Optimierung von CD19-Antikörpern zur Steigerung der
therapeutischen Effizienz bei der B-Vorläufer akuten
lymphatischen Leukämie (BCP-ALL)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dorothee Winterberg
aus Magdeburg

Kiel 2022

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Denis Martin Schewe

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Röder

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2022

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

Winterberg, D.; Lenk, L.; Oßwald, M.; Vogiatzi, F.; Gehlert, C.L.; Frielitz, F.-S.; Klausz, K.; Rösner, T.; Valerius, T.; Trauzold, A.; Peipp M.; Kellner C.; Schewe D.M.; Engineering of CD19 Antibodies: A CD19-TRAIL Fusion Construct Specifically Induces Apoptosis in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) Cells In Vivo. *JCM* **2021**, *10*, 2634, doi:10.3390/jcm10122634.

Summary

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is the most frequent malignancy in children and young adults. Despite high cure rates chemotherapy-based treatment protocols are associated with severe side effects and therapy options are limited when therapy resistance develops and relapses occur. Targeted antibody-based immunotherapies are associated with improved patient outcome and lower side effects and have therefore entered routine treatment of BCP-ALL. Yet also antibody-based immunotherapy approaches harbor therapeutic limitations. For example, native CD19-antibodies only show limited clinical efficacy due to their poor ability to recruit and activate effector cells. In addition, antibodies are poorly effective in central nervous system (CNS) leukemia, one of the major clinical challenges in BCP-ALL, because of their limited ability to cross the barrier systems protecting the CNS. Therefore, new strategies to optimize the therapeutic potential of therapeutic antibodies are of great clinical interest.

One promising approach to enhance the antitumoral efficacy of therapeutic antibodies is the fusions to cytotoxic agents such as the apoptosis inducer tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Therefore, in the first part of the present work, a fusion protein consisting of a CD19-specific IgG1 antibody and a single chain TRAIL domain (CD19-TRAIL) was produced and pre-clinically evaluated. CD19-TRAIL showed antigen-specific binding and potent induction of apoptosis in BCP-ALL cells *in vitro* and *in vivo*. Additionally, CD19-TRAIL prolonged the survival of mice transplanted with BCP-ALL-patient-derived xenograft (PDX) cells of different cytogenetic backgrounds. Moreover, the combination with Venetoclax (VTX), an inhibitor of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), synergistically increased the efficacy of CD19-TRAIL in BCP-ALL cells *in vitro* and *in vivo*.

The second part of this work aimed to modify antibodies so they can penetrate the CNS niche. Since previous studies suggested that the artificial signal peptide Angiopep2 (An2) promotes the transport of antibodies across the blood-brain barrier via transcytosis by binding the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) receptor on capillary endothelial cells, a CD19-An2 fusion protein was produced and preclinically characterized. CD19-An2 specifically bound to CD19-positive and LRP1-positive cells. Applying *in vivo* detection of labelled CD19-An2, a significant accumulation of the antibody was detected in the skull region of mice as compared to

the parental CD19-IgG1 antibody indicating successful transport into the CNS. Furthermore, to circumvent the lack of effector cells in the CNS niche, CD19-An2 was also fused to TRAIL (CD19-An2-TRAIL) to promote direct killing of BCP-ALL cells. CD19-An2-TRAIL showed antigen-specific binding and induction of apoptosis in BCP-ALL cells *in vitro*. Furthermore, CD19-An2-TRAIL showed therapeutic efficacy comparable to that of CD19-TRAIL in a PDX mouse model. Yet no benefit in the treatment of CNS leukemia compared to CD19-TRAIL was found in the applied models.

Taken together CD19-TRAIL eliminates BCP-ALL cells in an antigen-specific manner via the induction of apoptosis rendering this kind of fusion proteins promising candidates for the clinical treatment of BCP-ALL. Moreover, our data indicate that fusion of antibodies to the shuttling peptide An2 may help to promote accumulation of CD19-antibodies in the CNS warranting further preclinical testing. The data of this work underlines the potential of antibody-engineering strategies to enhance the efficacy of therapeutic antibodies for the treatment of BCP-ALL and beyond.

Zusammenfassung

Die B-Vorläufer akute lymphatische Leukämie (BCP-ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. Trotz guter Heilungschancen, sind konventionelle Chemotherapie-basierte Therapien mit teils schweren Nebenwirkungen verbunden und die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt, wenn sich eine Therapieresistenz entwickelt oder es zu Rezidiven kommt. Gezielte Antikörper-basierte Immuntherapien sind mit einem verbesserten individuellen Therapieerfolg und geringeren Nebenwirkungen assoziiert und sind daher mittlerweile ein wichtiger Teil der Routinebehandlung von BCP-ALL-Patientinnen/Patienten. Jedoch bergen auch Antikörper gewisse therapeutische Limitationen. So zeigen native CD19-Antikörper nur eine begrenzte Wirksamkeit aufgrund ihrer schwachen Befähigung Effektorzellen zu rekrutieren und aktivieren. Darüber hinaus sind native Antikörper bei Leukämien des zentralen Nervensystems (ZNS), einer der größten klinischen Herausforderungen bei der BCP-ALL, nicht effektiv, da sie die Barriersysteme des ZNS nur begrenzt überwinden können. Daher sind neue Strategien zur Optimierung des therapeutischen Potenzials von großem klinischen Interesse.

Ein vielversprechender Ansatz zur Steigerung der anti-tumoralen Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern sind Fusionen mit zytotoxischen Wirkstoffen wie dem *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Daher wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Fusionsprotein, aus einem CD19-spezifischen IgG1-Antikörper und einer Einzelketten TRAIL-Domäne, hergestellt und prä-klinisch evaluiert (CD19-TRAIL). CD19-TRAIL zeigte *in vitro* und *in vivo* eine günstige Antigen-spezifische Bindung und eine potente Induktion der Apoptose in BCP-ALL-Zellen. Darüber hinaus verlängerte CD19-TRAIL das Überleben von *patient-derived Xenograft* (PDX)-Mäusen mit Zellen verschiedener BCP-ALL-Patientinnen/Patienten mit unterschiedlichen Zytogenetiken. Zusätzlich wurde über die Kombination mit Venetoclax (VTX), einem Inhibitor des anti-apoptotischen Proteins *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2), die Effizienz von CD19-TRAIL in BCP-ALL-Zellen *in vitro* und *in vivo* synergistisch gesteigert.

Der zweite Teil dieser Arbeit zielte darauf ab, Antikörper so zu modifizieren, dass sie in die ZNS-Nische eindringen können. Vorangegangene Studien deuten darauf hin, dass das artifizielle Signalpeptid Angiopep2 (An2) den Transport von Antikörpern, durch die Blut-Hirn-Schranke begünstigt. Dies wird über *low-density lipoprotein*

receptor-related protein 1 (LRP1), einem Rezeptor auf Kapillarendothelzellen, vermittelt. Daher wurde ein CD19-An2-Fusionsprotein hergestellt und prä-klinisch charakterisiert. CD19-An2 band spezifisch CD19-positive sowie LRP1-positive-Zellen. Mittels *in vivo* Detektion von Fluoreszenz-markiertem CD19-An2 wurde eine signifikante Akkumulation des Antikörpers in der Schädelregion von Mäusen im Vergleich zum parentalen CD19-IgG1-Antikörper nachgewiesen, was einen erfolgreichen Transport in das ZNS anzeigt. Aufgrund des Mangels an Effektorzellen in der ZNS-Nische wurde CD19-An2 zusätzlich an TRAIL (CD19-An2-TRAIL) fusioniert, um das direkte Abtöten von BCP-ALL-Zellen zu gewährleisten. CD19-An2-TRAIL zeigte *in vitro* eine Antigen-spezifische Bindung und Apoptoseinduktion in BCP-ALL-Zellen. Weiterhin wies CD19-An2-TRAIL in einem PDX-Mausmodell eine therapeutische Wirksamkeit auf, die mit der von CD19-TRAIL vergleichbar war. Jedoch wurde in den angewandten Modellen kein Vorteil bei der Behandlung von ZNS-Leukämien im Vergleich zu CD19-TRAIL festgestellt.

Zusammengefasst zeigte CD19-TRAIL, dass es BCP-ALL-Zellen Antigen-spezifisch über die Induktion von Apoptose eliminiert, was diese Art von Fusionsproteinen zu vielversprechenden Kandidaten für die klinische Behandlung von BCP-ALL-Patientinnen/Patienten macht. Darüber hinaus weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass die Fusion von Antikörpern mit dem Transportpeptid An2 dazu beitragen kann, die Akkumulation von CD19-Antikörpern im ZNS zu fördern, was weitere prä-klinische Tests rechtfertigt. Die Daten dieser Arbeiten unterstreichen das Potenzial von Antikörper-Optimierungs-Strategien zur Steigerung der Wirksamkeit therapeutischer Antikörper zur Behandlung der BCP-ALL und anderer hämatologischer Erkrankungen.

Inhaltsverzeichnis

Summary I

Zusammenfassung..... III

1. Einleitung..... 6

1.1. Leukämien im Kindes- und Jugendalter..... 6

1.1.1. Konventionelle Therapieverfahren bei der BCP-ALL..... 8

1.1.2. Leukämien des zentralen Nervensystems 10

1.2. Gezielte Therapiestrategien bei der BCP-ALL..... 11

1.2.1. Aufbau therapeutischer Antikörper 12

1.2.2. Antikörper-basierte Immuntherapien 13

1.2.3. Wirkmechanismen therapeutischer IgG1-Antikörper 15

1.2.4. Antikörperkonjugate..... 19

1.3. Zielstrukturen auf der Oberfläche von Leukämiezellen der B-Zellreihe 20

1.4. Der programmierte Zelltod – Apoptose..... 24

1.4.1. Signalwege der Apoptose..... 25

1.4.1.1. Der intrinsische Signalweg 25

1.4.1.2. Der extrinsische Signalweg 26

1.4.2. TRAIL und seine Signalwege 27

1.4.3. Anwendung von TRAIL bei der Tumorthherapie 29

1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit..... 30

2. Material und Methoden 32

2.1. Materialien 32

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien..... 32

2.1.2. Lösungen und Puffer 34

2.1.3. Vektoren 35

2.1.4. Enzyme 35

2.1.5. Bakterienstämme..... 36

2.1.6. Kits	36
2.1.7. Oligonukleotide.....	36
2.1.8. Zelllinien und Zellkulturmedien	37
2.1.9. Antikörper	37
2.1.10. Software	38
2.2. Methoden.....	39
2.2.1. Klonierung der Antikörperderivate	39
2.2.1.1. Restriktionsverdau der Ausgangsplasmide	39
2.2.1.2. Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	39
2.2.1.3. Ligation.....	40
2.2.1.4. Bakterielle Transformation	40
2.2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA	40
2.2.1.6. Sequenzanalyse der DNA	41
2.2.1.7. Klonierung der Antikörper.....	41
2.2.2. Zellbiologische Methoden	42
2.2.2.1. Zellkultur.....	42
2.2.2.2. Proteinexpression in CHO-S-Zellen	43
2.2.2.3. Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut	44
2.2.3. Bestimmung der Zellvitalität	44
2.2.4. Durchflusszytometrische Verfahren.....	45
2.2.4.1. Nachweis der spezifischen Bindung von Antikörpern.....	45
2.2.4.2. Quantifizierung der Molekülzahl von CD19, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf Zellen	45
2.2.4.3. Apoptose-Assays	46
2.2.5. Zytotoxizitätsassays	46
2.2.5.1. ⁵¹ Chrom-Freisetzungsversuche.....	46
2.2.5.2. Phagozytose	47
2.2.6. Biochemische Methoden	48

2.2.6.1. Reinigung von Antikörpern	48
2.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.2.6.3. Herstellung von Zelllysaten	49
2.2.6.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.6.5. Western-Blot und Immundetektion	50
2.2.7. Synergistische Induktion der Apoptose durch CD19-TRAIL in Kombination mit Venetoclax (VTX)	50
2.2.8. Ethische Grundlagen	51
2.2.9. Tierversuche	51
2.2.9.1. Leukämiemodell-Xenotransplantation, Überwachung und Therapie	51
2.2.9.2. Analyse der Leukämie last im Knochenmark, Milz und ZNS	52
2.2.9.3. Bestimmung der leukämischen Blasten	53
2.2.9.4. Bestimmung der IRDye800 Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Molekular-Tomographie (FMT)	53
2.2.10. Statistik	54
3. Ergebnisse	55
3.1. Herstellung, Charakterisierung und prä-klinische Validierung des heterodimeren, CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-TRAIL	55
3.1.1. Konstruktion der Expressionsvektoren für die schweren und leichten Ketten von CD19-TRAIL	55
3.1.2. Expression des heterodimeren Fusionsproteins CD19-TRAIL	57
3.1.3. CD19-TRAIL bindet effizient an CD19-positive-Zellen	58
3.1.4. Wirkmechanismen des heterodimeren Fusionsantikörpers CD19-TRAIL	60
3.1.4.1. CD19-TRAIL vermittelt direkte anti-proliferative Effekte bei BCP-ALL-Zellen	61
3.1.4.2. CD19-TRAIL induziert Apoptose in CD19 ⁺ -BCP-ALL-Zellen	62
3.1.4.3. CD19-TRAIL zeigt keine Verstärkung von Effektor-Mechanismen im Vergleich zu einem nativen CD19-IgG1-Antikörper	65

3.1.5. CD19-TRAIL ist wirksam bei der BCP-ALL in <i>in vivo</i> Xenograft-Mausmodellen	68
3.1.6. Venetoclax potenziert den zytotoxischen Effekt von CD19-TRAIL in BCP-ALL-Zellen	76
3.2. Herstellung eines ZNS-gängigen CD19-spezifischen Antikörpers.....	83
3.2.1. Konstruktion der Expressionsvektoren für die schweren und leichten Ketten von CD19-An2.....	83
3.2.2. Expression des Fusionsproteins CD19-An2	84
3.2.3. CD19-An2 bindet spezifisch an CD19 ⁺ - und LRP1 ⁺ -Zellen	85
3.2.4. CD19-An2 akkumuliert im ZNS von NSG-Mäusen	86
3.3. Herstellung und Charakterisierung eines CD19-spezifischen, heterodimeren, ZNS-gängigen TRAIL-Fusionsproteins	89
3.3.1. Expression des heterodimeren Fusionsproteins CD19-An2-TRAIL.....	90
3.3.2. CD19-An2-TRAIL bindet spezifisch an CD19 ⁺ -Zellen.....	91
3.3.3. CD19-An2-TRAIL vermittelt direkte anti-proliferative Effekte auf BCP-ALL-Zellen	92
3.3.4. CD19-An2-TRAIL ist therapeutisch wirksam, verhindert jedoch nicht die ZNS-Infiltration von BCP-ALL-Zellen <i>in vivo</i>	93
4. Diskussion	96
4.1. CD19 und TRAIL-Rezeptoren als Immuntherapie-Zielstrukturen auf malignen B-Zellen	97
4.2. CD19-TRAIL-Fusionsproteine als effiziente Anti-Tumorwirkstoffe	100
4.3. Venetoclax potenziert das pro-apoptische Potenzial von CD19-TRAIL	104
4.4. An2-Fusionskonstrukte als Konzept zur Bekämpfung der ZNS-Leukämie.....	107
4.4. Ausblick.....	111

Abkürzungsverzeichnis	114
Abbildungsverzeichnis	117
Tabellenverzeichnis.....	118
Literaturverzeichnis.....	119
Publikationsliste	141
Kongressbeiträge	142
Danksagung	143
Eidesstattliche Erklärung.....	145

1. Einleitung

1.1. Leukämien im Kindes- und Jugendalter

Mit jährlich etwa 500.000 Neuerkrankungen und über 200.000 Todesfällen sind Tumorerkrankungen ein zentrales Gesundheitsproblem in Deutschland [1]. Zwar sind Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren von weniger als 1 % der Krebsneuerkrankungen betroffen, jedoch stellen Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache im Kindesalter dar. Etwa 2200 Kinder unter 18 Jahren erkranken pro Jahr in Deutschland an Krebs, damit liegt die jährliche Inzidenz einer Krebserkrankung in dieser Altersgruppe bei 16 pro 100.000 Kinder. Mit etwa 30 % stellen Leukämien die häufigste Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar. Jungen zeigen dabei im Vergleich zu Mädchen eine geringfügig höhere Erkrankungsrate [1,2].

Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, bei denen es zu einer unkontrollierten Proliferation entarteter, meist undifferenzierter hämatologischer Zellen kommt. Ausgehend vom Knochenmark breiten sie sich im gesamten hämatopoetischen System aus und verdrängen zunehmend gesunde Blutzellen. Die präzise Klassifikation der Leukämien ist entscheidend für den Therapieerfolg. Sie erfolgt anhand klinischer, morphologischer und immunphänotypischer sowie molekular- und zytogenetischer Merkmale. So kategorisiert die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Leukämien nach myeloischem oder lymphatischem Ursprung sowie nach einem akuten oder chronischen Verlauf. Zusätzlich werden die lymphatischen Leukämien immunphänotypisch der B- oder T-Zellreihe zugeordnet [3]. Neoplasien der B-Zellreihe machen dabei bei Kindern und Jugendlichen etwa 80 % der lymphatischen Leukämien aus, während 20 % vom T-Zellsystem abstammen [4]. B-Zell-Leukämien können anhand charakteristischer Oberflächenmarker weiter in pro-, prä-, common- und reife-B-ALL eingeteilt werden [3]. Aufgrund moderner Untersuchungsmethoden, wie der Genomsequenzierung oder der Untersuchung epigenetischer Veränderungen, lassen sich immer mehr Leukämie-Subtypen unterscheiden, die sich hinsichtlich ihrer Prognose und den empfohlenen Therapieoptionen teils stark unterscheiden.

Ein entscheidendes Kennzeichen der ALL ist das Auftreten von chromosomalen Aberrationen. Dies beinhaltet numerische oder strukturelle Veränderungen wie

Aneuploidien, Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen der Chromosomen und beeinflussen unter anderem Gene, die für Transkriptionsfaktoren, epigenetische Modifikatoren oder Signalmoleküle wie Kinasen kodieren [4,5]. Zur Entstehung einer Leukämie sind jedoch noch weitere genetische Veränderungen in den Vorläufer-Zellen der Leukozyten notwendig. Diese submikroskopischen genetischen Läsionen betreffen meist Gene, die eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation, Zellproliferation oder dem Überleben der Zelle spielen [5–7]. Über die genomische Analyse können ALL-Patientinnen/Patienten in verschiedene genetische Subgruppen eingeteilt werden (Abb. 1.1). Einige dieser Subgruppen wie eine Hypodiploidie (<44 Chromosomen), das BCR-ABL1 Fusionsgen (t(9;22)) sowie ein T-Zell-Immunphänotyp sind dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert [8]. Neben den verschiedenen Subgruppen stellen auch das Alter und die Anzahl der Leukozyten bei Diagnose (*white blood cell count*, WBC) entscheidende prognostische Marker dar. Sowohl ein erhöhtes Alter bei Diagnose (≥ 10 Jahre) als auch ein hoher WBC ($\geq 50 \times 10^9/L$) sind, ebenso wie der Befall des zentralen Nervensystems (ZNS), mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Säuglinge unter einem Jahr bilden eine gesonderte Untergruppe, die ebenfalls in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose steht [9].

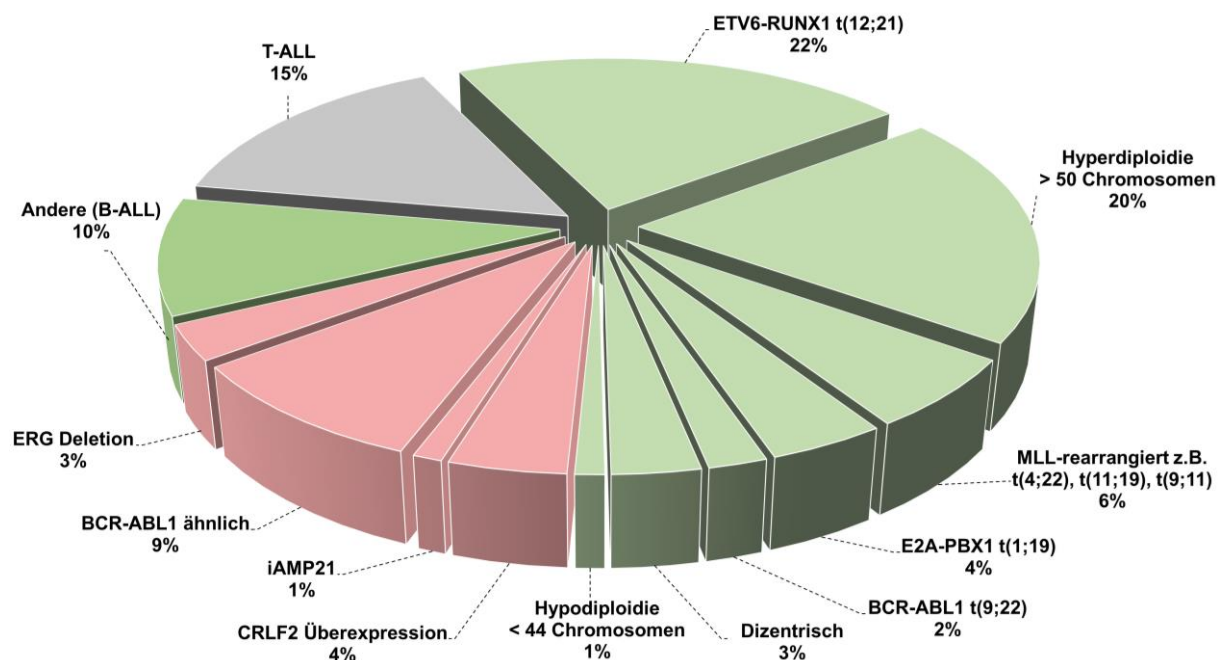


Abbildung 1.1: Klassifikation und Häufigkeiten der verschiedenen ALL-Subgruppen im Kindesalter. B-Vorläufer-ALL (blau), kürzlich identifizierte B-ALL-Subgruppen (gelb), T-ALL-Subgruppen (rot) (modifiziert nach Mullighan, 2013 [4]).

1.1.1. Konventionelle Therapieverfahren bei der BCP-ALL

Um geeignete Therapieprotokolle anzuwenden, werden die Patientinnen/Patienten zunächst in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. Als wichtigster prognostischer Marker hat sich hier die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) zur Messung des Therapieansprechens erwiesen. Hierbei wird in regelmäßigen Abständen die residuale maligne Zellpopulation, die einen wichtigen Faktor für die Früherkennung von Rezidiven darstellt, mittels Durchflusszytometrie oder Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen [10,11]. Die Risikostratifizierung wird auch vom Alter, Geschlecht, WBC sowie der ALL-Subgruppe und dem leukämischen Befall des ZNS abhängig gemacht [5].

Die Standardtherapie der ALL beinhaltet je nach Protokoll eine 2- bis 3-jährige Poly-Chemotherapie, die in vier Phasen unterteilt ist: Induktion, Konsolidierung, Re-Induktion und Erhaltung. In jeder Phase wird je nach Risikogruppe eine speziell abgestimmte Zytostatika-Kombination verabreicht. Ziel der Induktionsphase ist die vollständige Remission. Dafür werden unter anderem Glukokortikoide (Prednison oder Dexamethason), Vincristin (VCR), Anthrazykline und Asparaginase verabreicht. Nach Remission werden die Patientinnen/Patienten im Rahmen einer Konsolidierungstherapie weiter mit Glukokortikoiden, Asparaginase sowie Methotrexat und 6-Mercaptopurin behandelt. Es folgt die Re-Induktionstherapie, dessen Zytostatika-Zusammensetzung derer der Induktionsphase ähnelt. In den folgenden 2 Jahren werden weiterhin Mercaptopurin und Methotrexat sowie in einigen Fällen Glukokortikoide und Vincristin im Rahmen der Erhaltungstherapie verabreicht [12].

Chemotherapeutika sind zytostatische Substanzen, die hemmend auf die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) - Replikation oder die Zellteilung wirken. Dadurch sind hauptsächlich schnell proliferierende Zellen, wie Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen, wie die des Epithels und des Knochenmarks, betroffen. Dies führt zu umfassenden, teils schwerwiegenden Nebenwirkungen. Im Zuge der Schädigung der Knochenmarkszellen kommt es zu einer Störung der Hämatopoese und somit zu einem Mangel an Granulozyten oder Lymphozyten. Dies führt zu einer Suppression des Immunsystems und somit zu einem erhöhten Infektionsrisiko. Die eingeschränkte Bildung von Blutplättchen führt hingegen zu Gerinnungsstörungen und somit zu spontanen Blutungen, während eine gestörte Bildung von Erythrozyten eine Anämie zur Folge hat. Zusätzlich kommt es aufgrund

der Schädigung des Epithels zu Übelkeit, Entzündungen der Schleimhäute, Menstruationsstörungen und Haarausfall. Zwar regenerieren sich nach Abschluss der Therapie diese Gewebe meist wieder, es kann jedoch auch zu einer dauerhaften Schädigung von Organen wie Herz, Leber, Niere oder des Hormon- und Nervensystems kommen. Chemo- und Strahlentherapie stehen zudem mit der Entwicklung von Sekundärtumoren in Verbindung [4,13,14].

Für bestimmte Gruppen von Patientinnen/Patienten, vor allem Subgruppen mit besonders schlechter Prognose, besteht neben der Standardtherapie die Möglichkeit einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) [15]. Dabei erhalten die Betroffenen Blutstammzellen von einer/einem gesunden Spenderin/Spender, die sich im Knochenmark ansiedeln und neue funktionsfähige Blutzellen bilden sollen. Zusätzlich ist beschrieben, dass es zu einer Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (*graft versus leukemia*, GvL) kommen kann. Dabei richten sich die Leukozyten der/des Spenderin/Spenders gegen noch bestehende Leukämiezellen der Erkrankten und reduzieren so das Rezidiv-Risiko [16]. Jedoch kann die HSZT auch zu erheblichen Komplikationen führen. Neben der Abstoßung des Transplantats kann es zu einer Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD) kommen, einer immunologischen Reaktion der T-Zellen der/des Spenderin/Spenders gegen die Zellen der/des Empfängerin/Empfängers, was zu schweren Gewebeschäden oder sogar zum Tod der Patientinnen/Patienten führen kann [17].

Dank der differenzierten Diagnostik und darauf ausgerichteter Therapiekonzepte konnte die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung auf etwa 85 % gesteigert werden [18]. Trotz der hohen Therapieerfolge bei Leukämien im Kindesalter stellt die hohe Rezidiv-Rate von 15-20 % eine große klinische Herausforderung dar, vor allem aufgrund der wesentlich niedrigeren Heilungschancen verglichen zu Primär-Erkrankten [19]. Meist entwickeln die residualen malignen Zellen unter dem Selektionsdruck der Therapie Resistenzmechanismen und sprechen auf eine erneute Chemotherapie nicht mehr an [20,21]. Aufgrund dieser Faktoren sowie der teils schweren Nebenwirkungen und Spätfolgen der beschriebenen konventionellen Therapieansätze, sind neue gezieltere Therapiestrategien bei der Behandlung von Leukämien dringend notwendig.

1.1.2. Leukämien des zentralen Nervensystems

Eine große klinische Herausforderung bei der Behandlung der Leukämien im Kindesalter stellt der Befall des ZNS dar. Zum Zeitpunkt der Diagnose werden etwa 3-5 % der pädiatrischen Patientinnen/Patienten mittels Lumbalpunktion und mikroskopischer Untersuchung des Liquors ZNS-positiv bewertet [22]. Hervorzuheben ist, dass bei 30-40 % der Erkrankten, die ein Rezidiv erleiden, ein ZNS-Befall festgestellt wird. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Patientinnen/Patienten, die initial als ZNS-negativ diagnostiziert wurden [23]. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Leukämiezellen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose das ZNS infiltriert haben, diese jedoch aufgrund wenig sensitiver Diagnosemethoden nicht detektiert werden konnten. Neben der herkömmlichen Chemotherapie werden daher alle Patientinnen/Patienten prophylaktisch mit einer intensiven intrathekalen Chemotherapie, bestehend aus Methotrexat allein oder der Kombination mit Cytarabin und Steroiden behandelt [22,24]. Diese sind jedoch mit einer hohen Neurotoxizität und Leukoenzephalopathien assoziiert [25]. Zusätzlich erhalten einige Hochrisiko-Patientinnen/Patienten eine kraniale Bestrahlung, die mit schweren Nebenwirkungen wie Sekundärtumoren, Wachstumsstörungen und Entwicklungsverzögerungen in Verbindung steht [22,24,26]. Bekannte Risikofaktoren für ZNS-Leukämien sind eine zum Zeitpunkt der Diagnose festgestellte periphere Hyperleukozytose ($WBC > 100.000/\mu l$) sowie Leukämien der T-Zellreihe [27]. Auch bestimmte B-ALL-Subgruppen sind mit einem erhöhten Risiko für eine ZNS-Leukämie assoziiert, dazu gehören Patientinnen/Patienten mit einer E2A-PBX1 ($t(1;19)$) oder BCR-ABL1 ($t(9;22)$) Translokation sowie Betroffene mit einem *Mixed lineage leukemia* (MLL)-Gen-Rearrangement [28–30].

Das ZNS, bestehend aus dem Gehirn und dem Rückenmark, wird von drei Bindegewebsschichten, den Meningen, umhüllt. Diese setzen sich aus der äußeren Dura mater sowie den Leptomeningen, bestehend aus der mittleren Arachnoidea und der inneren Pia mater, zusammen und stellen den zentralen Ort des leukämischen Befalls des ZNS dar [31]. Zwischen der Arachnoidea und der Pia mater befindet sich der mit Liquor gefüllte Subarachnoidalraum, der von den arteriellen und venösen Hirn- und Rückenmarksgefäßen durchzogen wird und dem Schutz und der Versorgung des ZNS dient. Unter physiologischen Bedingungen kontrolliert ein komplexes Barriersystem, an den Schnittstellen der Gefäße, den Ein- und Austritt von Zellen und

Molekülen und dient so der Versorgung und dem Schutz des ZNS. Drei dieser Barriersysteme sind mit der leukämischen ZNS-Infiltration assoziiert: die endotheliale Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Leptomeningen-Schranke auf der Oberfläche der Pia mater und die Blut-Liquor-Schranke im Plexus choroideus [32]. Aber auch eine Infiltration von Leukämiezellen über die Lymphgefäße des Gehirns sowie über Gefäße, die den Schädel und die Hirnhäute durchqueren und in den Subarachnoidalraum gelangen, sind beschrieben [33,34]. Vermutlich dient das ZNS den leukämischen Zellen als immunologischer Rückzugsort, da hier ein Mangel an Immunzellen vorliegt [35]. Außerdem können therapeutische Wirkstoffe, wie Antikörper und Chemotherapeutika, die Barriersysteme des ZNS meist nicht überqueren. Daher ist es notwendig, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die einen sicheren Transport ins ZNS gewährleisten und dort Tumorzellen direkt eliminieren können.

1.2. Gezielte Therapiestrategien bei der BCP-ALL

Dank des Fortschritts bei der Diagnostik und des vertiefenden Verständnisses der genetischen Charakteristika der ALL konnten verschiedene Wirkstoffe entwickelt werden, die gezielt auf spezielle Mutationen oder Alterationen von Signalwegen wirken. Solche Therapien könnten langfristig angewendet werden, um die Intensität unspezifischer Chemotherapien zu verringern, bei gleichzeitiger Verbesserung der Prognose. Diese neuen Wirkstoffe werden üblicherweise mit den konventionellen Therapien kombiniert. Eine Gruppe stellen hier kleine Wirkstoffmoleküle (*small inhibitory molecules*) dar. Diese greifen in den Stoffwechsel der Tumorzellen ein, indem sie zelluläre Strukturen inhibieren. Dazu zählen Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Imatinib-Mesylat bei BCR-ABL-positiver-ALL), Proteasom-Inhibitoren (z.B. Bortezomib) oder Inhibitoren von anti-apoptotischen Molekülen (z.B. Venetoclax zur *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2)-Inhibition) [35–38]. Eine weitere Option Tumorzellen gezielt zu zerstören ist die Anwendung von Immuntherapien, die sich über ihre hohe Spezifität und die Vermittlung verschiedener (Tumor-) zelltoxischer Effektormechanismen auszeichnen. Beispiele für Immuntherapien, die bei der BCP-ALL zum Einsatz kommen sind die chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (*chimeric antigen receptor*, CAR-T-Zellen), der bispezifische Antikörper (*bispecific T-cell engager*, BiTE) Blinatumomab und das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Inotuzumab-Ozogamicin [36–40].

1.2.1. Aufbau therapeutischer Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Igs) genannt, sind große Proteine, die von Plasmazellen gebildet werden und einen wichtigen Bestandteil der erworbenen humoralen Immunantwort darstellen. Sie setzen sich aus zwei identischen schweren Ketten (vom Typ α , β , γ , ϵ oder μ) und zwei identischen leichten Ketten (vom Typ κ oder λ) zusammen, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Entsprechend der Struktur der schweren Kette werden die Antikörper im Menschen in fünf Klassen eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, wobei diese in weitere Subklassen unterteilt werden können. Die vorherrschende Klasse der im Serum vorliegenden Antikörper stellen die IgG-Antikörper dar [41,42]. Auch therapeutisch werden hauptsächlich IgG-Antikörper eingesetzt, da diese die höchste Plasmaretentionszeit im Vergleich zu den anderen Ig-Klassen aufweisen. Die Antikörperketten setzen sich aus unterschiedlichen variablen (*variable*, V) und konstanten (*constant*, C) Domänen zusammen. Die schweren Ketten der IgGs sind aus einer variablen Domäne (V_H) sowie drei konstanten Domänen (C_{H1-3}) aufgebaut, während die leichten Ketten neben einer variablen Domäne (V_L) nur eine konstante Domäne (C_L) besitzen (Abb. 1.2). Antikörper im IgG-Format besitzen zwei identische Antigen-bindende Domänen, in denen die hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs) die Antigenbindung vermitteln. Die unterschiedlichen Antigen-spezifitäten sind Folge der Sequenzunterschiede der variablen Region. Die Antigenbindung erfolgt über nicht kovalente Wechselwirkungen, die wirken, wenn die Bindestellen von Antikörper und Antigen komplementär zueinander sind. Die variablen Domänen der schweren und leichten Kette bilden zusammen mit der C_L und der C_{H1} Domäne das F_{ab} -Fragment (*fragment antigen binding*). Neben den beiden F_{ab} -Fragmenten, besitzen IgG-Antikörper ein kristallisierendes Fragment (*fragment crystallizable*, F_c), welches sich aus den Domänen C_{H2} und C_{H3} der beiden schweren Ketten zusammensetzt und an zellassoziierte $Fc\gamma$ -Rezeptoren ($Fc\gamma R$) bindet (Abb. 1.2). Der F_c -Teil ist über eine Gelenkregion (*hinge*), die sich zwischen der C_{H1} und C_{H2} Domäne befindet, flexibel mit den F_{ab} -Fragmenten verbunden (Abb. 1.2) [42].

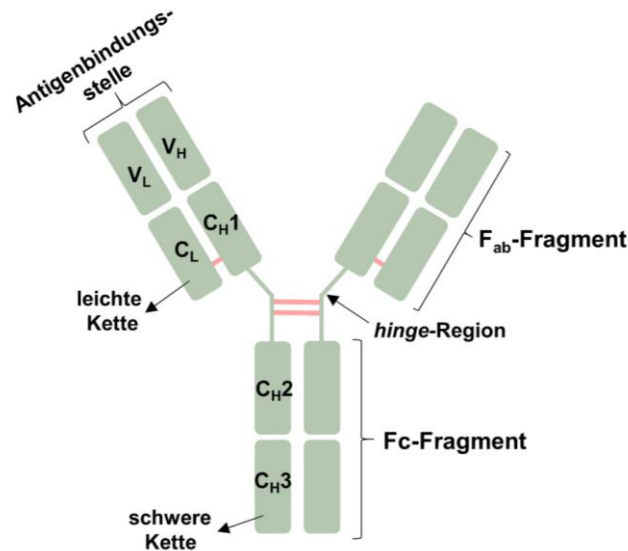


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines IgG1-Antikörpers. IgG1-Antikörper setzen sich aus zwei identischen leichten und schweren Ketten zusammen, die untereinander mit Disulfidbrücken verbunden sind (rote Linien). Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne und die schweren Ketten aus einer variablen (V_H) und drei konstanten (C_{H1-3}) Domänen. Die variablen Domänen V_L und V_H vermitteln die Antigenbindung. IgG1-Antikörper lassen sich in zwei Fragmente unterteilen, das F_{ab} -Fragment bestehend aus V_L , C_L , V_H und C_{H1} und das Fc-Fragment bestehend aus den C_{H2} und C_{H3} Regionen beider schweren Ketten. F_{ab} -Fragment und Fc-Teil sind über die Gelenkregion (*hinge*) flexibel miteinander verbunden. C: *constant*; V: *variable*; H: *heavy*; L: *light*; F_{ab} : *fragment antigen binding*; Fc: *fragment crystallizable* (modifiziert nach Liu, 2018 [43]).

IgGs können in vier Subklassen unterteilt werden (IgG1-4), die sich hinsichtlich ihrer Anzahl an Disulfidbrücken, der Gelenkregion und der Bindung an Fc-Rezeptoren und damit in ihrer Wirkweise unterscheiden [44]. Als einziger Vertreter der Igs können maternale IgG-Antikörper über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) von der Plazenta zum Fötus transportiert werden. Neben der Vermittlung der passiven Immunität spielt der FcRn auch eine wichtige Rolle bei der Homöostase der IgG-Moleküle. Diese binden aufgrund des sauren pH-Wertes an FcRn im Endosom, wodurch die Degradation der Antikörper im Lysosom verhindert wird. Die IgG-Antikörper werden so zurück zur Zelloberfläche transportiert und dissoziieren aufgrund der pH-Änderung zurück in den Blutkreislauf. In der Folge verlängert sich deren Plasmahalbwertszeit, womit eine konstant hohe Antikörper-Konzentration im Blut gefördert wird [43,45].

1.2.2. Antikörper-basierte Immuntherapien

Antikörper stellen eine heutzutage fest etablierte Wirkstoffklasse dar, die vorwiegend bei der Therapie maligner Erkrankungen sowie von System- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird [46]. Über ihre spezifische Bindung an

entsprechende Zielstrukturen (Antigene) wirken sie selektiv und zielgerichtet und gehen daher oft mit deutlich reduzierteren Nebenwirkungen im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie einher.

Der Grundstein der heutigen Antikörpertherapie wurde Ende des 19. Jahrhunderts gelegt, als Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato entdeckten, dass Mäuse, die an Tetanus erkrankten, durch einen im Serum von Tetanus-immunen Kaninchen vorhandenen, antitoxischen Aktivität geheilt werden können [47]. Zusammen mit Paul Ehrlich, dem Begründer der Seitenkettentheorie - ein erstes immunologisches Konzept, das die Bildung spezifischer, löslicher Antitoxine (Antikörper) erklärte - konnten große klinische Erfolge gegen Tetanus- und Diphtherie-Infektionen erzielt werden [48].

Die über Blutseren gewonnenen Antikörper sind polyklonalen Ursprungs und stellen so ein unspezifisches Gemisch an Antikörpern dar. Erst mit der Entwicklung der Hybridomtechnik war es möglich, spezifische monoklonale Antikörper herzustellen, die gezielt therapeutisch einsetzbar waren. Sie beruht auf der Fusion einer Myelom-Zelllinie mit Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten aus immunisierten Tieren. Dadurch entsteht eine hybride Zelle (Hybridoma) die unbegrenzt spezifische Antikörper produziert [49].

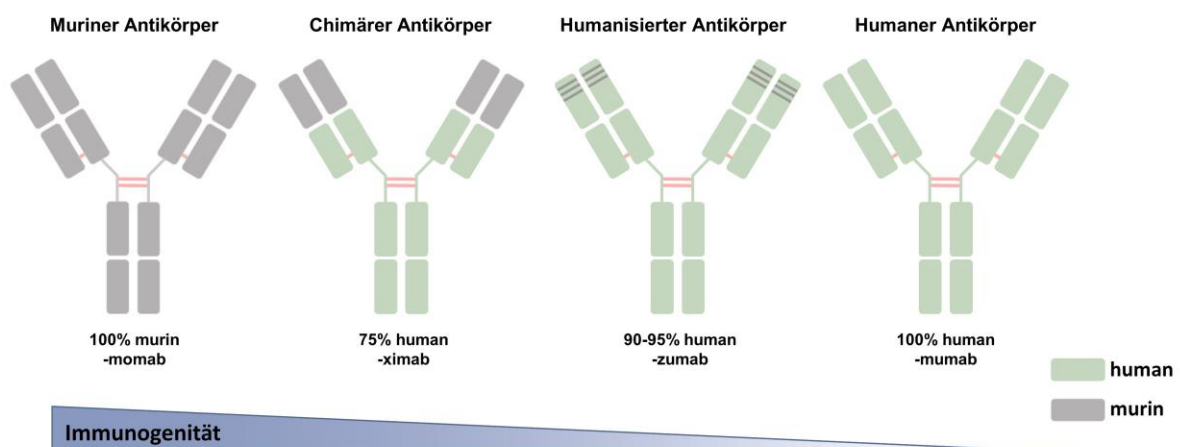


Abbildung 1.3: Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und deren immunogenes Potential. Monoklonale Antikörper wurden im Verlauf der Zeit so verändert, dass deren murinen Anteile (grau) reduziert und die humanen Anteile (grün) erhöht wurden. Je größer der humane Anteil der Antikörper ist, desto geringer ist dessen Immunogenität im Menschen (modifiziert nach Silberstein et al., 2015 [50]).

Bei dem ersten klinisch eingesetzten monoklonalen Antikörper, Muromonab-CD3 (OKT3), einem Maus-Antikörper gegen humanes CD3, wurden zunächst vielversprechende klinische Erfolge bei der Behandlung akuter Transplantatabstoßungen erzielt [51]. Jedoch kam es im Verlauf der Behandlung über die Bildung humaner Anti-Maus-Antikörper zu einer Neutralisierung des therapeutischen Effekts [52]. Zudem interagieren murine Antikörper kaum mit humanen Effektorzellen, was zu einer reduzierten Effektivität führt [53]. Um dies zu umgehen, wurden chimäre Antikörper (Abb. 1.3) entwickelt. Diese besitzen statt der murinen die entsprechende humane konstante Region, während die variable, für die spezifische Antigenbindung essentielle Region, unverändert bleibt [54]. Ein weiterer Fortschritt bei der Entwicklung war die Humanisierung von Antikörpern (Abb. 1.3), bei denen lediglich die für die Antigenerkennung zuständigen CDRs murinen Ursprungs sind [55]. Um die Immunogenität der Antikörper weiter zu reduzieren und so die therapeutische Effizienz zu steigern, wurden humane Antikörper ohne murine Anteile entwickelt (Abb. 1.3). Diese lassen sich zum einen über die Phagen-Display-Technologie herstellen, bei der variable Antikörper-Fragmente gewünschter Spezifität aus humanen Antikörperbibliotheken isoliert und anschließend mit Sequenzen konstanter Antikörper-Domänen zu vollständigen Antikörpern fusioniert werden [56]. Zum anderen können humane Antikörper auch durch die Immunisierung transgener Mäuse hergestellt werden, die humane Immunglobulin-Gene tragen [57]. Bisher (Stand Ende 2021) wurden 100 verschiedene Antikörper für die klinische Verwendung zugelassen, 41 davon für onkologische Erkrankungen [58]. Dominierend sind hier Antikörper im IgG1-Format, da diese effizient Effektorfunktionen vermitteln und mit einer langen Plasmahalbwertszeit assoziiert sind [44].

1.2.3. Wirkmechanismen therapeutischer IgG1-Antikörper

Die Wirkmechanismen von Antikörpern sind vielfältig und können zum einen direkt über die Bindung des F_{ab}-Fragments oder zum anderen indirekt durch die Fc-Domäne vermittelt werden [59]. Über die spezifische Antigenbindung der Antikörper können Signalmechanismen in den Zielzellen blockiert oder stimuliert und so die Zellproliferation inhibiert oder die Apoptose der Zelle induziert werden. Antikörper sind in der Lage, die Signalwege innerhalb der Tumorzelle zu unterbrechen, indem sie die Rezeptor-Liganden-Interaktion auf der Oberfläche der Tumorzellen manipulieren oder

Zytokine neutralisieren, die für das Zellwachstum und die Proliferation entscheidend sind (Abb. 1.4A). Bekannte Zielrezeptoren therapeutischer Antikörper auf Tumorzellen sind beispielsweise der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) oder der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2). Beide liegen bei verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert oder konstitutiv aktiviert vor und führen so zum unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen [60,61]. Cetuximab, ein klinisch erprobter chimärer EGFR-spezifischer, monoklonaler IgG1-Antikörper, induziert in Tumorzellen einen Zellzyklusarrest sowie die Apoptose, indem dieser die Bindung des Liganden behindert [62]. Trastuzumab, ein HER2-gerichteter humanisierter IgG1-Antikörper, hingegen inhibiert die Rezeptordimerisierung und führt zur Herunterregulierung von HER2, indem es den endozytotischen Abbau der Rezeptors induziert [63]. Direkte zytotoxische Effekte können auch über die Kreuzvernetzung des Zielantigens (Abb. 1.4A), wie CD20 oder CD33, induziert werden, indem nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert werden, die anti-proliferative oder pro-apoptotische Signalwege in den Zielzellen auslösen [64,65]. Zusätzlich sind Antikörper beschrieben, die Todesrezeptoren (*tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand receptor*, TRAIL-R) auf der Zelloberfläche erkennen und so direkt die Apoptose der Zelle induzieren können. Dazu gehören vor allem agonistische Antikörper gegen TRAIL-R1 und TRAIL-R2, diese zeigten in klinischen Studien jedoch wenig therapeutische Effizienz [66–68].

Die indirekten Wirkmechanismen von Antikörpern beruhen auf den Immunreaktionen, welche über die Fc-Region des Antikörpers ausgelöst werden und zur Eliminierung der Zielzelle führen. Nach F_{ab}-vermittelter Opsonisierung des jeweiligen Antigens kommt es zur Fc-vermittelten Bindung der FcγR auf der Oberfläche von Effektorzellen, wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder zur Interaktion der Fc-Domäne mit Faktoren des Komplementsystems. Auf humanen Leukozyten werden drei Arten von FcγR exprimiert: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) mit den Subtypen FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc sowie FcγRIII (CD16) mit den Subtypen FcγRIIIa und FcγRIIIb [69].

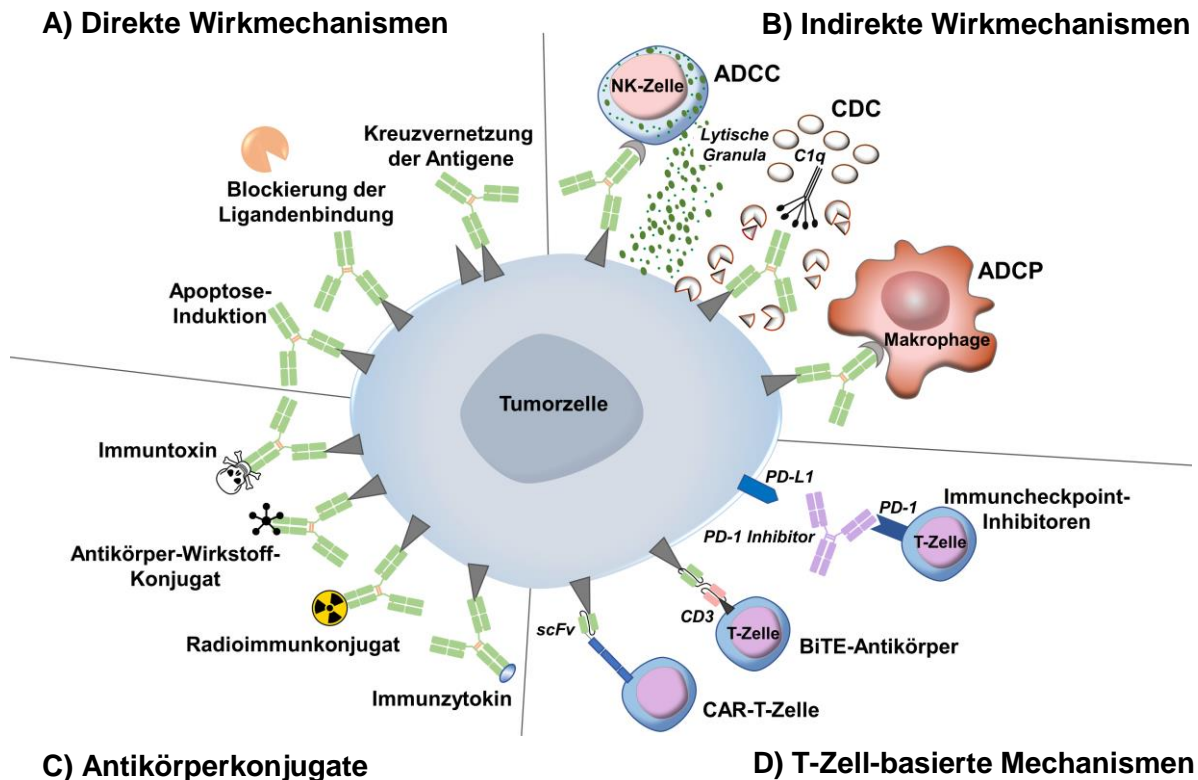


Abbildung 1.4: Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper. A) Direkte Wirkmechanismen von Antikörpern werden über deren F_{ab}-Fragment vermittelt. Dabei werden anti-proliferative oder pro-apoptotische Signale induziert, die Interaktion zwischen einem Liganden und dem Rezeptor auf der Tumorzelle blockiert oder die Kreuzvernetzung des Zielantigens induziert. B) Über das F_c-Fragment können Antikörper auch indirekt wirken, indem sie an Fcγ-Rezeptoren von Immuneffektorzellen binden und diese aktivieren. Die Tumorzelle wird dann über Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) eliminiert. Über die Interaktion der Fc-Domäne mit der C1q Untereinheit des Komplementfaktors 1 kann eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) induziert werden. C) Um toxische Substanzen, wie Zytostatika, Radioisotope, Toxine oder Zytokine gezielt zu den Tumorzellen zu dirigieren, können diese an Antikörper konjugiert oder genetisch fusioniert werden. D) Zu den T-Zell basierten Immuntherapien gehören z.B. i) CAR-T-Zellen: Hierbei handelt es sich um genetisch modifizierte T-Zellen mit synthetischen Antigen-spezifischen Rezeptoren; ii) BiTE-Antikörper: Sie bestehen aus zwei scFv-Fragmenten, welche T-Zellen über die Bindung an CD3 aktivieren und iii) Immuncheckpoint-Inhibitoren: Sie wirken indem sie T-Zell hemmende Rezeptoren blockieren und somit eine T-Zell-Immunabwehr ermöglichen. NK-Zelle: natürliche Killerzelle, PD-1: *programmed cell death protein 1*; PD-L1: *PD-ligand 1*; scFv: *single chain variable fragment*; CAR-T-Zelle: *chimeric antigen receptor T-Zelle*; CD3: *cluster of differentiation 3*; BiTE: *bispecific T-cell engager* (Modifiziert nach Charnasaz et al., 2017 [70]).

Abhängig von den auf der Effektorzelle exprimierten FcγR und der Subgruppe des Antikörpers kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Effektorfunktionen. Über die Bindung eines Antikörpers an den FcγRIIIa von NK-Zellen werden diese zur Zielzelle rekrutiert und aktiviert. Der Tod der Tumorzelle wird über die von den Effektorzellen ausgelöste Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC, Abb. 1.4B) induziert, bei der Granzyme und Perforine (lytische Granula) freigesetzt werden [71]. Die Vermittlung der ADCC stellt beispielsweise einen wichtigen Wirkmechanismus des CD38-Antikörpers Daratumumab dar [72]. Die Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCP, Abb. 1.4B) wird über FcγR phagozytierender

Zellen, wie Makrophagen vermittelt [73]. Alternativ können Tumorzellen über die Aktivierung des Komplementsystems zerstört werden (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC, Abb. 1.4B). Dabei wird über die Bindung der C1q-Untereinheit des Komplementfaktor 1 an die Fc-Region von IgGs die Komplementkaskade aktiviert, die zur Porenbildung innerhalb der Zellmembran und so zum Tod der Zelle führt [74]. Für die CD20-Antikörper Rituximab und Ofatumumab ist beschrieben, dass die Bindung an C1q und die damit verbundene Aktivierung des Komplements für deren Wirksamkeit von Bedeutung sind [75,76].

Neben Antikörpern, die den Zelltod über direkte und indirekte Wirkmechanismen induzieren können, kommen auch vermehrt therapeutische Antikörper zum Einsatz, die anti-tumorale Effekte über eine T-Zell-basierte Immunreaktionen auszulösen. Dazu gehören z.B. BiTE-Antikörper (Abb. 1.4D). Diese bestehen aus zwei kovalent miteinander verbundenen Antikörper-Einzelkettenfragmenten (*single chain variable fragment*, scFv), die sich aus den Antigen-erkennenden variablen Domänen der leichten und schweren Kette eines Immunglobulins zusammensetzen. Eines der scFv-Fragmente ist dabei gegen ein Tumor-spezifisches Antigen gerichtet, während das andere Fragment den CD3-Rezeptor von T-Zellen binden kann. Dadurch kommt es zu einer Kopplung der malignen Zelle mit der T-Zelle, die daraufhin aktiviert wird und lytische Granula freisetzt, die zum Tod der malignen Zelle führt [77]. So wird der CD19-gerichtete BiTE Blinatumomab bereits zur Behandlung von refraktärer oder rezidivierender B-ALL eingesetzt [36,37,39]. Eine weitere T-Zell-basierte Antitumorstrategie stellen CAR-T-Zellen dar (Abb. 1.4D). Um diese zu generieren werden den Betroffenen zunächst mittels Leukapherese T-Zellen entnommen und diese gentechnisch so verändert, dass sie einen chimären Antigenrezeptoren exprimieren. Dieser besteht aus einem extrazellulären Antigen-spezifischen scFv, fusioniert an eine intrazelluläre Aktivierungsdomäne (ζ -Kette des T-Zell-Rezeptorkomplexes), sowie einer ko-stimulatorischen Domäne, wie CD28 oder CD134. Die CAR-T-Zellen werden *ex vivo* expandiert und in die Patientinnen/Patienten reinfundiert wo sie nun maligne Zielzellen erkennen und abtöten können [78,79]. CD19-CAR-T-Zellen zeigen vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Patientinnen/Patienten mit refraktärer und rezidivierender B-ALL [38]. Neben BiTEs und CAR-T-Zellen stellen Immuncheckpoint-Inhibitoren eine weitere T-Zell-basierte Antitumor-Therapiestrategie dar. Diese wirken auf Signalwege, die in der Immunüberwachung eine Rolle spielen und stellen so die Tumorzell-Erkennung durch

das Immunsystem wieder her [80]. Zu den Immuncheckpoint-Inhibitoren gehören Antikörper wie Pembrolizumab und Nivolumab, die gegen den inhibitorischen T-Zell Rezeptor PD-1 (*programmed cell death protein 1*) gerichtet sind. Diese verhindern die Bindung an PD-L1 (*PD-Ligand 1*) auf Tumorzellen und bewirken so die Inhibition T-Zell-supprimierender Signale. Beide Antikörper sind bereits für mehrere Tumorentitäten, einschließlich hämatologischer Tumorarten zugelassen, z.B. zur Behandlung von rezidivierenden oder refraktären Hodgkin Lymphomen [81].

1.2.4. Antikörperkonjugate

Neben den direkten und indirekten Wirkmechanismen werden die spezifischen Eigenschaften der Antikörper auch dafür genutzt, um Wirkstoffe wie Zellgifte, Toxine oder Zytostatika gezielt zu malignen Zellen zu transportieren (Abb. 1.4C). Diese Substanzen sind sehr effektiv bei der Zerstörung von Tumorzellen, können jedoch auch toxisch auf gesundes Gewebe wirken. Über die Konjugation an Antikörper kann die systemische Toxizität abgeschwächt werden, da sie selektiv an Antigen-exprimierenden Zellen wirken. Ein wichtiger Aspekt bei der Generierung von Immunkonjugaten ist die Wahl eines geeigneten Linkers. Dieser hat Einfluss auf die Effektivität und Pharmakokinetik des Immunkonjugats. Dabei kann im Wesentlichen zwischen spaltbaren und nicht-spaltbaren Linkern unterschieden werden [82].

Radioimmunkonjugate erlauben es, radioaktive Isotope an Tumorzellen zu transportieren und dort die gebundene Tumorzelle sowie dessen direkte Umgebung hochenergetischen ionisierenden Strahlen auszusetzen (Abb. 1.4C). Bei der Behandlung refraktärer follikulärer Non-Hodgkin Lymphom Patientinnen/Patienten erzielte das seit 2002 zugelassene Ibritumomab-Tiuxetan, ein muriner CD20-gerichteter mit ⁹⁰Yttrium konjugierter Antikörper, hohe Ansprechraten [83]. Eine weitere Gruppe der Immunkonjugate stellen Zytostatika-konjugierte Antikörper dar (Abb. 1.4C). Diese sind mit Substanzen gekoppelt, die den Tod der Tumorzelle auslösen, indem sie entweder die Mitose über die Inhibition der Mikrotubuli hemmen oder die DNA schädigen. Ein Beispiel für diese Gruppe der Antikörperkonjugate ist Brentuximab-Vedotin, ein CD30-gerichteter Antikörper, der kovalent über einen Linker an den Tubulin-bindenden Wirkstoff Monomethyl Auristatin E (MMAE) gebunden ist [84]. Dieser zeigte hohe klinische Effizienz bei der Behandlung von rezidivierenden oder refraktären Hodgkin Lymphomen [85]. Weiterhin gibt es Antikörper, die an Toxine

wie z.B. Ricin A oder Pseudomonas Exotoxin A (ETA) fusioniert sind (Abb. 1.4C). Ein Beispiel für ein bereits bei der Behandlung von Patientinnen/Patienten mit einer Haarzell-Leukämie zugelassenes Immuntoxin ist Moxetumomab-Pasudotox, ein CD22-gerichteter scFv-Antikörper gekoppelt an Pseudomonas ETA [86]. Alternativ können Antikörper auch an Zytokine konjugiert werden (Abb. 1.4C). Diese Immunzytokine zeigen prä-klinisch eine hohe therapeutische Effizienz. Die mit einer systemischen Behandlung mit Zytokinen wie Interleukin-2 oder TNF α in Verbindung stehenden Nebenwirkungen konnten durch die gezielte Behandlung reduziert werden, da die Zytokine am Tumorgewebe angereichert werden und die Immunreaktion so lokal stattfindet [87]. Auch Immunkonjugate mit TRAIL zeigten in prä-klinischen Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse [88–91].

1.3. Zielstrukturen auf der Oberfläche von Leukämiezellen der B-Zellreihe

Um monoklonale Antikörper gezielt und effizient bei der Therapie von Tumorerkrankungen einsetzen zu können, ist es essentiell, geeignete Zielstrukturen auf den malignen Zellen zu identifizieren. Verschiedene Kriterien müssen erfüllt sein, um die spezifische anti-tumorale Wirkung zu gewährleisten. Wichtig für den Therapieerfolg ist unter anderem das Expressionsprofil des Zielantigens. Dies zeichnet sich zum einen durch eine hohe und homogene Antigenexpression innerhalb der Tumorzellpopulation aus. Zum anderen sollte die Zielstruktur möglichst nicht auf gesunden Zellen exprimiert werden, damit Nebenwirkungen vermieden werden können. Daher sind vor allem Zielstrukturen von Vorteil, die ausschließlich auf Tumorzellen zu finden sind [92]. Besonders interessant sind hier Oberflächenmarker, die von Tumorstammzellen oder Tumorstammzellen exprimiert werden, da die Depletion solcher Zellen das Risiko einer Rezidivbildung vermindern kann [93]. Weiterhin sollten Zielstrukturen nicht auf physiologischen Stammzellen exprimiert werden, da diese nach der Behandlung das hämatopoetische System neu aufbauen sollen. Abhängig von der therapeutischen Wirkweise des Antikörpers sind die Anforderungen an das Antigen und das Antikörperformat entscheidend. Beispielsweise ist eine stark internalisierende Zielstruktur essentiell für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, da hier die fusionierten Substanzen wie MMAE erst in der Zelle wirksam sind [94]. Für Antikörper, die über den Fc-Bereich Effektorfunktionen vermitteln sollen, wäre eine solche Zielstruktur hingegen nachteilig.

Differenzierungsantigene (*cluster of differentiation*, CD) stellen wichtige Zielstrukturen bei Immuntherapien dar, da sie Zell- und Entitäten-spezifisch exprimiert werden [84]. Aufgrund ihrer exklusiven Expression auf B-Zellen sind beispielsweise CD19, CD20 und CD22 wichtige Zielstrukturen bei B-Zell Neoplasien und ermöglichen die Einteilung der B-Zellen in verschiedene Gruppen und Differenzierungsstadien (Abb. 1.5) [95].

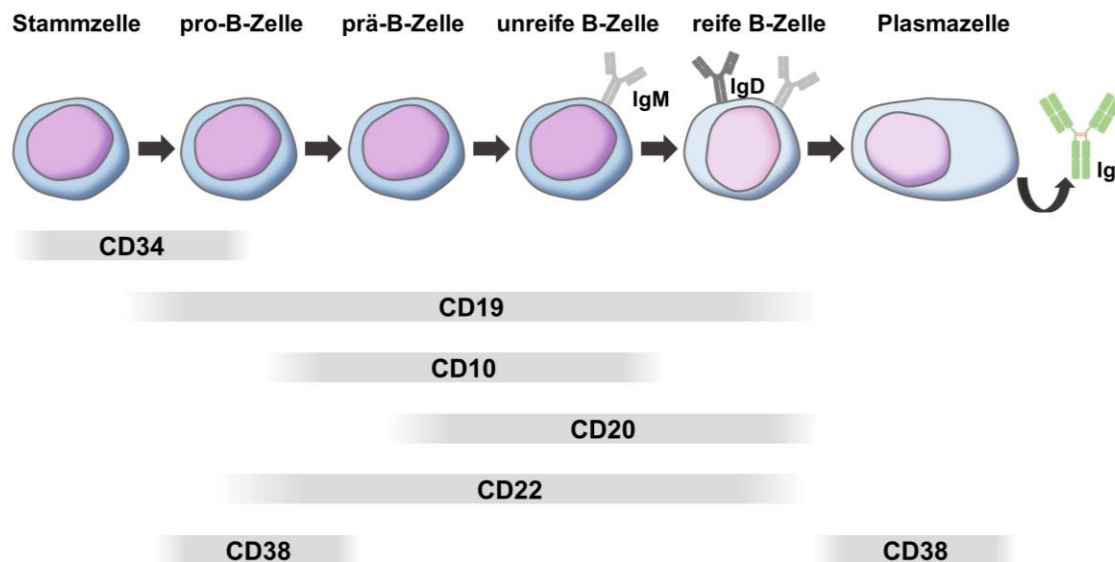


Abbildung 1.5: Immunphänotypische Marker bei der B-Zell-Entwicklung. Linearer Verlauf der B-Zell-Differenzierung, bei der die unterschiedlichen Entwicklungsstadien durch verschiedene Differenzierungsmarker gekennzeichnet sind, die sich als Zielstrukturen für Antikörper-basierte Immuntherapien eignen. Ig: Immunglobulin, CD: *cluster of differentiation* (Modifiziert nach Schroeder et al., 2019 [95]).

Etwa 30-50 % der Patientinnen/Patienten mit einer B-ALL exprimieren CD20 auf der Oberfläche der Tumorzellen, was gleichzeitig mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [96]. Der chimäre CD20-gerichtete Antikörper Rituximab, der seit 1997 für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen ist, zeigte in Kombination mit Chemotherapie vielversprechende Erfolge bei der Behandlung von rezidivierender oder refraktärer B-ALL bei Erwachsenen [97]. Trotz nachweislicher Erfolge bei der Behandlung einiger B-Zell-Neoplasien zeigen sich für Rituximab und andere CD20-gerichtete Antikörper eine Vielzahl an Limitationen. So kommt es teilweise zu einem Therapie-assoziierten Verlust der CD20-Expression oder zur Entwicklung einer Rituximab-Resistenz [98]. Zudem wird CD20 erst ab dem prä-B-Zellstadium exprimiert und ist so nicht anwendbar bei Betroffenen, deren Leukämie-Zellen in einem früheren Differenzierungsstadium arretiert sind (Abb. 1.5).

CD22 wird hingegen bei etwa 90 % der Patientinnen/Patienten mit einer B-ALL exprimiert und ist mit einer schnellen Internalisierungsrate assoziiert, was es zu einem vielversprechenden Kandidaten für Immunkonjugate macht [99]. Klinische Erfolge bei der Behandlung von rezidivierender oder refraktärer BCP-ALL zeigte Inotuzumab-Ozogamicin, ein CD22-gerichteter Antikörper konjugiert an Calicheamicin, das über DNA-Doppelstrangbrüche die Apoptose der Zelle bewirkt [40]. Die Behandlung mit Inotuzumab-Ozogamicin zeigte jedoch eine erhöhte Hepatotoxizität im Vergleich zur Standardtherapie [100].

Anders als CD20 wird CD19 schon in sehr frühen Stadien der B-Zell-Differenzierung exprimiert (Abb. 1.5). Bereits auf pro-B-ALL-Zellen kann eine Expression nachgewiesen werden, die erst bei der Plasmazelldifferenzierung verloren geht (Abb. 1.5). CD19 ist somit einer der verlässlichsten B-Zell-Marker, der sowohl auf gesunden und neoplastischen Zellen als auch auf follikulären Dendritischen Zellen exprimiert wird [101–103]. CD19 wird bei über 90 % der pro-B-ALL-Patientinnen/Patienten exprimiert, dabei auch auf CD20- oder CD22-negativen Zellen [104]. Auf hämatopoetischen Stammzellen wird CD19 hingegen nicht exprimiert, was es zu einem besonders attraktiven Antigen macht [105]. CD19 ist ein etwa 95 kDa großes Typ I Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie. Der zytoplasmatische Teil des Proteins trägt neun konservierte Tyrosin-Reste, die für potentielle Phosphorylierungen und somit der Signalübertragung innerhalb der Zelle verantwortlich sind [106,107]. Auf reifen B-Zellen liegt CD19 im Ko-Rezeptor-Komplex mit den Membranproteinen CD21 (CR2), CD81 (TAPA-1) und Leu13 vor [108–110]. Kommt es zur Kreuzvernetzung des Ko-Rezeptor-Komplexes mit dem B-Zell-Rezeptor (BZR), wird die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von CD19 durch BZR-assoziierte Tyrosinkinase der Src-Familie wie Lyn und Fyn oder Syk (*spleen tyrosine kinase*) ausgelöst und so regulatorische Signale, die für die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-lymphoiden Zellen benötigt werden, vermittelt [107,111,112]. Dabei reguliert der Ko-Rezeptor-Komplex die Reizschwelle der Aktivierbarkeit des BZR [113]. In transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CD19 in den B-Lymphozyten zu einer verstärkten Responsivität gegenüber transmembranen Signalen führte. Zusätzlich waren die Immunglobulin-Spiegel im Serum der Mäuse stark erhöht. Im Vergleich dazu zeigten CD19-defiziente Mäuse einen stark reduzierten Serum-Immunglobulin-Spiegel sowie eine reduzierte Signalschwelle der B-Lymphozyten [114,115]. Patientinnen/Patienten

mit einer fehlenden oder stark reduzierten CD19-Expression entwickeln ebenfalls eine Hypogammaglobulinämie, zeigen eine reduzierte BZR-Aktivierung und sind anfällig für Infektionen [116].

Wie bei CD22 kommt es auch bei CD19 nach Antikörperbindung zur Internalisierung des Antigens, jedoch läuft dieser Prozess hier wesentlich langsamer ab und ist so neben der Verwendung von Antikörperkonjugaten eher für therapeutische Ansätze interessant, die über die Rekrutierung von Effektoren des Immunsystems wirken [117]. Loncastuximab-Tesirin, ein CD19-gerichtetes Immunkonjugat mit dem alkylierenden Pyrrolobenzodiazepine (PBD) Tesirin, zeigte vielversprechende Ergebnisse in einer klinischen Studie mit Patientinnen/Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem großzelligem B-Zell-Lymphom und ist dafür seit April 2021 auch klinisch zugelassen [118,119].

Bislang wurden verschiedene Strategien entwickelt, um CD19 gezielt angreifen zu können. Dazu zählt der bispezifische BiTE-Antikörper Blinatumomab sowie CD19-gerichtete CAR-T-Zellen, die bereits bei refraktärer oder rezidivierender B-ALL eingesetzt werden [36–39]. Trotz guter therapeutischer Erfolge stehen Blinatumomab und die CAR-T-Zelltherapie jedoch mit einigen schweren Nebenwirkungen, wie dem Zytokin-Freisetzungssyndrom sowie Neurotoxizität, in Verbindung [120]. Die limitierte Effizienz nativer CD19-Antikörper kann auch über die Modifikation des Fc-Bereichs des Antikörpers verbessert werden. Dies kann über die Veränderung des Glycosylierungsmusters des Antikörpers oder über das Einführen von Aminosäure (AS)-Substitutionen erfolgen [121]. Diese Modifikationen führen zu einer verbesserten Affinität des Antikörpers an FcγR auf Effektorzellen und somit zu einer effizienteren Rekrutierung von Effektorzellen. Der monoklonale CD19-gerichtete Antikörper Tafasitamab, dessen Fc-Bereich durch die AS-Substitutionen S239D und I332E optimiert wurde, wies *in vitro* eine Steigerung der ADCC und ADCP auf und war *in vivo* wirksam gegen Lymphom-Zellen [122]. Auch in einem prä-klinischen Modell mit BCP-ALL-Xenografts zeigte der Surrogat-Antikörper CD19-DE, eine hohe therapeutische Effizienz, indem es die Phagozytose der Tumorzellen verstärkte [123]. In einer Phase II Studie konnte die gute Verträglichkeit sowie die klinische Aktivität von Tafasitamab bei rezidivierender und refraktärer B-ALL bereits gezeigt werden [124]. Insgesamt sind somit vor allem Antikörper, die nur geringe Effektormechanismen vermitteln, für Optimierungsstrategien von Interesse, da so deren Wirksamkeit und Effizienz gesteigert werden kann.

1.4. Der programmierte Zelltod – Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde 1972 von J. F. Kerr, A. H. Wyllie und A. R. Currie geprägt, die erstmals beschrieben, dass morphologisch unterschiedliche Formen des Zelltods existieren, die essentiell für die Entwicklung und Homöostase von Geweben sind [125,126]. Die Apoptose läuft nach einem definierten Programm ab, das zum gezielten Versterben der Zelle führt, daher spricht man hier vom programmierten Zelltod. Es handelt sich um einen aktiven, ATP-abhängigen, strikt regulierten Prozess, der gewährleistet, dass eine Schädigung benachbarter Zellen verhindert wird [127]. Dabei sind verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle zu beobachten, die mit dem Abrunden und Schrumpfen der Zelle beginnt, wodurch sie sich von den benachbarten Zellen ablöst. Dadurch kommt es zur Verdichtung des Zytoplasmas, der Kondensation des Chromatins und der Fragmentierung der genomischen DNA. Die Plasmamembran bildet blasenförmige Ausbuchtungen, der Zellkern zerfällt und es kommt zur Fragmentierung der Zelle in membranumhüllte Apoptosekörper [128]. Da die Polarität der Zelle verloren geht und nun Phosphatidylserine auf der Außenseite der Membran präsentiert werden, können die apoptotischen Zellen von phagozytierenden Zellen erkannt und aufgenommen werden, wodurch eine inflammatorische Antwort verhindert wird [129].

Die Apoptose ist ein essentieller physiologischer Prozess der Zellbeseitigung, dem eine besondere Bedeutung bei der embryonalen Morphogenese und der Regulation des Immunsystems, z.B. bei der Beseitigung autoreaktiver Thymozyten oder dem Abklingen einer Immunreaktion, zukommt [130,131]. Auch bei der Eliminierung von entarteten Zellen spielt sie eine entscheidende Rolle. Die Suppression der Apoptose ist daher mit der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen assoziiert [132]. Die Dysregulation der Apoptose kann aber auch zu Krankheitsbildern wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson führen, die mit einer verstärkten Apoptose assoziiert sind. [133].

Neben der Apoptose sind auch andere Formen des programmierten Zelltodes bekannt, dazu gehören die Autophagie, die Nekroptose (regulierte Nekrose) und die mitotische Katastrophe, die sich mechanistisch und morphologisch von der Apoptose unterscheiden. Davon abzugrenzen ist die Nekrose als Form des unkontrollierten Zelltodes, bei der es zu umfassenden Zellschäden kommen kann, da im Gegensatz zum programmierten Zelltod eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird [134].

1.4.1. Signalwege der Apoptose

Abhängig vom pro-apoptotischen Stimulus können unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Dabei unterscheidet man zwischen dem extrinsischen Signalweg, der von außen über die Liganden des Todesrezeptors wie TNF α , TRAIL oder FasL (CD95L), induziert wird und dem intrinsischen Signalweg, der durch zellulären Stress wie DNA-Strangbrüche ausgelöst wird. Der extrinsische und intrinsische Signalweg stehen über das pro-apoptotische Protein Bid (*Bcl-2-homology domain (BH3) - interacting death domain agonist*) miteinander in Verbindung und können sich so gegenseitig beeinflussen (Abb. 1.6) [66]. Die Apoptose ist assoziiert mit der Aktivierung von Caspasen, welche als inaktive Pro-Enzyme (Pro-Caspasen) vorliegen, die nach Aktivierung weitere Pro-Caspasen spalten und so eine Caspase-Kaskade auslösen. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Verstärkung der apoptotischen Signalgebung. In der Folge werden eine Reihe zellulärer Proteine, wie Strukturproteine und Proteinkinasen Caspase-abhängig gespalten. Daraus resultiert der Verlust der Zell-Zell-Kontakte, der Arrest des Zellzyklus, die Markierung der Zellen für die Phagozytose sowie die Desintegration der Zelle [135,136].

1.4.1.1. Der intrinsische Signalweg

Neben seiner Funktion als energieproduzierendes Organell ist das Mitochondrium auch wesentlicher Bestandteil der Übermittlung von Todessignalen. Bei der intrinsischen Apoptose, auch mitochondriale Apoptose genannt, erfolgt die Initiation des Zelltods über ein intrazelluläres Signal wie Zell- oder DNA-Schäden. Dieser Prozess kann über verschiedene Stimuli, wie Strahlung, Hypoxie, Zytostatika oder Toxine ausgelöst werden und führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP*) [137,138]. Reguliert wird dieser Prozess maßgeblich durch den Tumorsuppressor p53, der nach DNA-Schädigung aktiviert wird und die Expression pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bax (*Bcl-2-associated X protein*), Noxa oder Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), induziert [139–141]. Die pro-apoptotischen BH3-only Proteine der Bcl-2 Familie Bid und Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) sind in der Lage weitere pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bak (*Bcl-2*

homologous antagonist/killer) zu aktivieren und so deren Oligomerisierung zu induzieren, was zur Bildung einer Pore innerhalb der Membran führt [142,143].

Durch den Verlust der Membranintegrität kommt es zur Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren wie Cytochrom C ins Zytoplasma [144]. Freies Cytochrom C bindet zusammen mit Adenosintriphosphat (ATP) an das monomere Adapterprotein Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), was zur Konformationsänderung des Proteins führt [145]. Unter ATP-Hydrolyse kommt es zur Oligomerisierung von Apaf-1 Proteinen und somit zur Bildung des Apoptosoms. Dadurch wird die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) von Apaf-1 zugänglich für die Pro-Caspase 9, die durch die Bindung autokatalytisch gespalten wird und nun ihrerseits die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert wodurch die Apoptose auslöst wird (zusammengefasst in Abb. 1.6) [145–147].

1.4.1.2. Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird initiiert durch eine apoptotische Signaltransduktionskaskade ausgehend von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Diese Rezeptoren tragen an ihrer zytoplasmatischen Region eine Todesdomäne (*death domain*, DD), die essentiell für die Transduktion des Apoptosesignals ist [148]. Binden die Liganden wie TNF α , TRAIL oder CD95L an ihre Rezeptoren, kommt es zur Oligomerisierung der Todesrezeptoren auf der Zellmembran, was zur Ausbildung des Tod-induzierenden Signalkomplexes (*death inducing signaling complex*, DISC) führt. Innerhalb dieses pro-apoptischen Multiproteinkomplexes wird die Initiator-Caspase 8 aktiviert, indem sie über die Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) des Adapterproteins FADD (*Fas-associated protein with death domain*) an die DD der Todesrezeptoren bindet [149]. Über die räumliche Nähe der Pro-Caspase 8 innerhalb des DISC, kommt es zur Dimerisierung und somit zur Steigerung der katalytischen Potenz der Caspase. Dies führt zur Spaltung und somit zur Aktivierung der Caspase 8, die dann in der Lage ist über die Aktivierung weiterer Pro-Caspasen die Caspase-Kaskade auszulösen und so die Apoptose zu initiieren (zusammengefasst in Abb. 1.6) [150].

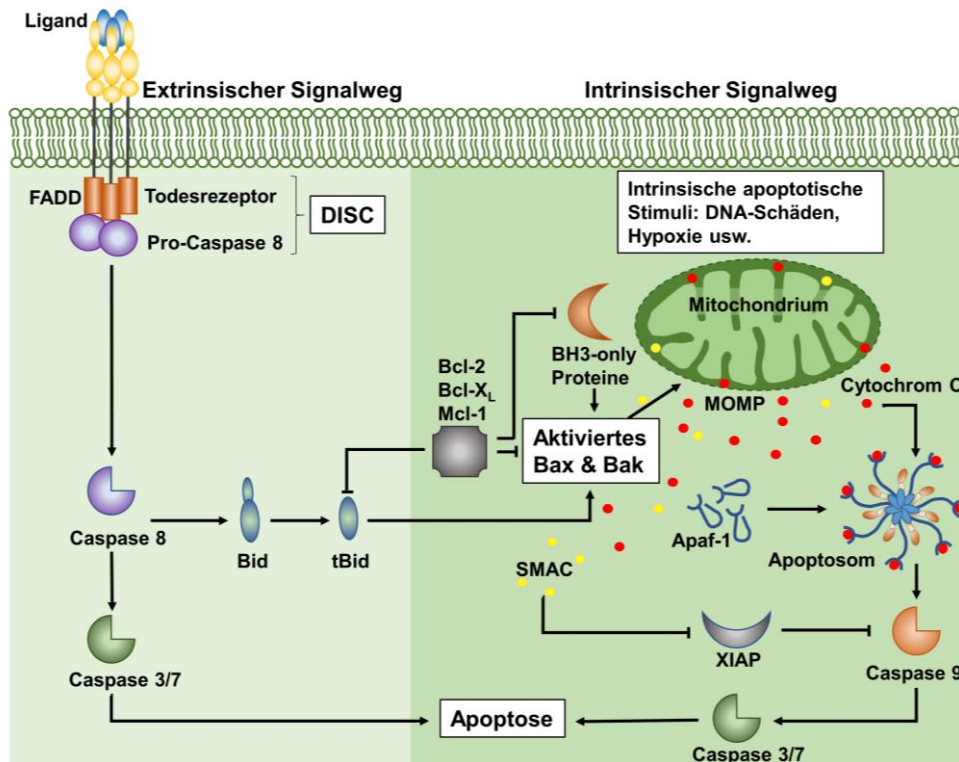


Abbildung 1.6: Die Signalwege der Apoptose. Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird über die Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor initiiert. Dadurch kommt es zur Rezeptor-Oligomerisierung und der Rekrutierung des Adapterproteins FADD sowie der Pro-Caspase 8 und somit zur Ausbildung des DISC. Innerhalb dieses Multi-Proteinkomplexes wird die Initiator-Caspase 8 aktiviert und spaltet ihrerseits die Effektor-Caspasen 3 und 7, was die Apoptose der Zelle einleitet. Der intrinsische Signalweg wird über pro-apoptotische Stimuli wie DNA-Schäden oder Hypoxie induziert. Dadurch werden BH3-only Proteine aktiviert, die wiederum Bax und Bak aktivieren und so zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) führen. Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) können der Aktivierung entgegenwirken, indem sie an Bax oder Bak binden. Durch MOMP kommt es zu Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren SMAC und Cytochrom C. Cytochrom C interagiert mit Apaf-1 und initiiert so die Bildung des Apoptosoms, welches die Aktivierung der Pro-Caspase 9 induziert. Caspase 9 aktiviert daraufhin die Effektor-Caspasen 3 und 7 und führt somit zur Apoptose der Zelle. SMAC vermittelt die Induktion der Apoptose, indem es XIAP, einen Inhibitor der Apoptose blockiert. Über das pro-apoptotische Protein Bid stehen die beiden Apoptosesignalwege miteinander in Verbindung. Bid kann durch die aktive Caspase 8 zu tBid gespalten werden und so den intrinsischen Signalweg aktivieren. DISC: *death-induced signaling complex*; Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*; Bid: *Bcl-2-homology domain (BH3)-interacting death domain agonist*; tBid: *truncated Bid*; Mcl-1: *Myeloid cell leukemia-1*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bak: *Bcl-2 homologous antagonist/killer*; MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*; Apaf-1: *apoptotic protease-activating factor-1*; SMAC: *second mitochondria-derived activator of caspase*; XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*. (Modifiziert nach Ichim und Tait, 2016 [151]).

1.4.2. TRAIL und seine Signalwege

Ein wichtiger Vertreter der Todesrezeptorliganden ist TRAIL, dieser zählt zur Familie der TNF-Superfamilie und wurde 1995 basierend auf der Sequenzhomologie der extrazellulären Domäne von TNF α und CD95L, in zwei unabhängigen Studien, identifiziert [152,153]. TRAIL ist ein Typ II Transmembranprotein (memTRAIL), dessen extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten werden kann und dann als löslicher Ligand vorliegt (sTRAIL) [154]. Ähnlich wie andere TNF-Familienmitglieder formt TRAIL Homotrimer, die eine Kreuzvernetzung der Rezeptormoleküle und somit die

Aktivierung der Signalkaskade gewährleisten [155]. Essentiell für die Stabilität und die optimale biologische Aktivität des Trimers ist dabei ein Cystein²³⁰-gebundenes Zinkatom an jedem TRAIL-Monomer innerhalb des trimeren Liganden [156]. Für TRAIL ist beschrieben, dass es zwei verschiedene Arten von Rezeptoren binden kann. Dazu zählen die agonistischen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) und die antagonistischen Köder-Rezeptoren (*Decoy-Rezeptoren*) TRAIL-R3 und TRAIL-R4 sowie der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG). Von diesen Rezeptoren sind nur TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in der Lage die Apoptose zu induzieren. Die anderen Rezeptoren können aufgrund einer fehlenden bzw. nicht funktionsfähigen Todesdomäne keine Apoptose vermitteln [157–162]. Im murinen System ist bislang nur ein TRAIL-R bekannt, der Sequenzhomologien mit dem humanen TRAIL-R1 (43 %) und TRAIL-R2 (49 %) aufweist [163]. Ebenfalls sind zwei murine Köder-Rezeptoren beschrieben, die jedoch keine Sequenzähnlichkeit zu den humanen Rezeptoren aufweisen [164].

Ausgehend vom Signalweg, der nach Ligandenbindung ausgelöst wird, können bei der über die Todesrezeptoren induzierte Apoptose zwischen zwei Zelltypen unterschieden werden [163]. In Typ I-Zellen ist die DISC-Aktivierung effizient genug, um genügend Pro-Caspase 8 Moleküle zu aktivieren und so die Induktion der Apoptose zu gewährleisten. Im Vergleich dazu ist die Rekrutierung von Pro-Caspase 8-Molekülen in Typ II-Zellen nicht hinreichend, um die Caspase-Kaskade zu aktivieren. In diesem Fall kommt es über die Caspase 8-vermittelte Spaltung des pro-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bid zur zusätzlichen Aktivierung des mitochondrialen Signalweges [165,166]. Neben der Induktion des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges ist TRAIL auch in der Lage, alternative Signalwege zu induzieren, die nicht zum Tod der Zelle führen. So kann TRAIL beispielsweise die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) und der MAP (*mitogen activated kinase*) - Kinasen vermitteln. Die Aktivierung erfolgt, unabhängig von Caspase 8, über die Komplexierung der Proteine TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*), TRAF2 (*TNF-R associated factor 2*) und RIP (*receptor-interacting protein*) [167].

1.4.3. Anwendung von TRAIL bei der Tumorthherapie

Die biologischen Eigenschaften von TRAIL machen es zu einem vielversprechenden Therapeutikum. Zum einen induziert es die Apoptose unabhängig von p53, welches in vielen humanen Krebsentitäten inaktiviert vorliegt. Somit kann TRAIL auch bei Chemo- und Radiotherapie-resistenten Tumoren wirksam sein [168]. Zum anderen zeigte TRAIL *in vivo*, im Vergleich zu den Todesliganden TNF α oder CD95L, kaum Toxizität gegenüber gesunden Zellen, sondern wirkte Tumorzell-spezifisch [169,170].

Eine Vielzahl von Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität sind sensitiv gegenüber rekombinatem sTRAIL [170,171]. Auch in Xenograft-Mausmodellen wies sTRAIL ein hohes therapeutisches Potential für verschiedene Tumorerkrankungen auf wie Kolonkarzinome, Gliome, multiple Myelome und B-Zell Leukämien, vor allem in Kombination mit konventioneller Chemo- oder Radiotherapie [172–177]. Auf Grundlage dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden verschiedene therapeutische Ansätze entwickelt, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: rekombinante TRAIL-Varianten und agonistische TRAIL-R-Antikörper. Dulanermin, ein rekombinantes TRAIL-Molekül, zeigte zwar eine gute Verträglichkeit in klinischen Phase II Studien mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom sowie bei Patientinnen/Patienten mit rezidivierendem Non-Hodgkin Lymphom, jedoch konnte keine signifikant verbesserte Wirksamkeit im Vergleich zur Standardtherapie nachgewiesen werden [178,179]. Auch verschiedene TRAIL-R-Antikörper wurden bereits klinisch getestet, dazu zählt Mapatumumab, ein spezifischer Antikörper gegen TRAIL-R1- sowie verschiedene TRAIL-R2-gerichtete Antikörper wie Conatumumab oder Tigatuzumab. Jedoch zeigte keiner dieser Antikörper eine signifikante anti-tumorale Aktivität in klinischen Phase II Studien [180–182].

Die limitierte Wirksamkeit von sTRAIL ist wahrscheinlich in seiner Instabilität und kurzen Plasmahalbwertszeit begründet [172,183]. Zusätzlich konkurrieren die agonistischen TRAIL-R auf den Tumorzellen mit Köder-Rezeptoren sowie mit TRAIL-R auf gesunden Zellen und verhindern so die Akkumulation von TRAIL-Liganden auf den Tumorzellen [152,158,160,161]. Die genannten Limitationen von sTRAIL können teilweise umgangen werden, indem sTRAIL an Tumor-spezifische Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente fusioniert wird [88,89]. Durch die Fusion sind diese Konstrukte stabiler und weisen eine erhöhte Plasmahalbwertszeit auf, vor allem bei Antikörpern des IgG1-Formats [184]. Zusätzlich akkumulieren sie am Zielantigen auf der

Tumorzelle und führen zu einer Verankerung der TRAIL-Domäne auf der Zelloberfläche. Dadurch verändert sich der Zustand von TRAIL, aus dem löslichen Fusionsprotein wird nach Antigenbindung ein membranständiges TRAIL-Molekül, was zu einer gesteigerten TRAIL-R Aktivierung führt. So kann neben dem TRAIL-R1, der sowohl über sTRAIL als auch über memTRAIL aktiviert werden kann, nun auch TRAIL-R2 aktiviert werden [185]. Diese Strategie stellt durch ihre hohe Tumorspezifität sowie der effizienten Induktion der Apoptose einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar.

1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die BCP-ALL zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Trotz hoher Heilungschancen stehen konventionelle Therapien, aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung, mit einer erhöhten Toxizität in Verbindung. Antikörperbasierte Immuntherapien haben gezeigt, dass sie Tumorzell-spezifisch wirken können und dadurch in der Regel mit weniger Nebenwirkungen verbunden sind. Jedoch zeigen auch diese ein limitiertes Wirkspektrum auf, da es häufig zur Entwicklung von Resistenzen oder Rezidiven kommt. Daher ist die Weiterentwicklung der Antikörper-Therapie von hoher medizinischer Bedeutung. CD19 stellt aufgrund seines vorteilhaften Expressionsprofils auf malignen B-Zellen ein attraktives Antigen dar, jedoch sind native CD19-gerichtete Antikörper mit einer limitierten klinischen Effizienz assoziiert. Ein vielversprechender Ansatz zur Optimierung der therapeutischen Effizienz von Antikörpern ist die Fusion an Wirkstoffe, welche den Tod der Tumorzelle auslösen. Dazu gehört die Fusion an lösliches TRAIL, einem Liganden der Todesrezeptoren, der gezielt die Apoptose von Zellen induzieren kann. Bislang wurden hier hauptsächlich Antikörper-Fragmente, sogenannte scFv-TRAIL Fusionen beschrieben, die mit einer ungünstigeren Pharmakokinetik assoziiert sind als Antikörper des IgG1-Formates. Ebenfalls konnte die Wirksamkeit dieser Fusionsproteine bislang nicht in *patient-derived Xenograft* (PDX)-Modellen validiert werden, was eine wichtige Voraussetzung der prä-klinischen Evaluation darstellt. Als erstes Ziel dieser Arbeit sollte ein CD19-spezifisches TRAIL-Fusionsprotein (CD19-TRAIL) hergestellt und charakterisiert werden. Die grundlegende Hypothese war, dass CD19-TRAIL, über die selektive Bindung an CD19 und der Kreuzvernetzung von TRAIL, effizient BCP-ALL-Zellen eliminiert. Untersucht werden sollten dafür die

Antigen-spezifische Bindung sowie das pro-apoptotische Potential von CD19-TRAIL auf verschiedenen CD19-positiven BCP-ALL-Zellen *in vitro* und *in vivo*. In *in vivo* Experimenten mit PDX-Zellen unterschiedlichen zytogenetischen Hintergrunds sollte zudem die therapeutische Effizienz von CD19-TRAIL untersucht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Wirksamkeit des Fusionsproteins über die Kombination mit Venetoclax (VTX), einem Bcl2- Inhibitor, *in vitro* und *in vivo* optimiert werden kann.

Eine weitere Limitation von Antikörpern ist die Erschließung immunprivilegierter Nischen wie das ZNS, die über verschiedene Barriersysteme geschützt sind. Aufgrund von insensitiven Diagnosemethoden werden alle ALL-Patientinnen/Patienten prophylaktisch mit einer intrathekalen Chemotherapie behandelt, die mit einer hohen Neurotoxizität in Verbindung steht. Daher sind neue Strategien, welche den Transport sowie die spezifische und effiziente Eliminierung der leukämischen Zellen im ZNS bewirken, dringend erforderlich. Einen vielversprechenden Ansatz stellt hier die Entwicklung des Signalpeptids Angiopep2 (An2) dar. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass an An2 fusionierte Moleküle, darunter auch Antikörper, über *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), einem Rezeptor auf Kapillarendothelzellen, mittels Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke transportieren werden können. Bislang wurde hier nur die Wirkung auf Hirnmetastasen solider Tumore untersucht, während Daten für hämatologische Erkrankungen fehlen. Eine grundlegende Hypothese dieser Arbeit war daher, dass CD19-IgG1, fusioniert an An2 (CD19-An2), die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Als zweites Ziel dieser Arbeit sollte dafür ein CD19-An2-Fusionsprotein hergestellt und charakterisiert werden. Dafür sollte *in vivo* untersucht werden, ob CD19-An2 die Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt. Aufgrund des Mangels an Effektorzellen in der ZNS-Nische sollte CD19-An2 zusätzlich an TRAIL (CD19-An2-TRAIL) fusioniert werden und die spezifische Bindung und Apoptoseinduktion, in CD19-positiven BCP-ALL Zelllinien, im Vergleich zu CD19-TRAIL analysiert werden. Letztendlich sollte das therapeutische Potential von CD19-An2-TRAIL im Vergleich zu CD19-TRAIL untersucht werden, vor allem in Hinblick auf die Eliminierung der leukämischen Zellen im ZNS.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Accutase	Invitrogen, USA
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth, D
Agarose	Lonza, CH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, D
Ampicillin	Carl Roth, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, D
Bradford Dye Reagenz	BioRad Laboratories, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Capture Select™ C _H 1-XL Affinity Matrix	Thermo Fisher Scientific, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, USA
CD-CHO Medium/ CD OptiCHO Medium	Life Technologies, USA
CHO CD Efficient Feed A	Life Technologies, USA
⁵¹ Chromium	Hartmann Analytic GmbH, D
Coomassie Brilliant Blue R 250	Carl Roth, D
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, D
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, USA
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, USA
GlutaMax	Thermo Fisher Scientific, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Carl Roth, D
Glycerin	Carl Roth, D

Hefeextrakt	Carl Roth, D
HT-Supplement	Thermo Fisher Scientific, USA
Kaliumbikarbonat	Sigma-Aldrich, USA
Kaliumphosphat	Merck, D
MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec, D
Macrophage Colony-Stimulating factor (MCSF)	PeptoTech, D
MaxCyte-Elektroporationspuffer	Life Technologies, CA, USA
Monocyte Attachment Medium	PromoCell, D
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, D
Natriumazid	Merck, D
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, USA
pHrodo	Thermo Fisher Scientific, USA
Pluronic F-68	Thermo Fisher Scientific, USA
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	BioRad Laboratories, USA
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX	Life Technologies, USA
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Sodium Butyrat	Sigma-Aldrich, USA
Szintillationslösung (OptiPhase Hisafe 3)	PerkinElmer, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, D
Trypsin-EDTA	Life Technologies, USA
Triton-X-100	Merck, D
Tween 20	Merck, D
Venetoclax (VTX)	LC Laboratories, USA
X-Vivo 15 Medium	Lonza, CH
Yeasttolate TC UF	Becon Dickson, USA
Z-VAD	MedChemExpress, USA
2x YT Medium/2x YT Agar	Carl Roth, D
10x /1x PBS	Life Technologies, USA
6 x DNA Ladepuffer	Carl Roth, D

2.1.2. Lösungen und Puffer

Material	Substanz
Erythrozytenlysepuffer	0,82% (v/v) Ammoniumchlorid, 0,1% (v/v) Kaliumbikarbonat, 0,05% EDTA-Lösung (0,5M)
Kryokonservierungsmedium	10% DMSO in FCS
Elutionspuffer	0,1M Gycin, pH 3
MaxCyte Feed-Stock	CHO CD EfficientFeed, 14% (v/v) Yeastolate Stock Solution, 3,5% (v/v) GlutaMax, 12,4% (v/v) Glucose
MACS-Puffer	MACS-Separation Buffer, 0,5% (v/v) humanes Serum Albumin
NP40-Lysepuffer	50mM Tris HCL pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 2% (v/v) NP40
PBA (FACS-Puffer)	1 x PBS, 1% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Natriumazid
Polyacrylamid Sammelgel	11% (v/v) Acrylamid, 48% (v/v) Sammelgelpuffer, 0,1% (v/v) TEMED, 1% (v/v) APS (10% (w/v)),
Polyacrylamid Trenngel	10%: 36% (v/v) Acrylamid, 28% (v/v) Trenngelpuffer 12%: 43% (v/v) Acrylamid, 28% (v/v) Trenngelpuffer + 0,1% (v/v) TEMED, 1% (v/v) APS (10% (w/v))
R10 ⁺ Kulturmedium	RPMI 1640 Glutamax-I Medium, + 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin
Sammelgelpuffer	0,5M Tris, pH 6,8
SDS-Laufpuffer 5 x	125mM Tris, 0,5% (v/v) SDS (20%w/v), 1,25M Gycin
TAE Laufpuffer (50 x)	2M Tris, 50 mM EDTA, pH 8
TBS – Puffer (10 x)	50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,6
TBS-T - Puffer	TBS (1x), 0,1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer	1,94M Gycin, 250mM Tris
Trenngelpuffer	1,5M Tris, pH 8,0
Tris-Puffer	1M Tris, pH 10,0
5 x Ladepuffer (reduzierend)	313mM Tris, 10% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 50% (v/v) Glycerin, 0,5M DTT

2.1.3. Vektoren

Vektor	Hersteller
pSECTag2/Hygro C	Invitrogen, USA
pSEC-HC-MOR208wt-VH pSEC-MOR208-LC pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 pSEC-4D5-LC pSEC-MOR208-LC-Angiopep2	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peipp
pSEC-HC-MOR208wt-IgG1-Der1 pSEC-HC-MOR208wt-scTRAIL pSEC-HC-MOR208wt- CH3DD-scTRAIL pSEC-HC-4D5-IgG1-Der1 pSEC-HC-4D5-VH-CH3DD-scTRAIL	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pTM2-GFP	Miltenyi Biotec, D
18AAQTSP BsrGI-scTRAIL-Pmel pMK-RQ 18ACD7AP BsrGI-CH3DD-scTRAIL-Sfol pMA-RQ	Eurofins Scientific, LU

2.1.4. Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
BsrGI	CutSmart	New England Biolabs, USA
Nhel	CutSmart	New England Biolabs, USA
PpuMI	CutSmart	New England Biolabs, USA
Pmel	CutSmart	New England Biolabs, USA
Sfol	CutSmart	New England Biolabs, USA
EcoO 109 I	CutSmart	New England Biolabs, USA
T4-Ligase	T4 DNA Ligase Buffer (10x)	Roche, CH

2.1.5. Bakterienstämme

Organismus	Hersteller
<i>E. Coli</i> One Shot® Top 10	Invitrogen, USA
<i>E. Coli</i> XL1-Blue Competent Cells	Stratagene, USA

2.1.6. Kits

Material	Hersteller
AnnexinV-APC/PI Kit	Biologend, USA
Apoptosis antibody sampler kit	Cell Signaling Technology, USA (#9915)
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche, CH
WesternBright Quantum HRP substrate	Advansta, USA
IRDye800CW ProteinLabelingKit-HighMW	Li-COR, USA
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, D
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel, D
NucleoBond® PC2000 EF	Macherey-Nagel, D
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, NL
QIFIKIT	Aglient Technologies, USA

2.1.7. Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Orientierung
pSEC back 1	GCT CTC CCA CTC CAC GGC GAT GTC GC	<i>reverse</i>
pSEC back 2	CGT CCA CGT ACC AGT TGA AAC TTG ACC TCA GG	<i>reverse</i>
pSEC C _H 3 for	GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC	<i>forward</i>
pSEC CMV	GGT AGG CGT GTA CGG TGG GAG G	<i>forward</i>
pSEC REV	CCT TCC AGG GTC AAG GAA GGC ACG	<i>reverse</i>
pSEC scTrail for	GGA CTG TAC TCC ATA TAT CAA GGC	<i>forward</i>
pSEC scTrail back	CCA TAT CAA TGA GGT GCT CAT TCG	<i>reverse</i>

2.1.8. Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Bezugsquelle	Zellkulturmedium
CEM, REH, NALM-6	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig, D (DSMZ)	<u>R10⁺</u> : RPMI 1640 + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Chinese Hamster ovary (CHO-S)	Thermo Fisher Scientific, USA	<u>Vor Transfektion:</u> CD-CHO + 1% (v/v) HT Supplement + 2 mM GlutaMax <u>Nach Transfektion:</u> CD OptiCHO + 1% (v/v) HT Supplement + 2 mM GlutaMax + 1 % (v/v) Pluronic F-68
U-87 MG	ATCC	<u>D10⁺</u> : DMEM Glutamax-I Medium + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
SKOV-3	ATCC	McCoy's Medium + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

2.1.9. Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
α-human CD19 PE	1:1000	eBioscience, USA (#12-0199-42)
α-human CD45 FITC	1:1000	eBioscience, USA (#MHCD4501-4)
α-mouse CD45 APC	1:1000	eBioscience, USA (# MCD4505)
Maus IgG1 κ PE	1:1000	eBioscience, USA (#12-4714-82)
Maus IgG1 κ FITC	1:1000	eBioscience, USA (#11-4714-81)
Ratte IgG2b κ APC	1:1000	eBioscience, USA (#17-4031-82)

Ziege α - human-IgG Fc F(ab') ₂ -FITC	1:20	Jackson Immuno Research, USA (AB_2337668)
Maus α -human CD19	50 μ g/ml	Biologend, USA (#392502)
Maus α -human TRAIL-R1	50 μ g/ml	Biologend, USA (#307202)
Maus α -human TRAIL-R1	50 μ g/ml	Biologend, USA (#307302)
Maus α -human HER2	50 μ g/ml	Biologend, USA (#324401)
Maus α -human CD7	50 μ g/ml	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peipp
Ziege α -Kaninchen HRP	1:5000	Cell Signaling, USA (#7074)
Ziege α Maus HRP	1:5000	Cell Signaling, USA (#7076)
α Tubulin	1:2500	Abcam, UK (#ab18251)
α Bcl-2	1:2500	Cell Signaling, USA (#15071)
α Mcl-1	1:2500	Cell Signaling, USA (#5453)
α γ H2AX	1:2500	Cell Signaling, USA (#7631)
Maus α -human κ light chain	1:10000	Sigma-Aldrich, USA, (#AP113P)
Ziege- α - human-IgG-Pox- HRP	1:5000	Sigma-Aldrich, USA (#AP113P)
Kaninchen- α - human TRAIL	1:5000	Abcam, UK (#ab9959)
Rituximab	-	Roche, CH

2.1.10. Software

Software	Hersteller
Citavi 6.0	Swiss Academic Software, CH
CompuSyn 1.0	ComboSyn, Inc., USA
GraphPad Prism 9.0	GraphPad Software Inc, USA
FlowJo 10.7.1	Becton, Dickinson and Company, USA
Kaluza 1.2 Software	Beckman Coulter, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, USA
TrueQuant Software	Perkin Elmer, USA
Vector NTI Advance 10	Thermo Fisher Scientific, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Klonierung der Antikörperderivate

2.2.1.1. Restriktionsverdau der Ausgangsplasmide

Für die Integration von DNA-Fragmenten (Insert) in einen Empfängervektor wurden 2 µg Vektor- und 1 µg des inserthaltigen Donorplasmids mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (20 Einheiten) (s. 2.1.4.) in 1 x *CutSmart*-Puffer in 30 µl Gesamtvolumen, für 2 h bei 37°C verdaut. Zur Überprüfung der enzymatischen Spaltung erfolgte im Anschluss die Analyse der Plasmide durch eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.2. Auftrennung, Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels 1 %-iger Agarosegele in 1 x TAE-Laufpuffer (s. 2.1.2.). Die DNA-Probe wurden dafür mit 6 x Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (*100bp DNA ladder*, Carl Roth, D) bei einer Spannung von 110 V aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Agarosegel für 20 min in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend im UV-Transilluminator (HeroLab Transilluminator, HeroLAB, D) detektiert.

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurden entsprechende Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und in 30 µl sterilem Wasser eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (BioPhotometer; Eppendorf, D) bei 260 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wurden zudem die Absorptionen bei 230 nm und 280 nm bestimmt. Anhand der Verhältnisse der Absorption 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm können Verunreinigungen mit Proteinen bzw. organischen Verbindungen erkannt werden. Es wurden ausschließlich Proben mit einem 260 nm/280 nm Verhältnis >1,8 und einem 260 nm/230 nm Verhältnis im Bereich von 1,8 – 2,2 in dieser Arbeit verwendet.

2.2.1.3. Ligation

Für die Ligrationsreaktion wurden 100 ng der linearisierten Vektor-DNA mit der dreifachen molaren Menge Insert-DNA vereint und mit 1 µl Ligase (5 U/µl) sowie 2 µl 10 x Ligationspuffer in 20 µl Gesamtvolumen bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.4. Bakterielle Transformation

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA kann diese entweder mittels Hitzeschock oder Elektroporation in Bakterien eingebracht werden.

Für die Transformation mittels **Hitzeschock** wurden 50 µl der auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten Bakterien (*E. Coli* One Shot Top 10) mit 4 µl Ligrationsansatz vereint. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 30 sec. Die Bakterien wurden dann für 2 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 250 µl SOC-Medium versehen und für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf 2 x YT-Agarplatten mit Ampicillin (1:1000) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation mittels **Elektroporation** wurden 10 ng Plasmid-DNA zu den 50 µl elektrokompenten Bakterien (*E. coli* XL1-blue; eigene Herstellung) gegeben und für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette vorgelegt und diese mittels Elektroporator (MicroPulser, Bio-Rad, USA) einem Elektroschock von 1,8 kV ausgesetzt. Die Bakterien wurden sofort mit 1 ml SOC-Medium versehen und für 60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der Bakterien auf 2 x YT-Agarplatten mit Ampicillin (1:1000) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurden Einzelklone von den Agarplatten isoliert und in einer Übernachtkultur mit 2 x YT-Medium mit Ampicillin (1:1000) bei 37°C und 220 rpm schüttelnd kultiviert.

Mini-Präparation

Zur Überprüfung der Klonierung wurde Plasmid-DNA aus einer 3 ml Übernacht-Bakterienkultur mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid Quick Pure* nach Herstellerprotokoll

präpariert. Die DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch (BioPhotometer; Eppendorf, D) bei 280 nm bestimmt.

Maxi-Präparation

Nach Überprüfung des Sequenzierungsergebnisses (s. 2.2.1.6) wurde die Plasmid-DNA in größerem Maßstab, frei von bakteriellen Endotoxinen präpariert. Dafür wurde eine 500 ml Übernachtskultur angefertigt und die Plasmid-DNA mittels *NucleoBond® PC2000 EF* nach Herstellerangaben isoliert. Die extrahierte DNA wurde in 500 µl sterilem Wasser eluiert und auch hier die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.6. Sequenzanalyse der DNA

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Sequenzen der DNA-Plasmide auf korrekte Basenfolge mittels Sanger-Sequenzierung im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel überprüft. Dafür wurden 300 ng Plasmid-DNA mit je 1 µl der entsprechenden Sequenzierprimer (s. 2.1.7) vermischt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels Vector NTI Advance 10.

2.2.1.7. Klonierung der Antikörper

Für die Konstruktion der Antikörper-Derivate CD19-TRAIL, CD19-An2 und CD19-An2-TRAIL sowie HER2-TRAIL wurden die kodierenden Sequenzen der variablen Regionen des CD19-Antikörpers Tafasitamab (MOR208) bzw. des HER2-gerichteten Antikörpers Trastuzumab gemäß den publizierten Sequenzen *de novo* in Auftragssynthese hergestellt (Eurofins Scientific, LU) [186,187]. Um die heterodimere Zusammenlagerung der Fc-Domänen zu begünstigen, wurden AS-Substitutionen in der C_H3-Domäne (K392D und K409D in der ersten schweren Kette sowie E356K und D399K in der zweiten schweren Kette) eingeführt [188]. Zur Herstellung der Expressionsvektoren für die erste schwere Kette von CD19-TRAIL (pSEC-HC-MOR208wt-VH-CH3DD-scTRAIL) wurde zunächst eine Einzelketten (sc) TRAIL-Domäne, bestehend aus drei TRAIL Monomeren, die jeweils über einen Peptid-Linker ([GGGS]₄) kovalent fusioniert sind, genetisch über einen ([GGGGS]₂)-Linker an den C-Terminus der C_H3-Region der schweren Kette des Antikörpers fusioniert [90]. Dafür wurde die Sequenz der scTRAIL-Domäne aus dem kommerziell erworbenen Plasmid 18AAQTSP BsrGI-scTRAIL-PmeI pMK-RQ (Eurofins Scientific, LU) über die

Restriktionsschnittstellen BsrGI und PmeI ausgeschnitten und im Leserahmen in den Expressionsvektor der schweren Kette von CD19-IgG1 (pSEC-HC-MOR208wt-VH) ligiert, wodurch der Expressionsvektor pSEC-HC-MOR208wt-VH-scTRAIL entstand. Um die AS-Substitutionen in der schweren Kette von CD19-TRAIL einzuführen wurden diese aus dem kommerziell erworbenen Plasmid 18ACD7AP BsrGI-CH3DD-TRAIL-SfoI pMA-RQ (Eurofins Scientific, LU), welches die neuen Codons bereits enthält, in den Expressionsvektor pSEC-HC-MOR208wt-VH-scTRAIL als BsrGI / SfoI Kasette eingefügt. Für die Konstruktion der zweiten schweren Kette (pSEC-HC-MOR208wt-IgG1-Der1) wurde die variable Region aus pSEC-HC-MOR208wt-VH in den Expressionsvektor pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1, indem die Codons für die entsprechenden AS-Substitutionen bereits eingefügt worden waren (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Matthias Peipp, Medizinische Klinik II des UKSH, Campus Kiel, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie), über die Restriktionsenzyme NheI und PpuMI ligiert. Analog dazu wurden die schweren Ketten des HER2-Antikörpers verändert, um das Kontrollmolekül HER2-TRAIL zu generieren.

Für die ZNS-gerichteten Antikörper-Derivate wurde zusätzlich das aus 19 Aminosäuren bestehende Peptid Angiopep 2 (An2) c-Terminal über einen ([GGGGGS]₂)-Linker kovalent an die konstante Domäne der leichten Kette des CD19-Antikörpers fusioniert [189]. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen für das Linker-Peptid und An2 als HindIII/PmeI Kasette in den Vektor pSec-MOR208-LC kloniert, wodurch der Expressionsvektor pSEC-MOR208-LC-Angiopep2 entstand.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Zellkultur

Die Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und 5 % CO₂ kultiviert und je nach Konfluenz zwei- bis dreimal pro Woche mit entsprechendem Medium (s. 2.1.8.) passagiert. Adhärent wachsende Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA oder Accutase abgelöst. Die Zellen wurden anschließend, wie auch die Suspensionszellen, in frischem Medium ausgesät.

2.2.2.2. Proteinexpression in CHO-S-Zellen

Die Antikörper-Derivate wurden transient in CHO-S-Zellen unter Verwendung des *MaxCyte STX Scalable Transfection Systems* (MaxCyte, USA) hergestellt. Dafür wurden CHO-S-Zellen für etwa zwei Wochen in serumfreien CD-CHO Medium schüttelnd bei 145 rpm und 37°C im Inkubator kultiviert und die Zellen alle drei Tage auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Transfektion eines Antikörper-Derivats wurden 8×10^8 Zellen benötigt, die in 10 einzelne Transfektionsansätze aufgeteilt wurden. Diese wurden zweimal mit Elektroporationspuffer (MaxCyte, USA) gewaschen und anschließend in 400 µl des Puffers aufgenommen. Pro Ansatz wurden nun 120 µg Plasmid-DNA zu den CHO-S-Zellen hinzugegeben. Für CD19-IgG1 und CD19-An2 wurden die schweren und leichten Ketten im Verhältnis 1:1 eingesetzt (je 60 µg Plasmid-DNA). Für die TRAIL-Fusionsproteine wurden 60 µg Plasmid-DNA der leichten Kette, 40 µg Plasmid-DNA der schweren Kette mit TRAIL und 20 µg Plasmid-DNA der schweren Kette ohne TRAIL verwendet. In einer OC-400 Elektroporationskammer (MaxCyte, USA) wurden die Zellen nun, unter Verwendung des *MaxCyte STX Scalable Transfection Systems*, elektroporiert und anschließend in einer 6-well Platte für 30 min bei 37°C, 6 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden dann in 150 ml CD OptiCHO Kulturmedium aufgenommen und bei 37°C, 6 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit schüttelnd kultiviert. Am Folgetag wurde einmalig 1 mM Natriumbutyrat zu den Zellen gegeben und diese bei 32°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit schüttelnd kultiviert. Während der gesamten Kultivierungszeit (10-14 Tage) wurden die Zellen täglich mit 5,25 ml MaxCyte Feed-Stock (2.1.2.) versorgt sowie die Zelldichte und Vitalität bestimmt. Sobald eine Zellvitalität < 50 % festgestellt wurde, wurde die Kultivierung beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000rpm, 15 min), die Zellüberstände steril filtriert (0,22 µm) und diese bis zur Reinigung bei 4°C aufbewahrt. Parallel zur Transfektion des Antikörper-Derivats wurde als Positivkontrolle zusätzlich ein GFP-Plasmid in CHO-S-Zellen transfiziert.

2.2.2.3. Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut

Für die Präparation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden *Leukoreduction-system-Chambers* (LRSC) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein verwendet. Das darin enthaltene Blut stammte ausschließlich von gesunden Spenderinnen/Spendern, die der Verwendung zu Forschungszwecken zugesagt hatten (B 459/16). Der Inhalt einer LRSC wurde auf 40 ml mit PBS aufgefüllt und je 10 ml Ficoll-Paque Plus mit 10 ml Blut überschichtet und eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die PBMCs wurden an der Grenzschicht vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Verbleibende Erythrozyten wurden unter hypotonen Bedingungen lysiert und anschließend je nach Fragestellung verschiedene Zelltypen isoliert.

Die Isolierung von NK-Zellen aus der PBMC-Fraktion erfolgte über Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) mit Hilfe des NK-Isolationskits nach Herstellerprotokoll. Über Nacht wurden die Zellen in R10⁺ (2 x 10⁶ Zellen/ml) kultiviert und am nächsten Tag im ADCC eingesetzt.

Für die Isolierung von Monozyten wurden 50 x 10⁶ PBMCs in 5 ml *Monocyte Attachment Medium* in *NuncEasYFlasks* (25 cm²) ausgesät und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml X-Vivo 15 Medium bei 37°C kultiviert. Um M0-Makrophagen zu generieren, wurden am folgenden Tag 50 ng/ml MCSF zu den Zellen gegeben. Zusätzlich erfolgte alle 3 Tage ein Mediumwechsel mit Zugabe von 50 ng/ml MCSF. Nach 10-tägiger Kultivierung konnten die Zellen für Versuche eingesetzt werden.

2.2.3. Bestimmung der Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) Assay nach Herstellerangaben. Dafür wurden 2 x 10⁴ Zellen/well in 100 µl entsprechendem Kulturmedium auf einer 96-well Flachbodenplatte ausgesät und mit seriellen Verdünnungen der Antikörper-Derivate für 72 h behandelt. Vier Stunden nach Zugabe von 10 µl MTT-Reagenz wurden 100 µl des *solubilization-buffer* zu den Zellen gegeben und am nächsten Tag die Absorption bei 550 nm (Referenz-Wellenlänge 650 nm) mit einem ELISA-Reader (Sunrise Plate-

Reader, Tecan Group Ltd., CH) gemessen. Zur Absättigung des CD19-Epitops innerhalb von Blockadeversuchen wurden die Zellen, eine Stunde vor der Antikörper-Behandlung, mit 100 nM des parentalen CD19-IgG1-Antikörpers vorbehandelt. Die Zellvitalität wurde dargestellt in Relation zur Mediumkontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellvitalität (\%)} = \frac{\text{nm experimenteller Wert} - \text{nm Mediumkontrolle}}{\text{nm unbehandelte Zellen} - \text{nm Mediumkontrolle}} \times 100$$

2.2.4. Durchflusszytometrische Verfahren

2.2.4.1. Nachweis der spezifischen Bindung von Antikörpern

Für die Untersuchung der spezifischen Bindung von Antikörpern wurden 5×10^5 Zellen mit PBA gewaschen und mit 50 µg/ml des entsprechenden Antikörpers inkubiert. U-87 MG-Zellen wurden mit 250 µg/ml des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Nach 1 h bei 4°C wurden die Zellen dreimal mit PBA gewaschen und anschließend für 30 min mit dem FITC-gekoppelten Ziege-Anti-Humanen-IgG Fc F(ab')₂ Sekundärantikörper (1:20 in PBA) bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBA gewaschen, in 500 µl PBA aufgenommen und am Durchflusszytometer (Navios; Beckman Coulter, USA) analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden. Die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 520 nm (Emissionsmaximum von FITC). Die Auswertung der Daten aus der Fluoreszenzmessung erfolgte mittels *KALUZA Analysis 1.2 Software*.

2.2.4.2. Quantifizierung der Molekülzahl von CD19, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf Zellen

Die Quantifizierung der Expression von CD19 sowie der TRAIL-R1/2 auf der Zelloberfläche wurde unter Anwendung des QIFIKITs nach Herstellerprotokoll analysiert. Dafür wurden 5×10^5 Zellen mit PBA gewaschen und mit 50 µg/ml der entsprechenden murinen Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBA wurden diese für 30 min mit einem FITC-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper (1:50 in PBA) bei 4°C inkubiert und anschließend

erneut dreimal gewaschen und in 500 µl PBA aufgenommen. Als Isotypkontrolle diente je nach Zelllinie ein CD7- bzw. ein HER2-gerichteter muriner Antikörper. Die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 520 nm am *MACSQuant X Analyser* (Miltenyi Biotec, D). Die Antigendichte auf Zellen wurde anhand einer Standardkurve mittels im Kit enthaltener Beads, die mit einer definierten Menge von Maus-IgG beschichtet waren, bestimmt. Die Auswertung der Daten aus der Fluoreszenzmessung erfolgte mit Hilfe der *FlowJo Software* Version 10.7.1.

2.2.4.3. Apoptose-Assays

Zur Untersuchung der Apoptose-Induktion wurden 2×10^5 Zellen mit 0,5 nM CD19-TRAIL behandelt und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe des AnnexinV-APC/PI Kits nach Herstellerangaben gefärbt. Dafür wurden die Zellen in 500 µl kaltem PBS gewaschen, in 50 µl Annexin-Bindepuffer aufgenommen und mit 2,5 µl APC-gekoppelten AnnexinV und 5 µl PI Lösung für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Annexin-Bindepuffer erfolgte die Messung im Durchflusszytometer (MACSQuant, Miltenyi Biotec, D) bei 617 nm (Emissionsmaximum von PI) bzw. 660 nm (Emissionsmaximum APC). Der Prozentsatz früh-apoptotischer Zellen wurde über die Anzahl AnnexinV-positiver-Zellen bestimmt und der spät-apoptotische Zellen über die Anzahl an AnnexinV/PI doppelt-positiven Zellen. Zur Blockade der Apoptose, wurden Zielzellen mit 50 µM Z-VAD, einem Pan-Caspase-Inhibitor, für 1 h vorbehandelt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper für 1 h. Je nach Fragestellung wurden mit PBS bzw. DMSO behandelte Zellen als Kontrolle angeführt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels der *FlowJo Software* Version 10.7.1.

2.2.5. Zytotoxizitätsassays

2.2.5.1. ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche

Zur Untersuchung der ADCC wurden ⁵¹Chrom (⁵¹Cr) - Freisetzungsversuche durchgeführt. Dafür wurden 6×10^5 Zielzellen in 50 µl ⁵¹Cr radioaktiv markiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit R10⁺-Medium gewaschen und auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Als Effektorzellen dienten aus Vollblut

isolierte NK-Zellen (s. 2.2.2.3.). Diese wurden in einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 10:1 zusammen mit den Zielzellen und entsprechenden Antikörpern in serieller Verdünnung in einem Endvolumen von 200 µl für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zentrifugation der Zellen (1600 rpm, 5 min) wurden 25 µl der Probenüberstände zu 125 µl Szintillationslösung pipettiert und das freigesetzte ⁵¹Cr in dem Szintillations- und Lumineszenz Zähler 1450 MicroBetaTriLux (Perkin-Elmer, USA) in *counts per minute* (cpm) bestimmt. Die maximale ⁵¹Cr-Freisetzung wurde durch die Zugabe von 1 % v/v Triton X-100 und die basale Freisetzung durch Analyse der Zielzellen mit Effektorzellen aber ohne Antikörper bestimmt. Die Antikörper-vermittelte Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ AK - vermittelte Lyse} = \frac{\text{experimentelle cpm} - \text{basale cpm}}{\text{maximale cpm} - \text{basale cpm}} \times 100$$

2.2.5.2. Phagozytose

Die ADCP wurde mittels Markierung der Zielzellen mit dem pH-sensitiven Farbstoff pHrodo bestimmt. Dafür wurden die mittels MCSF differenzierten M0-Makrophagen (s. 2.2.2.3.) mit *Cell Dissociation Buffer* abgelöst und je 4×10^4 Zellen/well in 200 µl X-Vivo 15 Medium in eine 96-well Flachbodenplatte ausgesät und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. In der Zwischenzeit wurden die Zielzellen einmal mit PBS gewaschen, auf 1×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt und mit 0,5 µg/ml pHrodo™ für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in X-Vivo 15 Medium auf 4×10^4 Zellen/well eingestellt und zusammen mit den entsprechenden Antikörpern (10 µg/ml) zu den Makrophagen gegeben. Als Positivkontrolle dienten Zielzellen die mit 200 µl Glycin (0,1 M, pH = 3) behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurden unbehandelte Makrophagen und Zielzellen zur Bestimmung der Hintergrundfärbung verwendet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 h im IncuCyte (Sartorius, D), indem alle 20 min vier Bilder pro well angefertigt wurden. Die Fluoreszenz der phagozytierten Zellen wurde bei 37°C quantifiziert und als *red object count* ausgelesen. Zur Auswertung wurde mit Hilfe des Analyseprogramms von IncuCyte die Grundfluoreszenz pro Zielzelle pro Platte herausgerechnet. Dafür wurde der Zellradius an die Zielzellgröße angepasst und die minimale *Mean Intensity* im

Programm so eingestellt, dass zum Startzeitpunkt (0 h) weniger als 10 Zellen unter Kontrollbedingungen und mehr als 100 Zellen unter Glycin-Behandlung als phagozytiert erkannt wurden. Aus den technischen Triplikaten sowie den vier Bildern/well berechnet das Programm einen Mittelwert \pm SEM, der die absolute Zahl der fluoreszierenden Zellen als *red object count* angibt.

2.2.6. Biochemische Methoden

2.2.6.1. Reinigung von Antikörpern

Produzierte Antikörper wurden mittels C_{H1} -spezifischer Affinitätschromatographie aus dem Überstand der transfizierten CHO-S-Zellen gereinigt. Dafür wurde 1 ml *C_{H1}-XL Affinity Matrix* pro 200 ml sterilem Zellkulturüberstände bei 4°C über Nacht eingerührt und am folgenden Tag die Matrix über einen Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 10 min) von den Zellkulturüberständen getrennt. Die Überstände wurden für eine zweite Reinigung gesammelt und die Matrix mit dem gebundenen Protein auf eine Poly-Prep-Chromatographie Säule (BioRad, USA) geladen und zweimal mit PBS gewaschen. Die Proteine wurden anschließend mit einer Glycin-Lösung (pH = 3) in zehn Fraktionen zu je 1 ml von der Matrix eluiert. Zur Neutralisation wurde zu jeder Proteinfraction 200 μ l TRIS-Lösung (pH = 8) hinzugegeben. Die Proteinlösungen wurden nun in einen Dialyseschlauch überführt und für drei Tage in 2 L 1 x PBS bei 4°C dialysiert, wobei täglich das PBS gewechselt wurde. Die Matrix wurde für eine weitere Reinigung erneut zweimal mit PBS gewaschen und in die gesammelten Zellkulturüberstände über Nacht eingerührt.

In einem zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschluss-Chromatographie wurden mögliche Aggregate sowie Fc-Homodimere unter nativen Pufferbedingungen mit Hilfe des *ÄKTAPure 25 liquid chromatography system* (GE Healthcare, USA) analysiert und bei einer Flussrate von 0,8-1 ml/min ihrer Größe nach aufgetrennt. Es wurden Fraktionen á 2 ml gesammelt, die Absorption der Proteine in den Fraktionen bei 280 nm photometrisch bestimmt und graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die gewünschten Fraktionen wurden entnommen, mittels Vivaspin 20 (Satorius, D) Filtereinheit auf die gewünschte Konzentration eingengt und anschließend steril filtriert.

2.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (ϵ) bestimmt. Dieser wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\epsilon = (n(\text{Tryptophan}) \times 5500) + (n(\text{Tyrosin}) \times 1490) + (n(\text{Cystein}) \times 125)$$

Die Proteinkonzentration (c) der Antikörperlösung wurde dann wie folgt berechnet:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon} \times \text{Molekulargewicht} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der Antikörper mittels SDS-PAGE durch den Vergleich mit einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen des Antikörpers Rituximab bestimmt. Dafür wurde eine Konzentrationsreihe mit Rituximab angefertigt und neben zwei Konzentrationen des zu analysierenden Antikörpers (0,5-10 μ l) im SDS-Gel aufgetragen.

2.2.6.3. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten für Western-Blot Analysen wurden entweder unbehandelte Zellen verwendet oder 3×10^6 Zellen/well in einer 6-well Flachbodenplatte ausgesät und für 48 h mit den entsprechenden Antikörpern bzw. VTX behandelt. Mit PBS bzw. DMSO behandelte Zellen dienten, je nach Fragestellung, als Kontrolle. Für die Herstellung von Gesamtproteinlysaten wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen in NP40-Lysepuffer (s. 2.1.2.) mit Proteaseinhibitorlösung (1:10) für eine Stunde auf Eis lysiert. Zellreste wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (13000 rpm, 10 min) und die Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford Reagenz nach Herstellerangaben photometrisch bei 595 nm durch den Vergleich mit einer BSA-Eichkurve bestimmt.

2.2.6.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen wurden 10 bzw. 12 %-ige Polyacrylamidgele (s. 2.1.2.) angefertigt. Vor dem Auftragen der Proteinproben und Zelllysate wurden diese mit 5 x reduzierendem Ladepuffer versetzt und bei 95°C für

10 min denaturiert. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in einer vertikalen Laufkammer (BioRad, USA) in 1 x SDS-Laufpuffer (s. 2.1.2.) zusammen mit einem Größenstandard bei 125 V. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Gel entweder über Nacht in einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung auf einem Schüttler gefärbt oder in Western-Blot Analysen analysiert.

2.2.6.5. Western-Blot und Immundetektion

Für den Nachweis zellulärer Proteine wurden 25-50 µg Gesamtprotein über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe einer Wet-Blot-Kammer wurden die Proteine aus dem Gel bei 100 V für zwei Stunden in 1 x Blotpuffer (s. 2.1.2.) bei 4°C auf Eis auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Membran wurde dann für 60 min bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in TBS geblockt und anschließend über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper (s. 2.1.9.) bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran mit einem Spezies-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in 5 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert und nach einer Stunde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Alle Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit dem *WesternBright Quantum HRP substrate* im *ChemiDoc Imaging System* (BioRad, USA).

2.2.7. Synergistische Induktion der Apoptose durch CD19-TRAIL in Kombination mit Venetoclax (VTX)

Für die Analyse kombinierter Behandlungseffekte von CD19-TRAIL und VTX wurden 2×10^4 Zellen mit CD19-TRAIL und/oder VTX, gemäß den zuvor ermittelten EC_{50} -Werten jeder Substanz, in absteigender und aufsteigender Konzentration in 5-fachen Verdünnungsstufen behandelt und nach 72 h die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Synergistisch apoptotische Effekte der beiden Substanzen wurden über die Kalkulation des Kombinationsindex (*combination index*, CI) mit Hilfe der CompuSyn 1.0 Software bestimmt. Synergismus, Antagonismus oder additive Effekte sind durch $CI < 1$, $CI > 1$ oder $CI = 1$ angezeigt. Für Western-Blot Analysen wurden die behandelten Zellen nach 48 h lysiert und auf apoptotische Marker untersucht.

2.2.8. Ethische Grundlagen

Die für die vorliegende Studie verwendeten Proben, wurden nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung der Patientinnen/Patienten bzw. deren gesetzlichen Vertretung entnommen. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Die Patientinnen/Patienten wurden im Rahmen der ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studienprotokolle ALL-BFM 2000 oder ALL-BFM 2009 behandelt. Die vorliegende Studie wurde im Rahmen der Begleitforschung der entsprechenden Studien von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bewilligt (D437/17).

2.2.9. Tierversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Xenograft-Experimente wurden ausschließlich in weiblichen immundefizienten *NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* (NSG) Mäusen im Alter von 6-10 Wochen durchgeführt. Diese wurden von Charles River Laboratories bezogen und in der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel unter spezifizierten pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Durch künstliches Raumlicht wurde ein 12-Stunden Tag- und Nachtrhythmus aufrechterhalten. Den Tieren stand Futter und keimfreies Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (V 242-30136/2020).

2.2.9.1. Leukämiemodell-Xenotransplantation, Überwachung und Therapie

$0,5 \times 10^6$ REH, NALM-6 oder 1×10^5 PDX-Zellen in PBS wurden intravenös in die laterale Schwanzvene der Tiere injiziert (Tag 0). An Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen wurde je 1,5 mg/kg Körpergewicht (KG) CD19-TRAIL, CD19-IgG1, CD19-An2-TRAIL oder eine entsprechende Vektorkontrolle intravenös verabreicht [123]. VTX wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml täglich oral verabreicht [190]. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurden täglich visuell beurteilt. Zur Beurteilung des leukämischen Engraftments wurde den Tieren alle drei Wochen Blut entnommen und die Blastenlast morphologisch über Erstellung eines

Differentialblutbilds oder durchflusszytometrisch über die differentielle Detektion von human-CD45⁺/CD19⁺-Zellen versus murin-CD45⁺-Zellen untersucht (s. 2.2.9.3.). Aufgrund der reduzierten Ausschüttung von REH-Zellen in das periphere Blut von Mäusen erfolgte die Überprüfung des leukämischen Engraftments bei mit REH-Zell-transplantierten Tieren durch Darstellung leukämischer Zellen im Knochenmark nach Punktion. Zur Untersuchung der Blastenlast xenotransplantierte Mäuse wurden entweder 100 µl Blut aus der *Vena facialis* entnommen oder das Femur punktiert und Knochenmark entnommen. Blut und Knochenmark wurden in einer EDTA-Microvette (Sarstedt, D) aufgefangen, in 1-4 ml Erythrozytenlysepuffer (s. 2.1.2.) resuspendiert und nach 3 min auf Eis in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für die durchflusszytometrischen Analysen vorbereitet (s. 2.2.9.3.).

Bei Anzeichen einer offenen Leukämie, wie der Detektion von > 75 % leukämischen Blasten im peripheren Blut oder klinischen Leukämieanzeichen wie Gewichts- und Aktivitätsverlust, Organomegalie, und/oder Lähmung des Hinterleibs, wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und mittels CO₂-Begasung euthanasiert.

2.2.9.2. Analyse der Leukämiebelastung im Knochenmark, Milz und ZNS

Zur Bestimmung des Organ-spezifischen Anwachsens von Leukämiezellen wurden den Versuchstieren nach CO₂-Euthanasie die Milz, das Knochenmark und der Kopf entnommen und auf leukämischen Befall untersucht. Dafür wurde die Milz vermessen, durch ein 70 µm Zellsieb zerdrückt und die Zellen in PBS aufgenommen. Für die Untersuchung des Knochenmarks wurden Femur und Tibia beider Hinterbeine entnommen und die Knochenmarkszellen mit PBS aus den Knochen mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze (0,33 mm) ausgespült. Aus Milz und Knochenmark extrahierte Zellen wurden abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min) und in 10-30 ml Erythrozytenlysepuffer (s. 2.1.2.) für 7 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Je $0,2 \times 10^6$ Zellen wurden durchflusszytometrischen Analysen zugeführt und der Anteil an hCD45⁺/hCD19⁺/mCD45⁺-Zellen bestimmt (s. 2.2.9.3.).

Zur Beurteilung der ZNS-Infiltration wurde die Köpfe der Versuchstiere in Formalin fixiert, de-kalzifiziert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden histologische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Aufarbeitung und Befundung der ZNS-Infiltration übernahm Prof. Dr. med. Christian Vokuhl (Sektion Kinderpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn (UKB)). Die

Beurteilung der Schnitte erfolgte verblindet und wurden je nach Befall des Subarachnoidalraums von Mäusen in ZNS-negativ oder ZNS-positiv eingeteilt.

2.2.9.3. Bestimmung der leukämischen Blasten

Zur Untersuchung der Anzahl leukämischer Blasten in Blut, Knochenmark und Milz wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen mit humanen-CD19-PE, humanen CD45-FITC und murinem-CD45-APC (je 1:1000) für 30 min gefärbt, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Fluoreszenzintensität bei 520 nm, 660 nm und 575 nm (Emissionsmaximum von PE) am *MACSQuant X Analyser* (Miltenyi Biotec, D) gemessen. Vitale hCD45⁺/hCD19⁺-Zellen wurden als humane Blasten gewertet. Als Kontrolle dienten entsprechende Isotyp-Antikörper (s. 2.1.9.). Die Auswertung der Daten aus der Fluoreszenzmessung erfolgte mit Hilfe der *FlowJo Software* Version 10.7.

2.2.9.4. Bestimmung der IRDye800 Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Molekular-Tomographie (FMT)

Labeling der Antikörper IRDye800

Um zu untersuchen, ob sich Antikörper in der Schädelregion von Mäusen anreichern, wurden die Antikörper mit Hilfe des *IRDye800CW Protein Labeling Kits* nach Herstellerangaben mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRDye800 gelabelt. Dafür wurden die Antikörper auf eine Konzentration von 1 mg/ml in PBS eingestellt und der pH-Wert der Antikörperlösung mit 1 M Kaliumphosphatpuffer auf 8,9 eingestellt. Der Farbstoff wurde in 25 µl sterilem Wasser gelöst und das entsprechende Volumen zum jeweiligen Antikörper gegeben ($\text{IRDye800} (\mu\text{l}) = 1166/\text{MW Antikörper}$). Das Labeling an IRDye800 erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach 2 h wurde das Konjugat von freiem Farbstoff, mittels 5 ml Zeba Spin Entsalzungssäulen (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerprotokoll, befreit.

Messung der Bindung der IRDye800 gelabelten Antikörper

Um die Kopplung mit IRDye800 zu validieren und einen Einfluss des Farbstoffes auf das Bindungsverhalten der Antikörper ausschließen zu können, wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen mit 20 µg/ml markierten Antikörper für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und in einer 24-well Platte

die Fluoreszenzintensität im LI-COR Odyssey Infrarot Bildgeber (LI-COR, USA) gemessen. Mit PBS behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle.

In vivo Imaging

Um die Akkumulation von CD19-An2 im ZNS *in vivo* zu untersuchen, wurden je fünf nicht-leukämischen Mäusen 200 µg CD19-IgG1-IRDye800 oder CD19-An2-IRDye800 intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert. Nach 48 h wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 5 L/kg KG Kombinationsnarkose bestehend aus Midazolam (5 mg/kg KG) und Dormitor (0,5 mg/kg KG) sediert. Das Fell am Kopf der Mäuse wurde entfernt und die Tiere vor, zwischen und nach der Untersuchung auf einer Heizmatte gelegt, um eine Unterkühlung zu vermeiden. Nachfolgend wurden die Mäuse einzeln in das FMT- Imaging System (FMT 2500LX System, PerkinElmer, USA) gelegt, um ein dreidimensionales Tiefengewebebild des Fluoreszenzsignals der Schädelregion zu erstellen. Die Durchführung und Auswertung der FMT-Analyse erfolgte unter Anweisung von Dr. Sanjay Tiwari (Sektion Biomedizinische Bildgebung der Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel). Nach der FMT-Messung wurden die Mäuse euthanasiert.

2.2.10. Statistik

Die graphische und statistische Analyse der generierten Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 9.0. Wenn nicht anderes erwähnt, wurden Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt und die p-Werte mittels einseitigem Mann-Whitney-U Test, Zweifaktorieller Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur oder Zweiseitigem WilcoxonTest bestimmt. Unterschiede im Überleben der Versuchstiere wurde mittels Kaplan-Meier log-rank Test bestimmt. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung, Charakterisierung und prä-klinische Validierung des heterodimeren, CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-TRAIL

Die Fusion von sTRAIL an Tumor-spezifische Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente zeigte in vorausgehenden Studien, im Vergleich zu nativen Antikörpern und unspezifischen TRAIL-Fusionsproteinen, ein erhöhtes anti-tumorales Potential, auch in BCP-ALL-Zellen [88,90,91,191]. Die Hypothese war, dass CD19-IgG1-Antikörper, die mit TRAIL-Molekülen fusioniert sind, eine höhere anti-tumorale Effizienz als native CD19-IgG1-Antikörper aufweisen, bei gleichzeitig konstanter CD19-Bindung. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Generation eines CD19-IgG1-TRAIL-Fusionsproteins (CD19-TRAIL). Untersucht werden sollte, ob CD19-TRAIL Antigen-spezifisch BCP-ALL-Zellen bindet und effizient den Zelltod in Zielzellen induziert.

3.1.1. Konstruktion der Expressionsvektoren für die schweren und leichten Ketten von CD19-TRAIL

Für die Konstruktion von CD19-TRAIL lagen zu Beginn der Arbeit die kodierenden Sequenzen der leichten und schweren Kette des Antikörpers CD19-IgG1 im Labor vor. Diese wurden entsprechend publizierter Sequenzen [192] über die *de novo* Synthese der DNA-Sequenz der variablen Regionen von Tafasitamab (MOR208) generiert. Die Klonierung erfolgte in den Expressionsvektor pSECtag2, der neben einem starken eukaryotischen CMV (*cytomegalovirus immediate-early*) Promotor ein Sekretionssignal (*Leader*) besitzt, welches die effiziente Sekretion der humanen Immunglobulinketten gewährleistet. In Vorarbeiten der AG Peipp wurden CD19-unspezifische zytotoxische Effekte bei einem homodimeren CD19-gerichteten Antikörper beobachtet (CD19-TRAIL₂), der mit je einer TRAIL-Domäne an beide schweren Ketten fusioniert wurde (persönliche Kommunikation mit cand. med. Maren Oßwald, Medizinische Klinik II des UKSH, Campus Kiel, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie). Es wurde angenommen, dass diese Antigen-unabhängigen Effekte über die Verminderung der TRAIL-Domänen am Antikörper aufgehoben werden können. Daher sollte für diese Arbeit ein heterodimeres CD19-spezifisches TRAIL-Fusionsprotein hergestellt werden, bei dem die TRAIL-Domäne nur an einer der beiden schweren Ketten fusioniert vorliegt. Dafür mussten die beiden schweren Ketten dahingehend modifiziert werden, dass eine Heterodimerisierung der unterschiedlichen

schweren Ketten bevorzugt stattfindet. Um dies zu gewährleisten wurden verschiedene AS-Substitutionen in die C_H3-Region der Derivate der schweren Kette eingefügt, welche den Effekt der elektrostatischen Lenkung beeinflussen [188]. Das Derivat der schweren Kette 1, welches C-Terminal an die TRAIL-Domäne fusioniert war, trug die AS-Substitutionen K392D und K409D und das Derivat der schweren Kette 2 die AS-Substitutionen E356K und D399K (Abb. 3.1A). Um die Stabilität und die Aktivität von sTRAIL zu steigern, wurde ein Einzelketten (sc)TRAIL Molekül generiert [90]. Dafür wurden drei TRAIL-Monomere, bestehend aus der extrazellulären Domäne von TRAIL (AS 95-281), über zwei Peptid-Linker ([GGGS]₄) kovalent fusioniert (Abb. 3.1A). Das entstandene Molekül sollte so, nach korrekter Zusammenlagerung der Derivate der schweren und leichten Ketten, ein heterodimeres Fusionsprotein bilden, welches zwei CD19-Bindedomänen sowie eine TRAIL-Rezeptor-Bindedomäne trägt (Abb. 3.1B). Zur Validierung der Spezifität von CD19-TRAIL wurde nach analogem Vorgehen ein Isotypkontroll-Antikörper, HER2-TRAIL, generiert und bei entsprechenden Experimenten, ebenso wie der native CD19-IgG1-Antikörper, vergleichend mitgeführt.

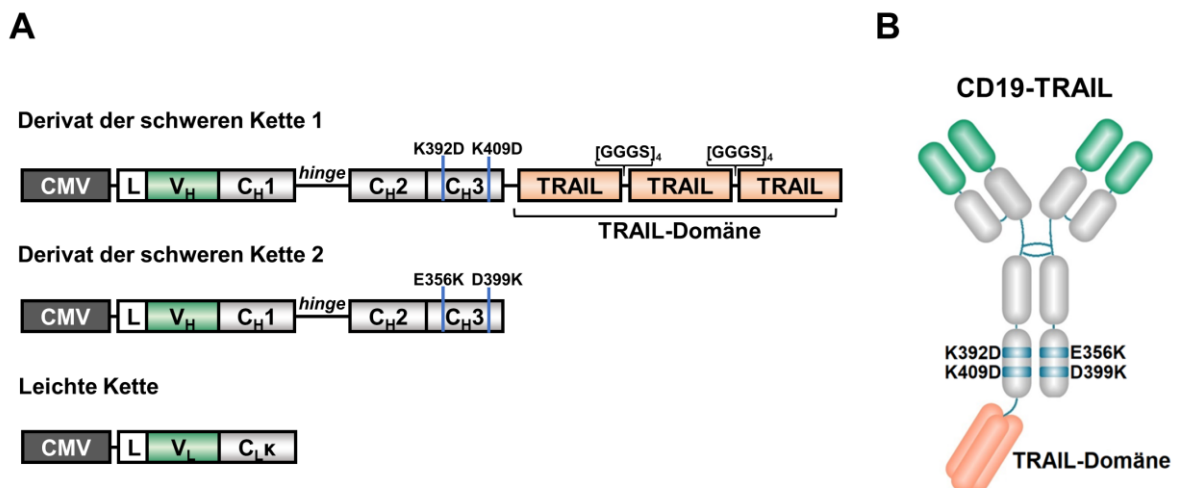


Abbildung 3.1: Strukturelle Darstellung des heterodimeren CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-TRAIL. A) Konstruktion der Expressionskassetten für CD19-TRAIL. CMV, *cytomegalovirus immediate early promotor*; L, Sekretionsleader; V_H, V_L, kodierende Sequenzen für die variablen Regionen der schweren bzw. leichten Kette des CD19-Antikörpers (grün); C_H1-3, kodierende Sequenz der Regionen 1-3 der konstanten schweren Kette; die blauen Striche in der C_H3 Region kennzeichnen die für die Heterodimerisierung essentiellen AS-Substitutionen in den Derivaten der schweren Kette: K392D und K409D in Kette 1, E356K und D399K in Kette 2; *hinge*, Gelenkregion; C_Lκ, kodierende Sequenz für die κ-leichte Kette der konstanten Region; C-terminale Fusion einer TRAIL-Domäne an das Derivat der schweren Kette 1, bestehend aus drei humanen TRAIL Monomeren (orange) die über einen 16 Aminosäure langen [GGGS]₄ Peptid-Linker miteinander verbunden sind. B) Schema des heterodimeren CD19-TRAIL-Fusionsproteins, bestehend aus einem CD19-IgG1-Antikörper, der an einer schweren Kette eine TRAIL-Domäne trägt.

3.1.2. Expression des heterodimeren Fusionsproteins CD19-TRAIL

Die Produktion von CD19-TRAIL sowie der Kontrollmoleküle HER2-TRAIL und CD19-IgG1 erfolgte in CHO-S-Zellen mittels transients Transfektion. Dafür wurden die Zellen mit den Expressionsvektoren für die leichte Kette sowie beiden Derivaten der schweren Ketten mittels Elektroporation ko-transfiziert und das rekombinante Protein affinitätschromatographisch aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Aggregate sowie Fc-Homodimere, deren Formation trotz der eingefügten AS-Substitutionen stattfand, wurden mittels Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) entfernt (Abb. 3.2A). Dafür wurden die jeweiligen Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE auf Vorhandensein der drei verschiedenen Antikörperketten untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Re-Analyse mittels SEC zeigte einen einzelnen, reinen Protein-Peak mit einem niedrigeren Elutionsvolumen als CD19-IgG1, was für eine höhere molekulare Masse und so für die erfolgreiche Insertion der TRAIL-Domäne spricht (Abb. 3.2B). Die Ausbeute der TRAIL-Antikörper lag nach Hochrechnungen routinemäßig bei 5-6 mg/L Zellkulturüberstand.

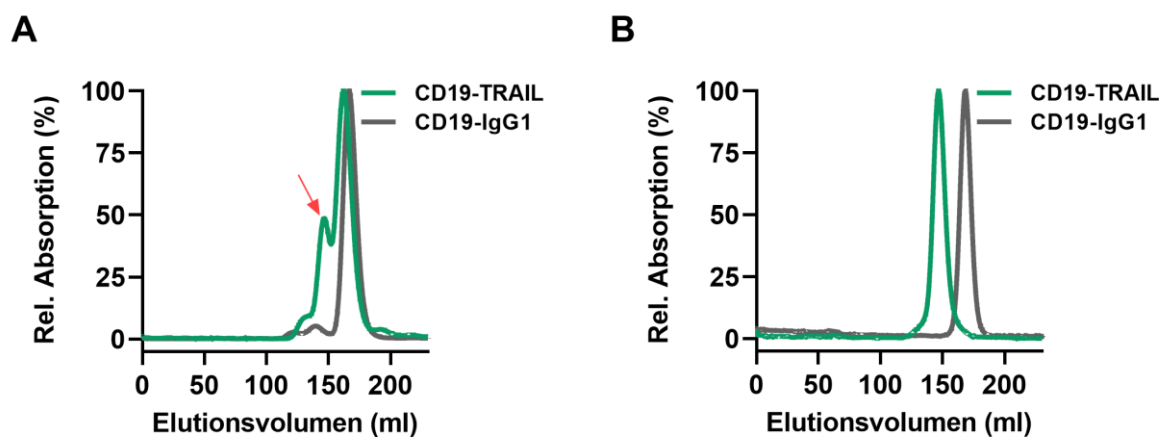


Abbildung 3.2: Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-TRAIL. A) CD19-TRAIL und CD19-IgG1 wurden transient in CHO-S-Zellen transfiziert und die jeweiligen Antikörper mittels C_{H1} -spezifischer Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Die gereinigten Antikörper wurden anschließend über eine Größenausschluss-Chromatographie unter nativen Pufferbedingungen, mit einer Flussrate von 0,8-1 ml/min, analysiert und die Fraktionen der jeweiligen Peaks gesammelt. Der rote Pfeil markiert die Proteinfraktionen, die CD19-TRAIL entsprechen. B) Re-Analyse der Peak-Fractionen von CD19-TRAIL und CD19-IgG1 mittels Größenausschluss-Chromatographie. Gezeigt sind die Absorptionen von CD19-IgG1 und CD19-TRAIL normalisiert auf die maximale Absorption.

Um die Reinheit und molekulare Masse der isolierten Antikörper-Derivate zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau Färbung zur Visualisierung der Proteinbanden durchgeführt (Abb. 3.3A). Erwartungsgemäß wurden drei Banden mit den aus den Sequenzen berechneten molekularen Massen der Antikörperketten (LC = 25 kDa, HC = 50 kDa; HC + TRAIL = 112 kDa) detektiert. Der spezifische Nachweis der Polypeptidketten erfolgte in Western-Blot Experimenten mit Antikörpern gegen die leichte bzw. schwere Kette und gegen TRAIL (Abb. 3.3B). Die leichte und schwere Kette (ohne TRAIL) zeigten dabei eine zum parentalen CD19-IgG1-Antikörper vergleichbare elektrophoretische Mobilität auf. Die Analysen zeigten, dass die TRAIL-Domäne erfolgreich an eine der schweren Ketten, innerhalb des CD19-TRAIL-Antikörpers, fusioniert wurde.

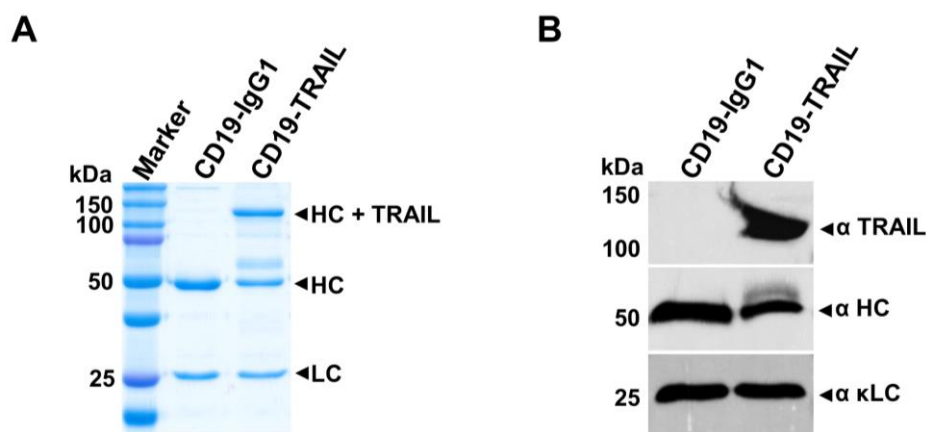


Abbildung 3.3: Nachweis des gereinigten CD19-TRAIL-Antikörpers. Analyse der Reinheit und Größe des gereinigten Fusionsproteins CD19-TRAIL im Vergleich zu CD19-IgG1. Dafür wurden 2 µg des jeweiligen Antikörpers mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die Proteinbanden im Gel über A) Coomassie Blau Färbung visualisiert oder B) mittels Western-Blot Analyse mit spezifischer Immundetektion der leichten (α κLC) und schweren Kette (α HC) sowie von TRAIL (α TRAIL) detektiert.

3.1.3. CD19-TRAIL bindet effizient an CD19-positive-Zellen

Um die Annahme, dass CD19-TRAIL mit gleicher Spezifität an CD19-positive (CD19⁺)-Zellen bindet wie CD19-IgG1, untersuchen zu können, wurden zunächst die Expressionsprofile der Zielantigene CD19 sowie die der TRAIL-R (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) mittels quantitativer indirekter Immunfluoreszenz-Analyse in verschiedenen ALL-Zelllinien und Kontrollzelllinien untersucht. Wie erwartet, wiesen lediglich die BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 eine detektierbare Anzahl an CD19-Molekülen auf der Zelloberfläche auf (mittlere spezifische Antikörper-Bindungskapazität (mSABC) REH = 21312, mSABC NALM-6 = 27208) (Abb. 3.4A).

Die T-ALL-Zelllinie CEM und die HER2-positive (HER2⁺) - Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 zeigten keine detektierbare CD19-Oberflächenexpression (mSABC CEM = 0, mSABC SKOV-3 = 0) (Abb. 3.4A). In allen untersuchten Zelllinien zeigte sich zudem nur eine niedrige bzw. keine TRAIL-R1-Expression (mSABC: REH = 65, NALM-6 = 0, CEM = 41 und SKOV-3 = 520) (Abb. 3.4B). Im Vergleich dazu war eine starke TRAIL-R2-Expression auf allen verwendeten Zelllinien zu beobachten (mSABC REH = 503, NALM-6 = 2256, CEM = 4720 und SKOV-3 = 4417) (Abb. 3.4B). Diese Daten zeigen, dass die untersuchten Zelllinien geeignet sind, um die Spezifität von CD19-TRAIL zu untersuchen.

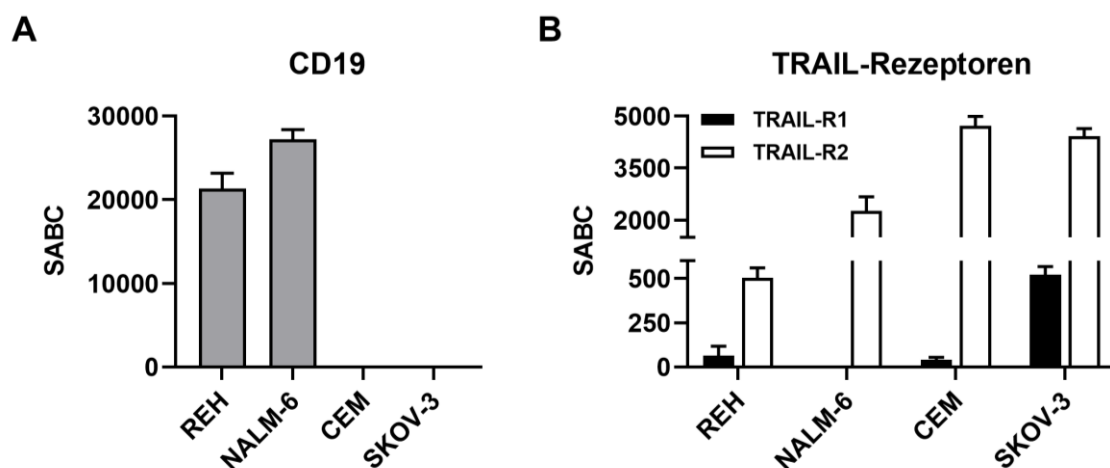


Abbildung 3.4: Expressionsprofil des CD19-Antigens und der TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2). Quantifizierung der Oberflächenexpression von A) CD19 und B) TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 der Zelllinien REH, NALM-6, CEM und SKOV-3 mittels QIFIKIT®. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten; SABC: *specific antibody binding capacity*.

Als nächstes wurde die Bindung von CD19-TRAIL im Vergleich zum parentalen CD19-IgG1-Antikörper sowie zum Kontrollmolekül HER2-TRAIL durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde angenommen, dass die Fusion der TRAIL-Domäne die Bindung des Antikörperkonstrukts gegenüber CD19-IgG1 nicht beeinflusst. CD19-TRAIL und CD19-IgG1 zeigten wie erwartet eine vergleichbare Bindung an CD19⁺ REH- und NALM-6-Zellen (Abb. 3.5). Für den Kontroll-Antikörper HER2-TRAIL wurde ebenfalls eine geringe Bindung an REH- und NALM-6-Zellen sowie an die CD19-negative (CD19⁻)-Zelllinie CEM, bei der auch eine schwache Bindung von CD19-TRAIL beobachtet wurde, festgestellt. Diese ist auf die Bindung von TRAIL an die nachgewiesenen TRAIL-Rezeptoren auf den HER2-negativen (HER2⁻)-Tumorzellen zurückzuführen. Zur weiteren Verifizierung der spezifischen Bindungsfähigkeit des Kontrollmoleküls HER2-TRAIL wurde die CD19⁻/HER2⁺-

Zelllinie SKOV-3 eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigte HER2-TRAIL eine starke Bindung an diese Zellen sowie eine gewisse Bindung von CD19-TRAIL, die auf die TRAIL-Rezeptorexpression auf diesen Zellen zurückzuführen ist (Abb. 3.5). Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die TRAIL-Domäne die CD19-Bindungsspezifität von CD19-TRAIL nicht beeinflusst.

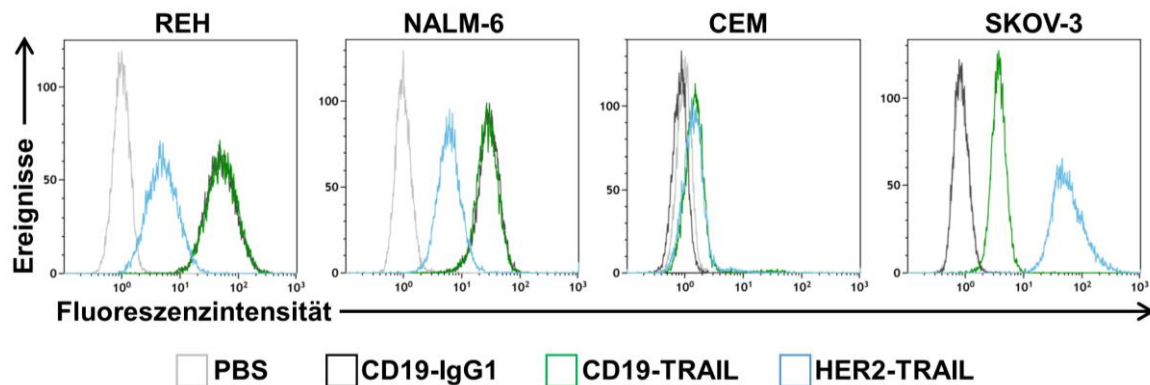


Abbildung 3.5: CD19-TRAIL bindet spezifisch an CD19⁺-ALL-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Bindung von CD19-TRAIL an die CD19⁺-Zelllinien REH und NALM-6, die CD19⁺-T-ALL-Zelllinie CEM sowie die CD19⁺/HER2⁺-Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 im Vergleich zu CD19-IgG1 und dem Kontroll-Antikörper HER2-TRAIL. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG Fc F(ab')₂ Antikörper. PBS diente als Kontrolle. Gezeigt sind repräsentative Graphen aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.4. Wirkmechanismen des heterodimeren Fusionsantikörpers CD19-TRAIL

Da TRAIL, als Ligand der Todesrezeptoren, ein potenter Induktor der Apoptose ist und monoklonale Antikörper vielfältige indirekte und direkte Wirkmechanismen induzieren können, sollte in folgenden *in vitro* Analysen geklärt werden, inwiefern der generierte CD19-TRAIL Fusionsantikörper auf CD19⁺-Zielzellen wirkt. Untersucht werden sollten dabei die anti-proliferativen bzw. Apoptose-induzierenden Effekte sowie die Fc-vermittelte Induktion von ADCC und ADCP durch CD19-TRAIL.

3.1.4.1. CD19-TRAIL vermittelt direkte anti-proliferative Effekte bei BCP-ALL-Zellen

Über Antikörperkonjugate können anti-tumorale Wirkstoffe, wie die Liganden der TRAIL-Rezeptoren, direkt zu den Zielzellen transportiert werden [193]. Daher wurde angenommen, dass über die Fusion von CD19-IgG1 an den Todesliganden TRAIL selektiv CD19⁺-Tumorzellen eliminiert werden. Um die Wirkung des am Antikörper fusionierten TRAIL auf die Zielzellen zu untersuchen, wurden die CD19⁺-BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 sowie die CD19⁻-T-ALL-Zelllinie CEM mit steigenden Konzentrationen CD19-TRAIL behandelt und die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Es zeigte sich ein Dosis-abhängiger, anti-proliferativer Effekt von CD19-TRAIL auf REH- und NALM-6-Zellen. Schon bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen wurde eine signifikante Reduktion der Zellvitalität beobachtet (REH: EC₅₀ = 0,0617nM bzw. NALM-6: EC₅₀ = 0,01746nM). Dabei wies CD19-TRAIL einen stärkeren anti-proliferativen Effekt in NALM-6-Zellen als in REH-Zellen auf, entsprechend der gemessenen CD19- und TRAIL-R2-Expressionslevel (vgl. Abb. 3.4). Im Vergleich zu CD19-TRAIL zeigte das Kontrollmolekül HER2-TRAIL, trotz geringer Bindung an die Zellen (vgl. Abb. 3.5), keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (Abb. 3.6A-B). Ebenfalls hatte die Behandlung mit HER2-TRAIL keinen Effekt auf die Vitalität der CD19⁻-Zelllinie CEM (Abb. 3.6C), bei der eine geringe Bindung von CD19-TRAIL und HER2-TRAIL gemessen wurde (vgl. Abb. 3.5).

Zur weiteren Verifizierung des Antigen-spezifischen Effektes von CD19-TRAIL wurde ein Blockierungsexperiment durchgeführt. Dabei wurde angenommen, dass über die Blockade des CD19-Epitops CD19-TRAIL nicht mehr an die Tumorzellen binden kann und diese somit nicht eliminiert werden. CD19⁻- und CD19⁺-Zellen wurden dafür mit dem parentalen CD19-IgG1-Antikörper in überschüssiger Konzentration vorbehandelt, um das CD19-Epitop zu maskieren. In der Tat führte die Blockade durch CD19-IgG1 zur Aufhebung des vitalitätsmindernden Effekts von CD19-TRAIL ($p = 0,05$). Erwartungsgemäß wurde bei CEM-Zellen kein Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet (Abb. 3.6D). Die Daten zeigen, dass CD19-TRAIL effektiv direkte Effekte auf BCP-ALL-Zellen vermittelt und dass dafür die Interaktion mit dem CD19-Zielzellantigen essentiell ist.

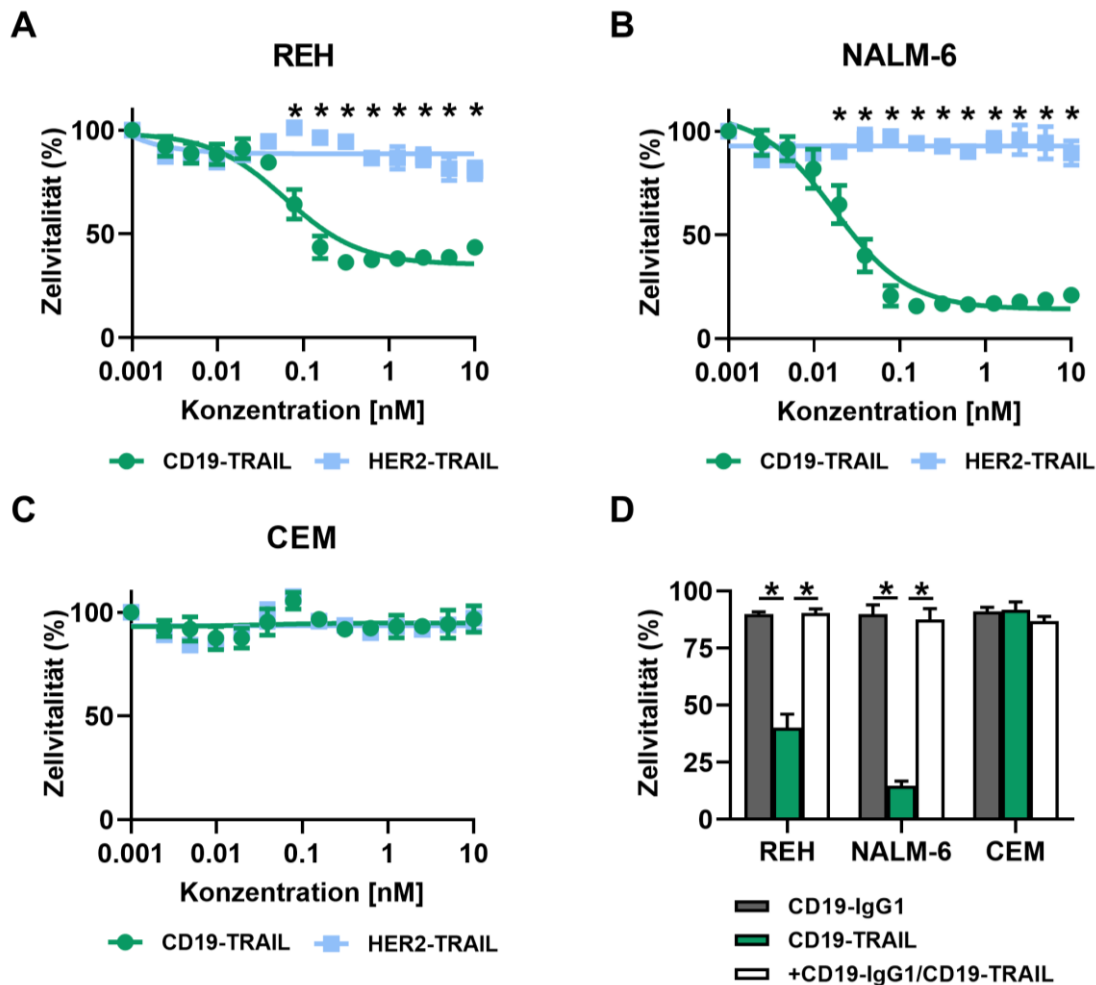


Abbildung 3.6: CD19-TRAIL vermittelt selektiv anti-proliferative Effekte auf CD19⁺-ALL-Zellen. Die CD19⁺-Zelllinien A) REH und B) NALM-6 sowie die C) CD19⁻-T-ALL-Zelllinie CEM wurden mit steigenden Konzentrationen CD19-TRAIL oder dem Kontroll-Antikörper HER2-TRAIL behandelt und die Vitalität der Zellen nach 72 h mittels MTT-Assay bestimmt. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur. D) Zur Verifizierung des CD19-spezifischen anti-proliferativen Potentials von CD19-TRAIL wurden REH-, NALM-6- und CEM-Zellen entweder mit 0,5 nM CD19-TRAIL, mit 10 nM CD19-IgG1 oder mit 100 nM des parentalen CD19-IgG1-Antikörpers, 1 h vor der Behandlung mit 0,5 nM CD19-TRAIL, inkubiert und die Vitalität der Zellen nach 72 h mittels MTT-Assay bestimmt. Mann-Whitney-U-Test. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$.

3.1.4.2. CD19-TRAIL induziert Apoptose in CD19⁺-BCP-ALL-Zellen

Als Ligand der Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 vermittelt TRAIL sein zytotoxisches Potential auf Zielzellen über die direkte Induktion der Apoptose [194]. Um zu prüfen, ob die Verminderung der Vitalität von BCP-ALL-Zellen nach Behandlung mit CD19-TRAIL tatsächlich auf Apoptose-Induktion zurückzuführen ist, wurden verschiedene Charakteristika apoptotischer Zellen nach CD19-TRAIL-Behandlung untersucht. Ein Kennzeichen apoptotischer Zellen ist der Verlust der Membranpolarität, welche durch die Exposition von Phosphatidylserinen auf der äußeren Lipidschicht der Zellmembran nachweisbar ist, die sonst in der Regel in die

zytoplasmatische Seite der Zelle gerichtet sind [195]. Um zu untersuchen, ob durch die Behandlung der Zellen mit CD19-TRAIL diese Veränderung in der Zellmembran nachzuweisen war, wurden die BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 mit CD19-TRAIL behandelt und über eine AnnexinV-Färbung Zelloberflächenexponierte Phosphatidylserine durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zur Differenzierung von früh- und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt, welches die DNA nicht intakter, sterbender Zellen färbt. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass CD19-TRAIL sowohl bei REH- als auch bei NALM-6-Zellen im Vergleich zur Kontrollbehandlung einen signifikanten, progressiven Anstieg früh-apoptotischer (AnnexinV⁺/PI⁻) Zellen bewirkt ($p < 0,05$; Abb. 3.7A-B). Nach 48 h ist besonders bei den NALM-6-Zellen eine anteilige Verminderung der früh-apoptotischen Zellen zu messen, da nun die meisten Zellen spät-apoptotisch sind (Abb. 3.7B).

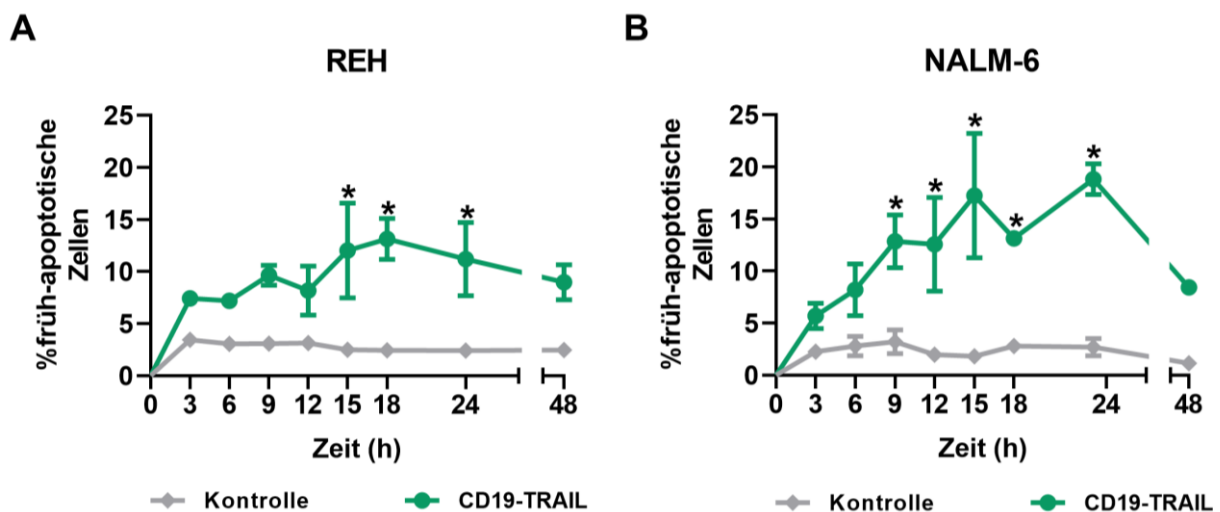


Abbildung 3.7: CD19-TRAIL eliminiert BCP-ALL-Zellen durch die Induktion von Apoptose. Die CD19⁺-Zelllinien A) REH und B) NALM-6 wurden mit 0,5 nM CD19-TRAIL bzw. mit PBS (Kontrolle) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die früh-apoptotische Zellpopulationen (AnnexinV⁺/PI⁻) durchflusszytometrisch mittels AnnexinV/PI Doppelfärbung bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur, * $p < 0,05$.

Um weiter zu verifizieren, dass die Wirksamkeit von CD19-TRAIL auf die Induktion der Apoptose zurückzuführen ist, wurden die BCP-ALL-Zellen mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD vorbehandelt und nach AnnexinV/PI Doppelfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl bei REH- als auch NALM-6-Zellen führte die Vorinkubation mit Z-VAD zu einer statistisch signifikanten Reduktion ($p = 0,05$) der toten Zellen auf das Niveau der Kontroll-behandelten Zellen ohne Antikörperkonstrukt (Abb. 3.8A-B).

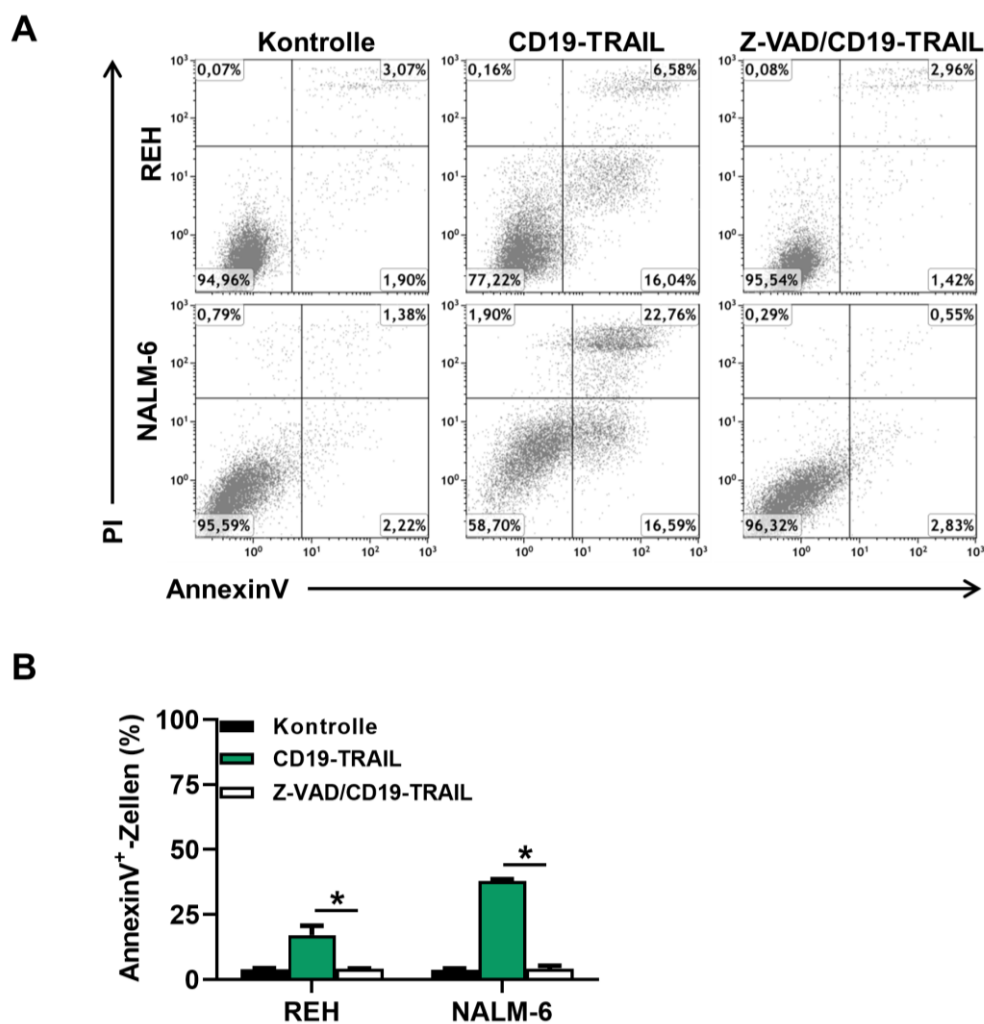


Abbildung 3.8: Z-VAD inhibiert den über CD19-TRAIL vermittelten Zelltod in ALL-Zellen. A-B) Zur Verifizierung der Apoptose-Induktion durch CD19-TRAIL wurden REH- und NALM-6-Zellen entweder mit DMSO (Kontrolle), 0,5 nM CD19-TRAIL oder mit 50 μ M des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD für 1 h vor CD19-TRAIL-Behandlung (0,5 nM) inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen nach AnnexinV/PI Doppelfärbung durchflusszytometrisch analysiert. A) Repräsentative Histogramme der Durchflusszytometrie. Die Werte im unteren rechten Quadranten kennzeichnen früh-apoptotische, die im oberen rechten Quadranten die spät-apoptotischen oder nekrotischen Zellen. B) Mittelwerte \pm SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Mann-Whitney-U-Test, * p = 0,05.

Ein weiteres Charakteristikum der Apoptoseinduktion ist die Spaltung pro-apoptotischer Faktoren, wie verschiedener Pro-Caspasen sowie der Poly-(ADP-Ribose) - Polymerase (PARP). Es wurde angenommen, dass CD19-TRAIL über die Bindung an die TRAIL-R die Aktivierung dieser Proteine bewirkt. Um dies untersuchen, wurden die CD19⁺-Zelllinien REH und NALM-6 sowie die CD19-Zelllinie CEM mit CD19-TRAIL behandelt und im Vergleich zu CD19-IgG1-, HER2-TRAIL- oder PBS-Behandlung mittels Western-Blot Analyse untersucht. Tatsächlich wurde sowohl in REH- als auch in NALM-6-Zellen die Spaltung (c) der Apoptosemarker PARP, Caspase 3, Caspase 7 und Caspase 9 nach CD19-TRAIL-Behandlung nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde in den CEM-Zellen kein Effekt von CD19-TRAIL beobachtet.

Ebenfalls bewirkten weder CD19-IgG1 noch HER2-TRAIL eine Spaltung der pro-apoptotischen Proteine (Abb. 3.9). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass CD19-TRAIL in CD19⁺-BCP-ALL-Zellen spezifisch Apoptose auslöst.

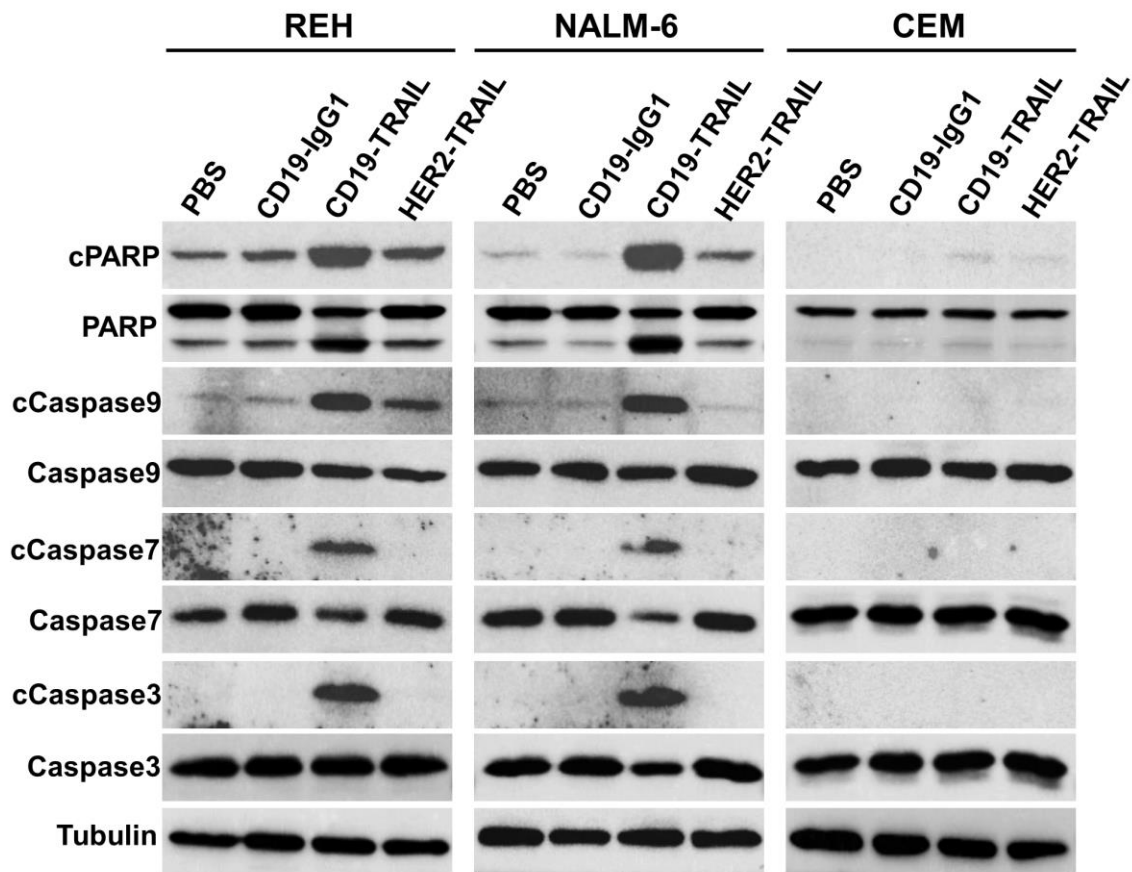


Abbildung 3.9: CD19-TRAIL induziert selektiv die Apoptose in CD19⁺-BCP-ALL-Zellen. Um den Effekt von CD19-TRAIL auf charakteristische Marker der Apoptose zu untersuchen, wurden die CD19⁺-Zelllinien REH und NALM-6 sowie die CD19-T-ALL-Zelllinie CEM mit PBS oder je 0,5 nM CD19-IgG1, CD19-TRAIL oder HER2-TRAIL behandelt und nach 48 h Zelllysate hergestellt. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die pro-apoptotischen Proteine Caspase 3, Caspase 7, Caspase 9 und PARP sowie deren Spaltungsprodukte (cCaspase 3, cCaspase 7, cCaspase 9 und cPARP) mittels Western-Blot und anschließender Immundetektion visualisiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.4.3. CD19-TRAIL zeigt keine Verstärkung von Effektor-Mechanismen im Vergleich zu einem nativen CD19-IgG1-Antikörper

Zu den indirekten Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper zählen Immunreaktionen, welche über den Fc-Teil eines Antikörpers induziert werden [193]. Dazu gehört unter anderem die Vermittlung der ADCC, welche vor allem von NK-Zellen initiiert wird. Um zu untersuchen, ob CD19-TRAIL NK-Zellen effektiv rekrutiert und so mittels ADCC die Lyse der Zielzellen induziert, wurden die CD19⁺-Zelllinien REH und

NALM-6 mit steigenden Konzentrationen CD19-TRAIL oder den Kontrollmolekülen CD19-IgG1 und HER2-TRAIL behandelt und $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuche durchgeführt. Als Effektorzellen wurden humane NK-Zellen von gesunden Spenderinnen/Spendern eingesetzt. Es zeigte sich, dass die CD19-gerichteten Antikörper in beiden Zelllinien Konzentrations-abhängig die spezifische Lyse der Tumorzelllinien induzierten (Abb. 3.10). Sowohl bei REH- als auch bei NALM-6-Zellen wies CD19-TRAIL eine vergleichbare zytotoxische Aktivität wie der parentale CD19-IgG1-Antikörper auf. Jedoch waren Unterschiede in der Stärke der Zellyse zwischen den untersuchten Zelllinien zu beobachten. Während die maximal erreichte Lyse bei REH-Zellen bei ca. 60 % lag, wurden bei den NALM-6-Zellen maximal nur etwa 30 % der Zellen lysiert (Abb. 3.10A-B). Die Dosis der halbmaximalen Lyse (EC_{50}) lag für beide Antikörper im piko-molaren Bereich. Bei den REH-Zellen lag der EC_{50} -Wert für CD19-TRAIL bei 10,06 pM und für CD19-IgG1 bei 10,86 pM (Abb. 3.10A). Die EC_{50} -Werte für behandelte NALM-6-Zellen lagen für CD19-TRAIL bei 20,10 pM und für CD19-IgG1 bei 24,24 pM (Abb. 3.10B). Mit dem Kontrollmolekül HER2-TRAIL wurde bei beiden Zelllinien erwartungsgemäß keine signifikante Zytotoxizität vermittelt. Diese Daten zeigen, dass die TRAIL-Domäne die Induktion der ADCC nicht beeinflusst und somit auch CD19-TRAIL in der Lage ist NK-Zellen zu rekrutieren und die Lyse der Zielzellen zu induzieren.

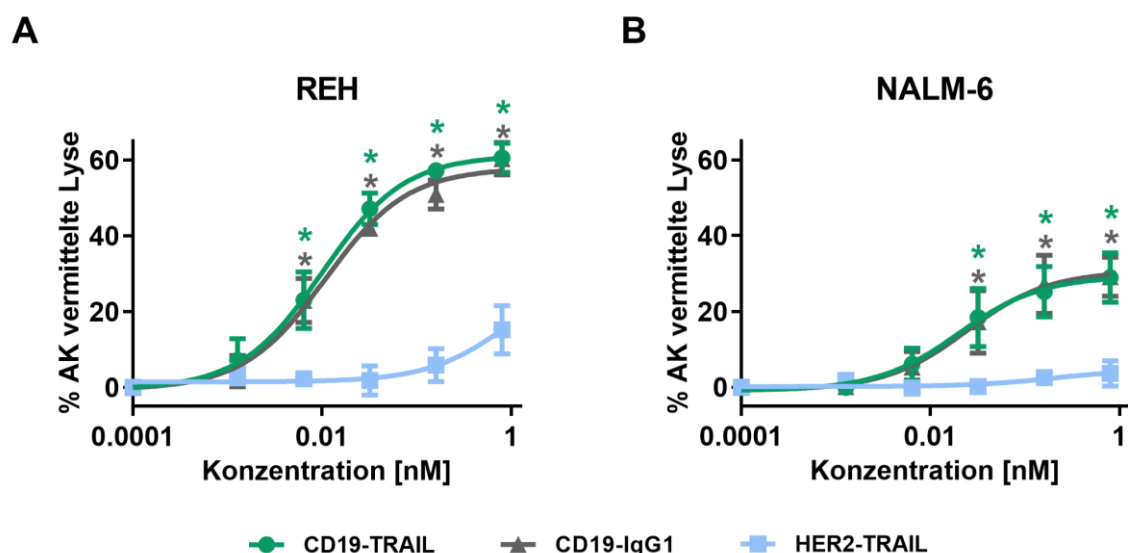


Abbildung 3.10: CD19-TRAIL vermittelt keine erhöhte Tumorzellyse. Um die ADCC von CD19-TRAIL zu untersuchen, wurden A) REH- und B) NALM-6-Zellen mit steigenden Konzentrationen CD19-TRAIL und CD19-IgG1 behandelt. Humane NK-Zellen wurden in einem Effektor zu Zielzell Verhältnis von 10:1 mit den entsprechenden Tumorzellen inkubiert. Die Antikörper vermittelte Lyse wurde nach 4 h mittels $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuch gemessen. HER2-TRAIL diente als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit NK-Zellen von unterschiedlichen gesunden Spenderinnen/Spendern. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur (CD19-TRAIL bzw. CD19-IgG1 vs. HER2-TRAIL), * $p < 0,05$.

Ein weiterer indirekter Wirkmechanismus von Antikörpern ist die Vermittlung der ADCP [193]. Die Exposition von Phosphatidylserinen auf der äußeren Lipidschicht der Zellmembran ist ein essentielles Erkennungssignal phagozytierender Zellen [196]. Da die Behandlung mit CD19-TRAIL zu einer Apoptose-abhängigen Phosphatidylserin-Translokation führt (vgl. Abb. 3.7 und 3.8), wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD19-TRAIL neben seiner Apoptose-fördernden Merkmale auch eine erhöhte Phagozytose von BCP-ALL-Zellen vermitteln sollte. Um zu untersuchen, ob CD19-TRAIL effektiv phagozytierende Zellen rekrutiert und somit die Aufnahme von Tumorzellen induziert, wurden REH- und NALM-6-Zellen mit CD19-TRAIL, CD19-IgG1 oder HER2-TRAIL behandelt und die Phagozytose von BCP-ALL-Zellen durch humane M0 Makrophagen gesunder Spenderinnen/Spender untersucht. Für REH-Zellen zeigte sich keine gesteigerte Phagozytose nach CD19-TRAIL- oder CD19-IgG1-Behandlung im Vergleich zum HER2-TRAIL Kontroll-Antikörper (Abb. 3.11). Bei den NALM-6-Zellen hingegen wurde eine signifikante Steigerung der ADCP über CD19-IgG1 im Vergleich zu HER2-TRAIL gemessen ($p = 0,05$). Auch CD19-TRAIL zeigte im Vergleich zu HER2-TRAIL eine Steigerung der Phagozytose, war jedoch weniger effizient als CD19-IgG1 (Abb. 3.11). Die vorliegenden Daten zeigen, dass CD19-TRAIL keine Steigerung der Phagozytose bewirkt.

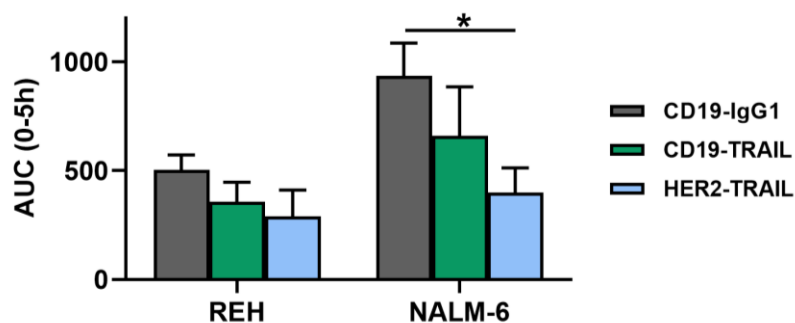


Abbildung 3.11: CD19-TRAIL vermittelt keine erhöhte Phagozytose. Die ADCP der CD19⁺-BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 wurde über einen Zeitraum von 5 h in einem Hochdurchsatz-Fluoreszenz-Mikroskop gemessen. Dafür wurden die Tumorzellen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff pHrodo markiert und zusammen mit, über MCSF differenzierte, humane M0 Makrophagen in einem Effektor zu Zielzell-Verhältnis von 1:1 und 10 µg/ml CD19-TRAIL oder CD19-IgG1 inkubiert. Die Phagozytose ist dargestellt als Fläche unter der Kurve (AUC) der relativen Anzahl roter Zellen pro Bild in einem Zeitintervall von 0-5 h. HER2-TRAIL diente als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit M0 Makrophagen von unterschiedlichen gesunden Spenderinnen/Spendern. Mann-Whitney-U-Test, * $p = 0,05$.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Versuche, dass die festgestellte Steigerung der anti-tumoralen Effektivität von CD19-TRAIL gegenüber CD19-IgG1 auf die spezifische Induktion der Apoptose in CD19⁺-Zellen zurückzuführen ist.

3.1.5. CD19-TRAIL ist wirksam bei der BCP-ALL in *in vivo* Xenograft-Mausmodellen

Ausgehend von der potenten pro-apoptotischen Effektivität von CD19-TRAIL *in vitro* sollte nun in folgenden Experimenten untersucht werden, ob CD19-TRAIL auch therapeutische Effekte auf BCP-ALL-Zellen *in vivo* zeigt. Es wurde postuliert, dass CD19-TRAIL CD19⁺-B-ALL-Zellen *in vivo* effektiv eliminiert und so das Überleben von mit BCP-ALL-Zellen transplantierten Tieren verlängert. Hierfür wurden BCP-ALL-Xenograftmodelle verwendet. REH- oder NALM-6-Zellen wurden intravenös in weibliche NSG-Mäuse injiziert und die Tiere an Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen mit CD19-TRAIL oder einer Vektorkontrolle therapiert (n = 6/Gruppe). Die Tiere wurden aus dem Versuch genommen, sobald sie Anzeichen einer Leukämie aufwiesen. In der Tat zeigte sich für die CD19-TRAIL behandelten Mäuse eine signifikante Verlängerung der mittleren Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowohl bei mit REH-Zellen transplantierten Tieren (48 vs. 34 Tage, p = 0,0009; Abb. 3.12A) als auch bei Tieren denen NALM-6-Zellen injiziert wurden (29 vs. 19,5 Tage, p = 0,0009; Abb. 3.12B). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass CD19-TRAIL *in vivo* effektiv BCP-ALL-Zellen eliminiert.

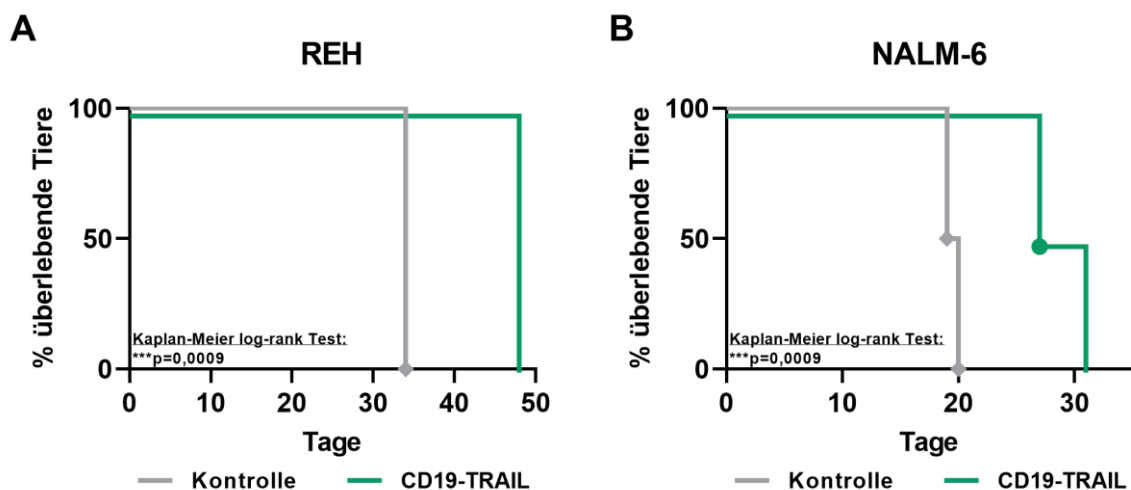


Abbildung 3.12: CD19-TRAIL verlängert das Überleben von BCP-ALL-transplantierten Mäusen. Weiblichen NSG-Mäusen wurden intravenös je $0,5 \times 10^6$ A) REH- oder B) NALM-6-Zellen transplantiert. An Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen wurden die Mäuse mit je 1,5 mg/kg CD19-TRAIL oder einer Vektorkontrolle intravenös behandelt (n = 6 Mäuse/Gruppe). Bei Anzeichen einer Leukämie (Detektion von >75 % leukämischen Blasten im peripheren Blut oder klinischen Leukämieanzeichen wie Gewichts- und Aktivitätsverlust, Organomegalie, und/oder Lähmung des Hinterleibs) wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und geopfert. Unterschiede im Überleben der Tiere wurde mittels Kaplan-Meier log-rank Test bestimmt. ***p=0,0009.

Vorausgehende Arbeiten in einem Tumormodel mit der Lymphom-Zelllinie Ramos zeigten einen anti-tumoralen Effekt von nativen CD19-IgG1-Antikörpern [122]. Auf Grundlage der *in vitro* Ergebnisse wurde angenommen, dass CD19-TRAIL auch *in vivo* ein erhöhtes anti-tumorales Potential im Vergleich zum nativen CD19-IgG1 aufweist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden REH- oder NALM-6-Zellen intravenös in NSG-Mäusen injiziert und die Tiere mit CD19-TRAIL bzw. CD19-IgG1 oder einer Vektorkontrolle therapiert (n = 5/Gruppe). Zum Zeitpunkt, an dem die Kontrolltiere Anzeichen einer Leukämie zeigten, wurde bei allen Tieren das Anwachsen leukämischer Zellen untersucht. Dafür wurde das Blut der mit NALM-6-Zellen injizierten Tiere bzw. das Knochenmark der mit REH-Zellen transplantierten Mäuse untersucht, da REH-Zellen nicht ins Blut von NSG-Mäusen ausschütten (eigene Beobachtung). Bei den mit REH-Zellen transplantierten Tieren konnte im Vergleich zur Vektorkontrolle eine signifikante Reduktion der leukämischen Last, sowohl über die Behandlung mit CD19-IgG1 als auch mit CD19-TRAIL gezeigt werden (Kontrolle 91,7 % vs. CD19-IgG1 38,3 %, p = 0,03; Kontrolle 91,7 % vs. CD19-TRAIL 17,7 %, p = 0,0079; Abb. 3.13A). Zusätzlich wurde festgestellt, dass CD19-TRAIL im Vergleich zu CD19-IgG1 eine signifikante Reduktion der leukämischen Blasten, sowohl bei den mit REH-Zellen transplantierten Tieren (38,3 % vs. 17,7 %, p = 0,047; Abb. 3.13A) als auch bei den Tieren, denen NALM-6-Zellen injiziert wurden (43,5 % vs. 24 %, p = 0,0079; Abb. 3.13B), bewirkte. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD19-IgG1 zwar gewisse anti-tumorale Effekte vermitteln kann, die Effizienz von CD19-TRAIL dem parentalen Antikörper jedoch signifikant überlegen ist.

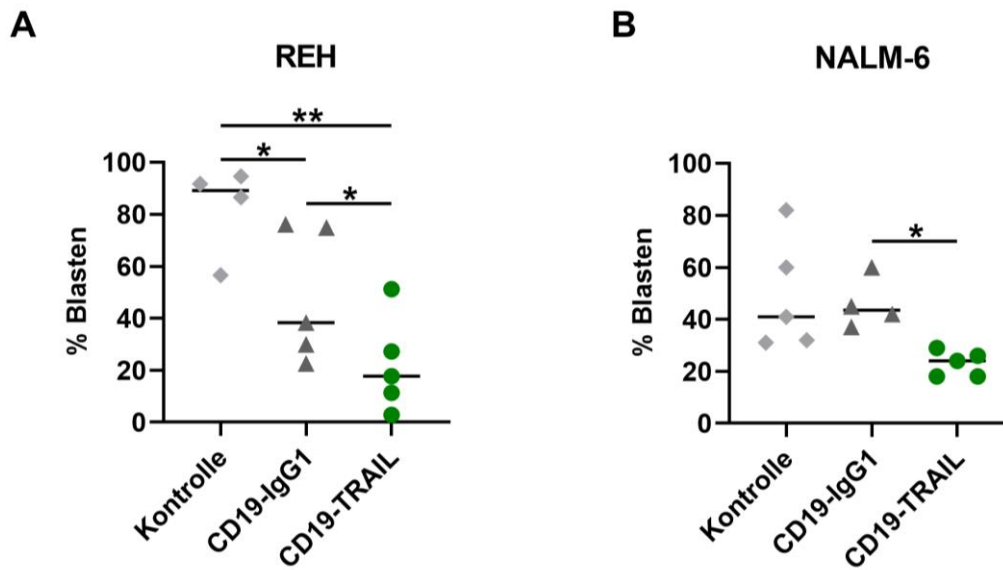


Abbildung 3.13: CD19-TRAIL zeigt stärkere anti-tumorale Effekte als der native CD19-IgG1-Antikörper in *in vivo* Xenograft-Mausmodellen. Weiblichen NSG-Mäusen wurden intravenös je $0,5 \times 10^6$ A) REH- oder B) NALM-6-Zellen transplantiert und an den Tagen +1, +3, +6, +10, +13 sowie an allen folgenden 7 Tagen mit je 1,5 mg/kg CD19-IgG1, CD19-TRAIL oder einer Vektorkontrolle intravenös behandelt. A) An Tag +32 wurde das Anwachsen der REH-Zellen im Knochenmark mittels durchflusszytometrischer Detektion von humanen CD45⁺- und murinen CD45⁻-Zellen untersucht. Gezeigt sind die relative leukämische Blastenlast von n = 5 Mäusen. B) Aufgrund fehlender CD45-Expression auf NALM-6-Zellen, wurden bei den mit NALM-6-Zellen transplantierten Mäusen die Blastenlast morphologisch über das Differentialblutbild bestimmt. Dafür wurden die mit CD19-IgG1 sowie die mit CD19-TRAIL behandelten Tieren an Tag +21 sowie den Kontrollen nach Opfung (Tag +19) Blut entnommen. Gezeigt sind die relative leukämische Blastenlast von n = 5 Mäusen, Mann-Whitney-U-Test, *p<0,05, **p<0,01.

Um weiterhin zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse aus den *in vivo* Versuchen mit Xenograftmodellen mit REH- und NALM-6-Zellen auch auf Proben von BCP-ALL-Patientinnen/Patienten übertragen lassen, sollte die Effizienz von CD19-TRAIL ebenfalls in PDX-Mausmodellen getestet werden. Dafür wurde zunächst die Oberflächenexpression von CD19 sowie die der TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in 14 zufällig ausgewählten PDX-Proben von BCP-ALL-Patientinnen/Patienten (Tabelle 3.1) mittels quantitativer indirekter Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. In allen PDX-Proben konnte eine Oberflächenexpression von CD19 festgestellt werden, die zwischen den unterschiedlichen PDX-Proben deutlich variierte (Abb. 3.14A, Tabelle 3.1). Die höchste Expression zeigte PDX 2 (mSABC = 6738), während PDX 12 (mSABC = 876) die verhältnismäßig niedrigste Expression aufwies (Abb. 3.14A, Tabelle 3.1). Neben CD19 zeigten alle PDX-Proben ebenfalls eine Expression von TRAIL-R1 (Abb. 3.14B, Tabelle 3.1), auch diese variierte zwischen den verschiedenen PDX-Proben und erreichte Werte zwischen mSABC = 215 für PDX 7 und mSABC = 2005 für PDX 6. Außer bei PDX 1 (mSABC = 206) wurde bei keinem der untersuchten PDX-Proben eine Expression von TRAIL-R2 detektiert (Abb. 3.14B, Tabelle 3.1).

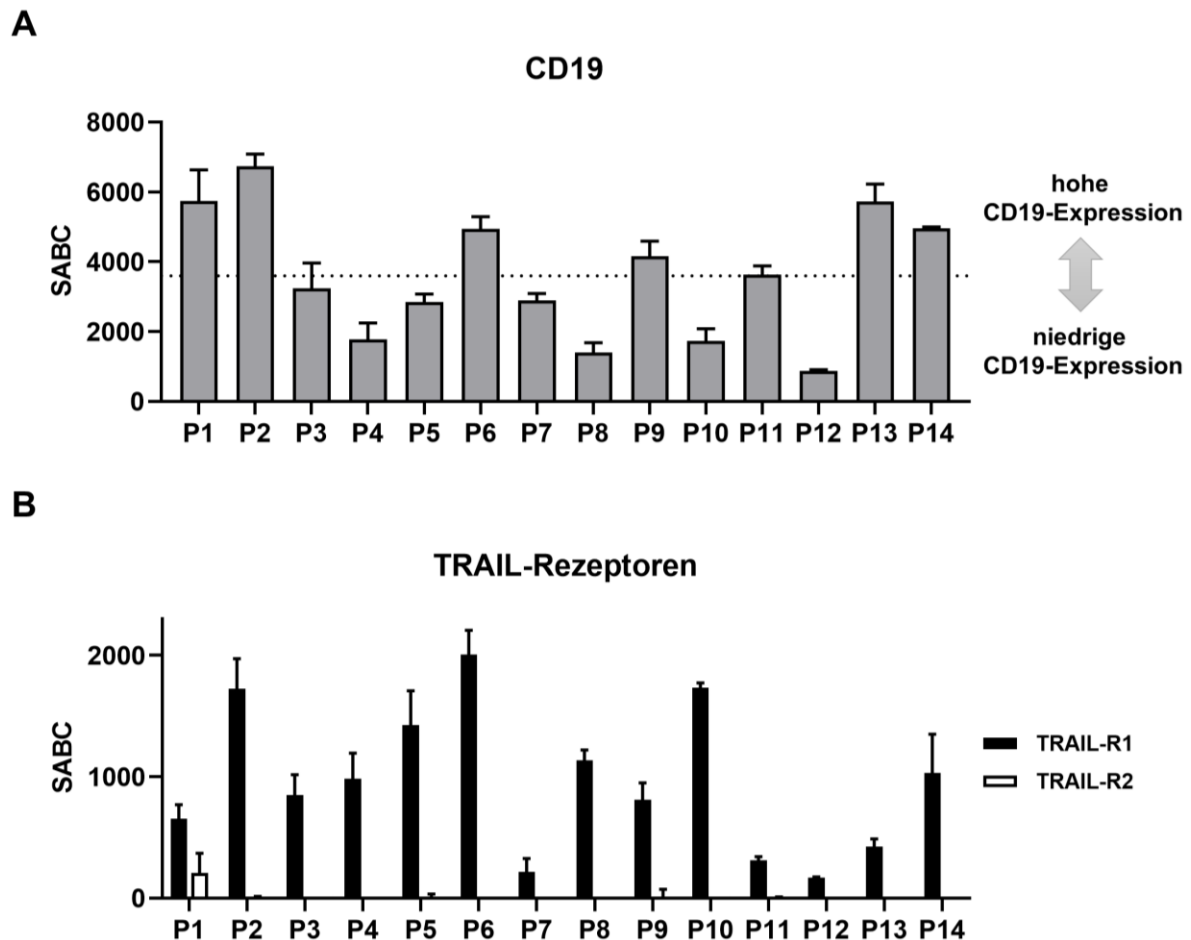


Abbildung 3.14: Expressionsprofil des CD19-Antigens und der TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) auf BCP-ALL-PDX-Proben. Quantifizierung der Oberflächenexpression von A) CD19 (gestrichelte Linie zeigt die mittlere CD19-Expression an) und B) TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 von 14 PDX-Proben mittels QIFIKIT®. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten; SABC: *specific antibody binding capacity*, P: *patient-derived xenograft* (PDX).

Da alle untersuchten PDX-Proben eine CD19 und TRAIL-R-Expression aufwiesen, wurde erwartet, dass sie auf die Therapie mit CD19-TRAIL *in vivo* ansprechen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden vier repräsentative PDX-Proben ausgewählt, die über unterschiedliche CD19-Expressionen verfügten (zwei mit hoher (PDX 1, PDX 2), eine mit mittlerer (PDX 3) und eine mit niedriger Expression (PDX 4)). Je 5 Mäuse wurden mit CD19-TRAIL bzw. einer Vektorkontrolle an Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen therapiert. Der Zustand der Tiere wurde über den Versuchszeitraum von 160 Tagen beobachtet und bei Anzeichen einer Leukämie wurden die Tiere aus dem Versuch genommen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigten alle vier PDX-Proben eine signifikante Verlängerung des Überlebens. Bei PDX 1 wurden alle Kontrolltiere an Tag 80 aufgrund sicherer Leukämiemerkmale geopfert, während keines der mit CD19-TRAIL behandelten Tiere, bis zum Ende des Versuchs an Tag 160, klinische Zeichen einer Leukämie entwickelt

hatte ($p = 0,0035$; Abb. 3.15A). Weiterhin wurde für PDX 2 eine mittlere Überlebensverlängerung der mit CD19-TRAIL behandelten Mäuse von 35 Tagen im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet (112 vs. 77 Tage; $p = 0,0027$; Abb. 3.15B). Gegenüber den Kontrolltieren wiesen die mit CD19-TRAIL-behandelten Mäuse von PDX 3 eine mittlere Überlebensrate von 39 Tagen auf (115 vs. 154 Tage; $p = 0,0023$, Abb. 3.15C). Auch die mit CD19-TRAIL behandelten Tiere von PDX 4 zeigten eine signifikante Steigerung der mittleren Überlebensrate von 32 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (90 vs. 58 Tage; $p = 0,0023$, Abb. 3.15D). Bei PDX 3 und 4 waren zudem bei 2 von 5 Tieren, die mit CD19-TRAIL behandelt wurden, auch an Tag 160 keine Anzeichen einer Leukämie zu erkennen (Abb. 3.15C-D). Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche zeigen, dass CD19-TRAIL effizient und gezielt CD19⁺-BCP-ALL-PDX-Zellen eliminierte und das Überleben von BCP-ALL-Xenografts signifikant verlängert.

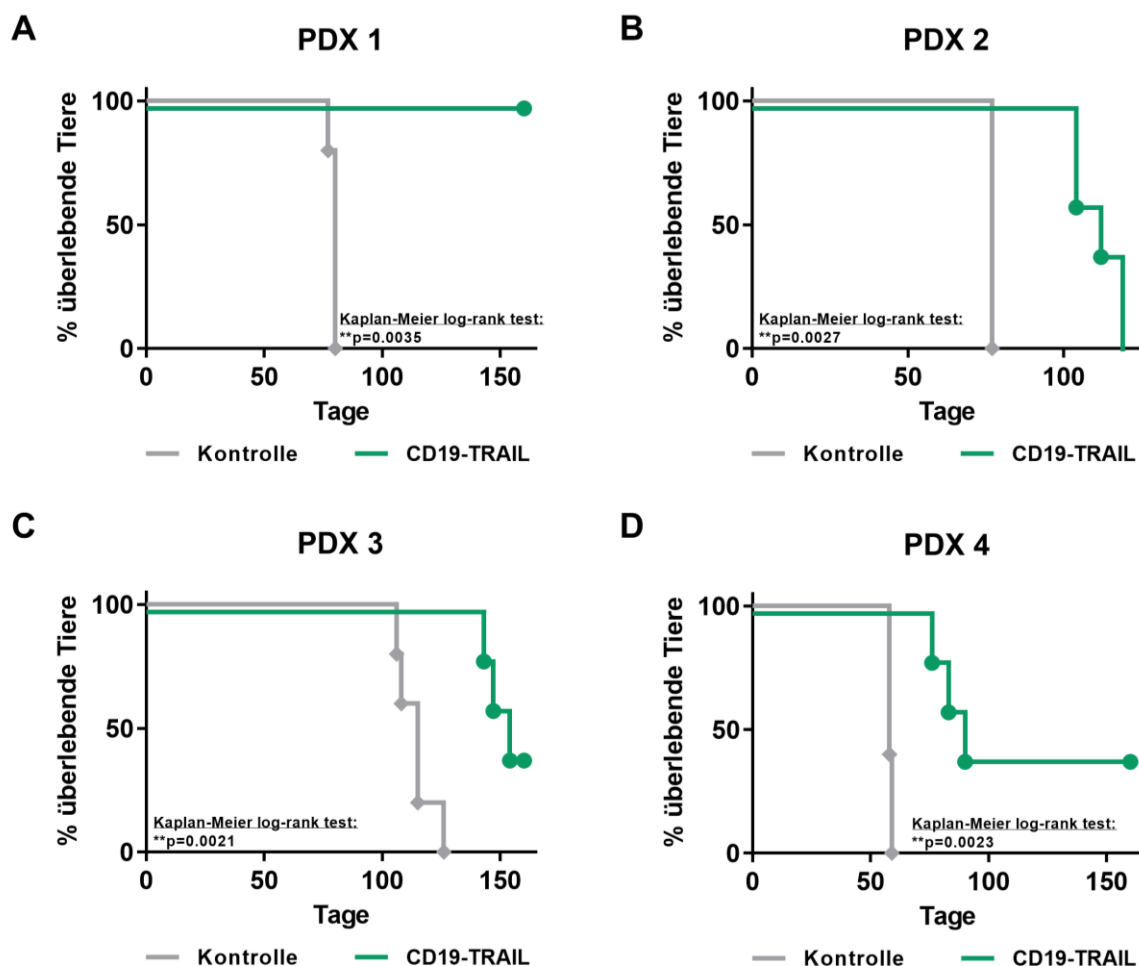


Abbildung 3.15: CD19-TRAIL verlängert das Überleben von BCP-ALL-Xenografts. A-D) Überlebenskurven von weiblichen NSG-Mäusen intravenös injiziert mit je 1×10^5 PDX-Zellen von vier Patientinnen/Patienten. An Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen wurde die Tiere mit je 1,5 mg/kg CD19-TRAIL oder einer Vektorkontrolle intravenös behandelt ($n = 5$ Mäuse/Gruppe). Bei Anzeichen einer Leukämie wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und geopfert. Unterschiede im Überleben der Tiere wurde mittels Kaplan-Meier log-rank Test bestimmt, ** $p < 0,005$.

Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse der vier ausgewählten PDX-Proben wurde nun die Wirksamkeit von CD19-TRAIL in einem größeren Spektrum von ALL-Subgruppen untersucht. Es wurde angenommen, dass CD19-TRAIL in einer weiten Bandbreite an CD19⁺-PDX-Proben mit verschiedenen Zytogenetiken ebenfalls therapeutische Effizienz zeigt. Um dies zu untersuchen, wurde eine prä-klinische Phase II-ähnliche PDX-Studie durchgeführt. Dafür wurden 1×10^5 PDX-Zellen, generiert aus $n = 10$ PDX-Proben (3x BCR-ABL1, 3x MLL-rearrangiert, 4x E2A-PBX1; PDX 1-10, Tabelle 3.1), in je zwei NSG-Mäuse injiziert und zufällig in die Kontroll- oder Behandlungsgruppe eingeteilt. Die Tiere wurden an Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen mit CD19-TRAIL bzw. einer Vektorkontrolle therapiert und die Tiere aus dem Versuch genommen, wenn sie die oben genannten Anzeichen einer offenen Leukämie zeigten.

Für beide Mäuse eines jeweiligen PDX wurde sowohl die Blastenlast im peripheren Blut am Tag der Opferung der Kontrollmaus als auch die Überlebensdauer analysiert. Für die Blutblasten-Analyse zeigte sich für alle PDX-Mäuse gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren eine signifikant niedrigere Blastenlast in CD19-TRAIL behandelten Tieren (66,1 vs. 12,4, $p = 0,002$, Abb. 3.16A). Bei einer Maus konnte zum Zeitpunkt des Versterbens kein Blutausschick angefertigt werden, daher wurden hier Blutwerte miteinander verglichen, die zeitnah zum Versterben des Tieres angefertigt wurden (PDX 10 30 % vs. 7%; Abb. 3.16A). Außerdem verstarb eines der mit CD19-TRAIL behandelten Tiere unmittelbar nach der Antikörpergabe, 12 Tage vor der dazugehörigen Kontrollmaus (PDX 9 34 vs. 46 Tage). Zum Zeitpunkt des Versterbens wurden sowohl im Knochenmark als auch in der Milz der CD19-TRAIL behandelten Maus eine hohe Blastenlast gemessen (74 % bzw. 64 %). Im Blut waren jedoch im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger Leukämiezellen vorhanden (45 % vs. 11 %).

Tabelle 3.1: Klinische Charakteristika von BCP-ALL-PDX-Proben und Expressionsprofile von CD19 und TRAIL-R1/2

PDX	Alter (J)	Sex	WBC	MRD-Risiko	Zytogenetik	ZNS-Status	CD19 (mSABC)	TRAIL-R1 (mSABC)	TRAIL-R2 (mSABC)
1	16,9	w	2	HR	BCR-ABL1+	3c	5735	654	206
2	9,8	w	3	HR	BCR-ABL1+	1	6738	1726	0
3	10,3	m	1	IR	E2A-PBX1+	1	3239	848	0
4	0,3	w	4	HR	MLLr	1	1772	985	0
5	9,1	m	1	HR	BCR-ABL1+	1	2847	1424	0
6	8,2	m	2	SR	E2A-PBX1+	1	4948	2005	0
7	14,9	m	2	SR	E2A-PBX1+	1	2899	215	0
8	0,4	w	4	SR	MLLr	1	1405	1134	0
9	0,2	w	4	n.v.	MLLr	n.v.	4164	811	0
10	3,1	w	3	SR	E2A-PBX1+	1	1731	1733	0
11	10,4	m	3	SR	E2A-PBX1+	2a	3624	312	0
12	3,5	m	1	SR	ETV6-RUNX1	2a	876	170	0
13	4,8	m	3	SR	ETV6-RUNX1	1	5731	427	0
14	5,6	m	3	HR	ETV6-NTRK	1	4952	1031	0

PDX: *Patient-derived Xenograft*; J: Jahre; w: weiblich; m: männlich; WBC: *white blood cell count* (**1**: <10.000, **2**: ≥10.000 <50.000, **3**: ≥50.000 <100.000, **4**: ≥100.000 Leukozyten bei Diagnose); MRD: *minimal residual disease* (Risikostratifizierung nach MRD-Risikogruppen: SR: standard, IR: intermediär, HR: hoch); *MLLr*: *Mixed-lineage leukemia-rearranged*; ZNS: zentrales Nervensystem (Klinische Definition des ZNS-Status gemäß des ALL-BFM 2009-Protokolls, **1**: weder klinische noch radiologische Anzeichen einer ZNS-Beteiligung und keine Blasten im Zytospin der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF); **2**: weder klinische noch radiologische Anzeichen einer ZNS-Beteiligung und **2a**: <10/μl Erythrozyten (RBC) und kein makroskopisches Blut; ≤ 5/μl weiße Blutkörperchen (WBC); positive Blasten im Zytospin; **2b**: makroskopisches Blut und/oder ≥ 10/μl RBCs; >5/μl WBCs; positive Blasten im Zytospin; **2c**: makroskopisches Blut und/oder ≥ 10/μl RBCs; >5/μl WBCs; positive Blasten im Zytospin; negativ gemäß Algorithmus WBC/RBC im CSF < 2x WBC/RBC im Blut; **3a**: kein makroskopisches Blut; <10/μl RBCs; >5/μl WBCs; positive Blasten im Zytospin; **3b**: makroskopisches Blut und/oder ≥ 10/μl RBCs; >5/μl, positive Blasten im Zytospin; positiv gemäß Algorithmus WBC/RBC im CSF > 2x WBC/RBC im Blut; **3c**: klinische Zeichen einer ZNS-Beteiligung, radiologisch nachweisbare zerebrale Läsion, Netzhautinfiltrationen); mSABC: *median specific antibody binding capacity*; n.v. Daten nicht vorhanden.

Darüber hinaus bewirkte die Therapie mit CD19-TRAIL eine Verlängerung der mittleren Überlebensrate um 17 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe (90 vs. 73 Tage, $p = 0,0731$; Abb. 3.16B). An Tag 160 wurde das Experiment beendet. Während bis zu diesem Zeitpunkt alle Kontrolltiere geopfert werden mussten, verstarben nur 7 von 10 mit CD19-TRAIL behandelten Tiere vor Ende des Beobachtungszeitraums von 160 Tagen. Die übrigen 3 der 10 behandelten Tiere (PDX 1 (BCR-ABL1+), PDX 5 (BCR-ABL1+), PDX 7 (E2A-PBX1+); Tabelle 3.1) zeigten auch an Tag 160 keine Leukämieanzeichen. Im Knochenmark der CD19-TRAIL behandelten Tiere konnten keine Blasten detektiert werden, was für eine Heilung der Tiere durch CD19-TRAIL-Therapie spricht (Abb.3.16C).

Mit Ausnahme einer Maus, die mutmaßlich ein akutes Tumorlyse-Syndrom nach Antikörpergabe entwickelte, zeigten CD19-TRAIL-behandelte Mäuse keine sichtbaren Zeichen von Nebenwirkungen unter Therapie, wie z.B. Apathie, Gewichtsverlust oder verfrühtes Versterben, was für eine gute Verträglichkeit der CD19-TRAIL-Therapie im Mausmodell spricht.

Diese Daten zeigen eine deutliche Effizienz von CD19-TRAIL *in vivo* und deuten darauf hin, dass der Antikörper in einer Reihe von BCP-ALL-Patientinnen/Patienten und in verschiedenen zytogenetischen Subtypen wirksam sein könnte.

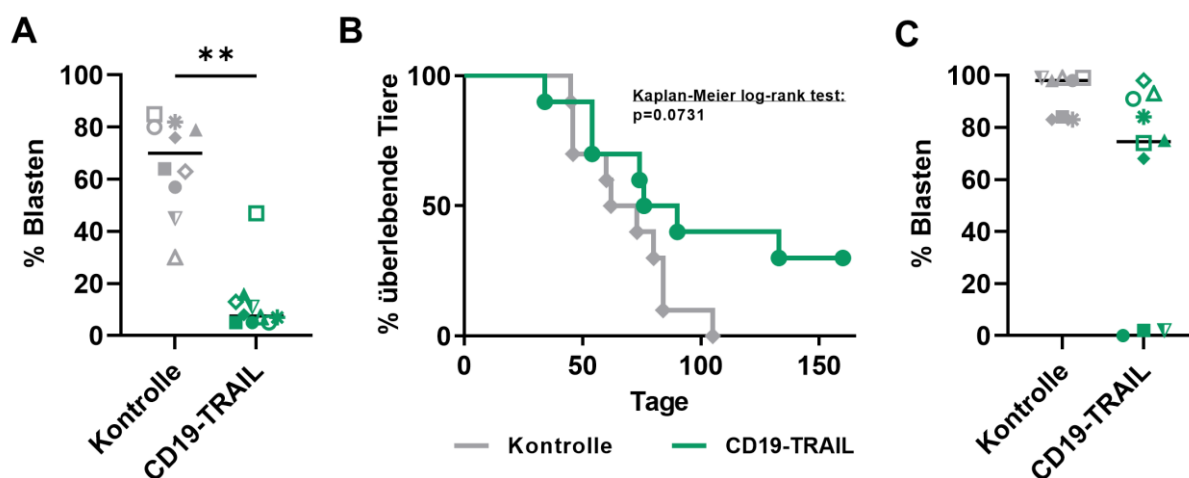


Abbildung 3.16: CD19-TRAIL ist wirksam in einer prä-klinischen Studie mit BCP-ALL-Xenografts. A-B) Je 1×10^5 PDX-Zellen von $n = 10$ BCP-ALL-Patientinnen/Patienten (Tabelle 3.1) wurden an Tag 0 in zwei weibliche NSG-Mäuse injiziert und diese zufällig in eine Kontrollgruppe oder eine Behandlungsgruppe (CD19-TRAIL) eingeteilt. Je $1,5 \text{ mg/kg}$ CD19-TRAIL bzw. eine entsprechende Vektorkontrolle wurde an den Tagen +1, +3, +6, +10, +13 sowie an allen folgenden 7 Tagen intravenös verabreicht. Tiere, die Anzeichen einer Leukämie zeigten, wurden aus dem Versuch genommen und geopfert. A) Detektion der Blastenlast im peripheren Blut der Mäuse am Tag der Opferrung der Kontrolltiere. Individuelle Symbole repräsentieren PDX-Material von entsprechenden Patientinnen/Patienten. Wilcoxon-Test. $**p = 0,002$. B) Überlebensanalyse von PDX-Mäusen. Unterschiede im Überleben der Tiere wurde mittels Kaplan-Meier log-rank Test bestimmt. C) Detektion der Blastenlast im Knochenmark am Tag der Opferrung. Individuelle Symbole repräsentieren PDX-Material von entsprechenden Patientinnen/Patienten.

Einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD19 und der TRAIL-R1/2 und dem Therapieansprechen war bei diesen 10 PDX-Proben nicht zu beobachten. So wies PDX 7 beispielsweise nur eine durchschnittliche CD19-Expression sowie die im Vergleich geringste TRAIL-R1-Expression auf, gehörte aber zu den Tieren, die auch an Tag 160 keine Leukämieanzeichen und somit ein sehr gutes Ansprechen auf CD19-TRAIL zeigte. Bei PDX 6, welches die höchste TRAIL-R1-Expression sowie eine hohe CD19-Expression zeigte, ergab sich hingegen nur ein schwaches Ansprechen auf CD19-TRAIL. Hier lebte die mit CD19-TRAIL behandelte Maus nur 9 Tagen länger als die Kontrollmaus (vgl. Abb. 3.14 A-B, Abb. 3.16, Tabelle 3.1).

3.1.6. Venetoclax potenziert den zytotoxischen Effekt von CD19-TRAIL in BCP-ALL-Zellen

Für die BCP-ALL-Zelllinie REH sowie für einige der untersuchten PDX-Proben konnte in den vorangegangenen Experimenten eine reduzierte Sensitivität gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose beobachtet werden. Die Apoptose von Zellen kann neben der Aktivierung der Todesliganden auch durch die Wechselwirkung von pro- und anti-apoptotischen Faktoren reguliert werden. Für das Protoonkogen Bcl-2 ist bekannt, dass es in verschiedenen leukämischen Erkrankungen überexprimiert vorliegt und mit einer TRAIL-Resistenz assoziiert ist [190,197–199]. Es wurde angenommen, dass die reduzierte Apoptose-Induktion durch CD19-TRAIL, die für die BCP-ALL-Zelllinie REH beobachtet wurde, unter anderem durch eine erhöhte Bcl-2-Expression erklärt werden kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden mittels Western-Blot Analysen die Expressionslevel von Bcl-2 in REH- und NALM-6-Zellen analysiert. Außerdem wurde die Expression des anti-apoptotischen Faktors Mcl-1 untersucht, da dessen Überexpression mit einer Resistenz gegen Bcl-2-Inhibitoren in Verbindung steht [200]. Während REH-Zellen eine starke Bcl-2 sowie eine schwache Mcl-1-Expression zeigten, war in NALM-6-Zellen ein diametrales Expressionsmuster von Bcl-2 und Mcl-1 feststellbar, mit einer geringen Bcl-2-Expression bei gleichzeitig erhöhter Mcl-1-Expression (Abb. 3.17). Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung für die reduzierte CD19-TRAIL induzierte Apoptose in den REH-Zellen darstellen.

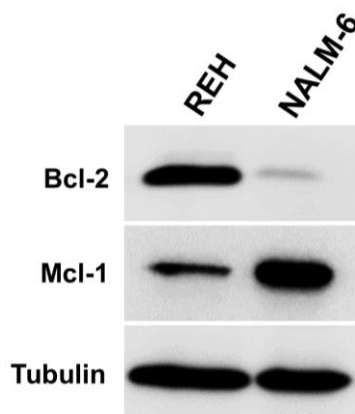


Abbildung 3.17: REH-Zellen exprimieren das Protoonkogen Bcl-2. Western-Blot Analyse der Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 der Zelllinien REH und NALM-6. Aufgetragen sind je 25 µg Gesamtprotein. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Der klinisch zugelassene Bcl-2-Inhibitor VTX stimuliert den intrinsischen Signalweg, indem es an Bcl-2 bindet und so die Freisetzung von pro-apoptotischen Regulatorproteinen bewirkt [201,202]. Es wurde erwartet, dass entsprechend ihres Bcl-2/Mcl-1-Expressionsmusters REH-, nicht jedoch NALM-6-Zellen auf eine VTX-Behandlung reagieren würden. Um dies zu untersuchen, wurde die Vitalität von REH- und NALM-6-Zellen nach Monotherapie mit VTX mittels MTT-Assay bestimmt. Tatsächlich waren deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien nach VTX-Applikation zu beobachten. Während VTX bei den REH-Zellen schon bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen eine deutliche Reduktion der Zellvitalität erzielte ($EC_{50} = 6 \text{ nM}$, Abb. 3.18A), zeigten NALM-6 lediglich ein schwaches Ansprechen auf VTX und auch bei einer der maximalen getesteten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde nur eine Reduktion der Vitalität um etwa 55 % beobachtet (Abb. 3.18B).

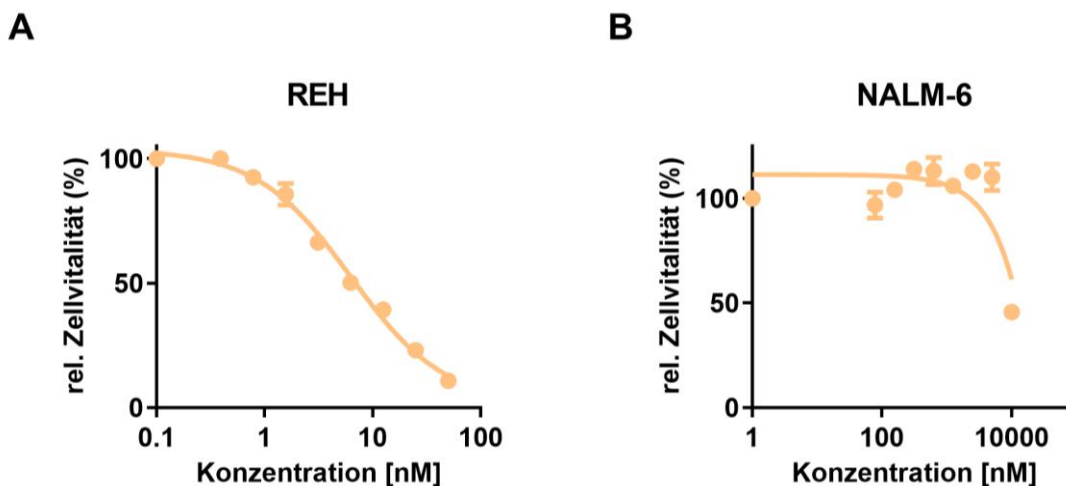


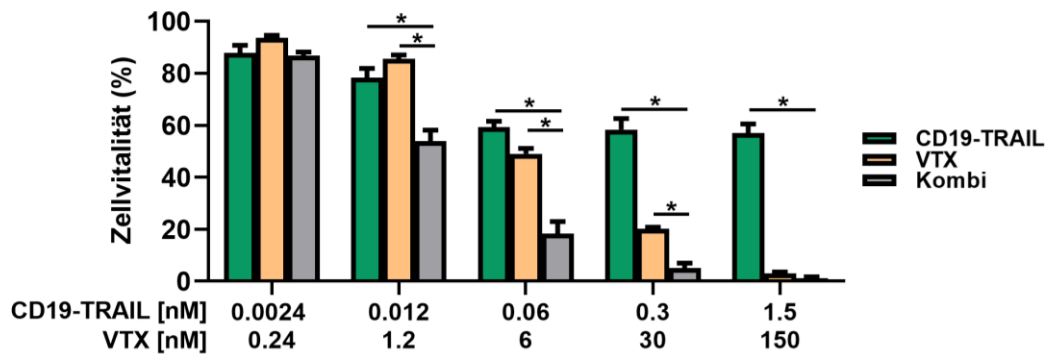
Abbildung 3.18: Der Bcl-2 Inhibitor VTX zeigt anti-proliferative Effekte in CD19⁺-REH-Zellen. Die BCP-ALL-Zelllinien A) REH und B) NALM-6 wurden mit steigenden Konzentrationen VTX behandelt und die Vitalität der Zellen nach 72 h mittels MTT-Assay bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass VTX einerseits die Apoptose von Tumorzellen direkt induzieren kann und darüber hinaus in der Lage ist, TRAIL-resistente Tumorzellen für die Apoptose-Induktion durch TRAIL zu resensitivieren [203,204]. Aufgrund der festgestellten Sensitivität der REH-Zellen gegenüber VTX wurde daher angenommen, dass durch die zusätzliche Applikation von VTX ein weiterer Apoptosestimulus induziert wird und so die therapeutische Effizienz von CD19-TRAIL in REH-Zellen weiter gesteigert werden kann. Dafür wurden die REH-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (5-fache Verdünnung ausgehend von den EC_{50} Werten) von CD19-TRAIL, VTX oder der Kombination der beiden behandelt und die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die

Monoapplikation von CD19-TRAIL und VTX zeigte dabei jeweils eine Dosis-abhängige Reduktion der Zellvitalität. Diese wurde durch die Kombination der beiden Substanzen signifikant gesteigert ($p < 0,05$; Abb. 3.19A). Mit Hilfe der Synergismus-Analyse nach Chou und Talalay [205] wurde nun berechnet, ob der beobachtete kombinatorische Effekt der beiden Substanzen synergistisch oder lediglich additiv ist. Dafür wurde der Kombinationsindex (CI) jedes Kombinations-Datenpunkts berechnet. CI-Werte < 1 wurden als synergistisch bewertet. Für alle gemessenen Datenpunkte, außer für die Kombination der niedrigsten Konzentrationen, von CD19-TRAIL und VTX konnte eine synergistische Beeinflussung von CD19-TRAIL und VTX festgestellt werden (Abb. 3.19B-C).

Um zu validieren, dass der Kombinationseffekt von VTX und CD19-TRAIL mit der Expression von Bcl-2 assoziiert ist, wurden auch NALM-6-Zellen (niedrige Bcl2-Expression) mit steigenden Konzentrationen von CD19-TRAIL, ausgehend von dem festgestellten EC_{50} -Wert, oder mit $10 \mu\text{M}$ VTX bzw. der Kombination der beiden Substanzen behandelt und die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die Monoapplikation von CD19-TRAIL wies dabei eine Dosis-abhängige Reduktion der Zellvitalität auf, während die Einzel-Behandlung der Zellen mit VTX nur eine Reduktion der Zellvitalität um etwa 60 % zeigte. Ein verstärkter Effekt auf die Zellvitalität durch eine kombinierte Verabreichung von CD19-TRAIL und VTX gegenüber den Monoapplikationen zeigte sich lediglich für die Kombination von $0,006 \text{ nM}$ CD19-TRAIL und $10 \mu\text{M}$ VTX ($p < 0,05$, Abb. 3.19D). Für die anderen Datenpunkte war die Kombination der beiden Substanzen jeweils nur zu CD19-TRAIL oder VTX signifikant erhöht (Abb. 3.19D).

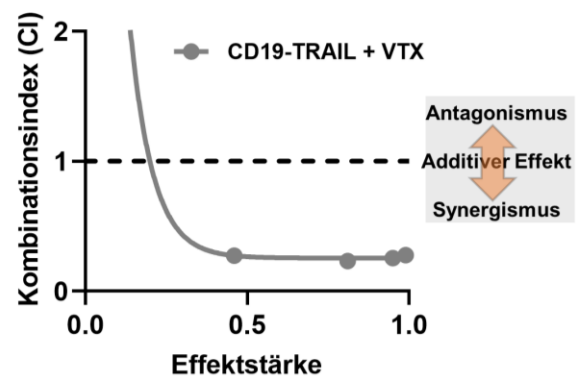
A



B

CD19-TRAIL [nM]	VTX [nM]	Effekt (%)	CI Value
1,5	150	99	0.27692
0,3	30	95	0.25490
0,06	6	81	0.23330
0,012	1,2	46	0.27403
0,0024	0,24	13	2.23561

C



D

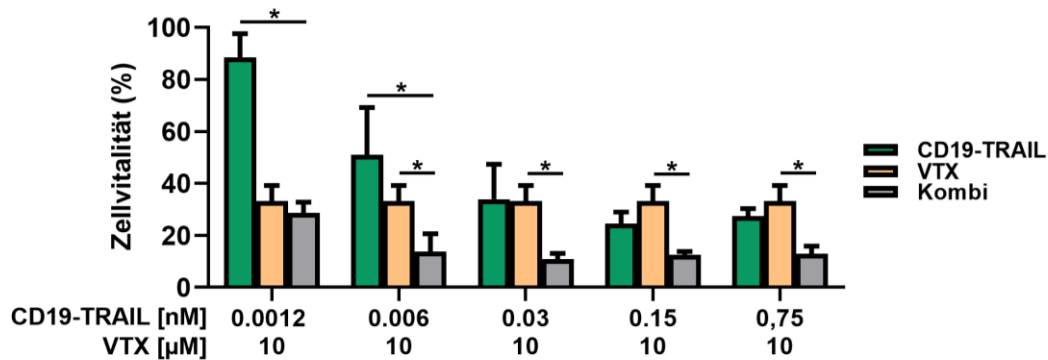


Abbildung 3.19: Der CD19-TRAIL vermittelte Zelltod von REH-Zellen wird durch die Kombination mit VTX synergistisch erhöht. A-C) REH-Zellen wurden mit steigender Konzentration CD19-TRAIL, VTX oder der Kombination beider Substanzen behandelt und nach 72 h die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. A) MTT-Assay der Einzel-Behandlungen sowie der Kombination aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. B) Berechnung des Kombinationsindex (CI) für jeden individuellen Datenpunkt mit Hilfe der CompuSyn Software. C) Über die CompuSyn Software generierter CI-Plot, bei dem der CI gegen die Effektstärke der Kombination aus CD19-TRAIL und VTX aufgetragen ist. Synergismus ist deklariert mit einem $CI < 1$, $CI = 1$ entspricht einem additiven Effekt und ein $CI > 1$ zeigt einen antagonistischen Effekt an. D) NALM-6-Zellen wurden mit steigender CD19-TRAIL-Konzentration, mit $10 \mu\text{M}$ VTX oder der Kombination von CD19-TRAIL und $10 \mu\text{M}$ VTX behandelt und mittels MTT-Assay die Vitalität der Zellen nach 72 h bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur, $*p < 0,05$.

Um die synergistische Wirkungsweise der VTX/CD19-TRAIL-Kombination weiter zu untersuchen, wurden die Proteinlevel von PARP, Caspase 3, Caspase 7 und Caspase 9 sowie dessen Spaltungsprodukte in REH- und NALM-6-Zellen nach Kombinations-Behandlung mit CD19-TRAIL und VTX, im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie, untersucht. Aufgrund der Daten aus den MTT-Assays wurde angenommen, dass es über die Kombination beider Substanzen zu einer Steigerung der Proteinlevel dieser pro-apoptotischen Proteine in REH-Zellen, nicht jedoch in NALM-6-Zellen kommt. REH- und NALM-6-Zellen wurden mit CD19-TRAIL, VTX oder der Kombination von CD19-TRAIL und VTX behandelt und anschließend mittels Western-Blot Analyse untersucht. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Entsprechend der Befunde der MTT-Assays zeigte die Behandlung von REH-Zellen mit CD19-TRAIL und VTX im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine leicht erhöhte Expression der Spaltprodukte (c) der Caspase 7 und 9 und PARP. Im Vergleich dazu wurden mit der CD19-TRAIL/VTX-Kombinationsbehandlung deutlich erhöhte Level von cPARP, cCaspase 3, 7 und 9 ebenso wie γ H2AX, einem Marker für DNA-Schäden festgestellt (Abb. 3.20). Dem gegenüber zeigte sich für NALM-6-Zellen, wie erwartet, lediglich eine Erhöhung der Level der Apoptosemarker nach CD19-TRAIL-Applikation, nicht jedoch nach VTX-Behandlung. Es ließ sich keine weitere Erhöhung der Level pro-apoptotischer Proteine nach VTX/CD19-TRAIL-Kombinations-Applikation feststellen (Abb. 3.20).

Zusammengefasst zeigen die *in vitro* Ergebnisse, dass die Effizienz von CD19-TRAIL in BCP-ALL-Zellen mit einer hohen Bcl-2-Expression durch die Kombination mit VTX synergistisch gesteigert werden kann. BCP-ALL-Zellen mit einer niedrigen Bcl-2-Expression hingegen profitieren nicht von der Kombination mit VTX.

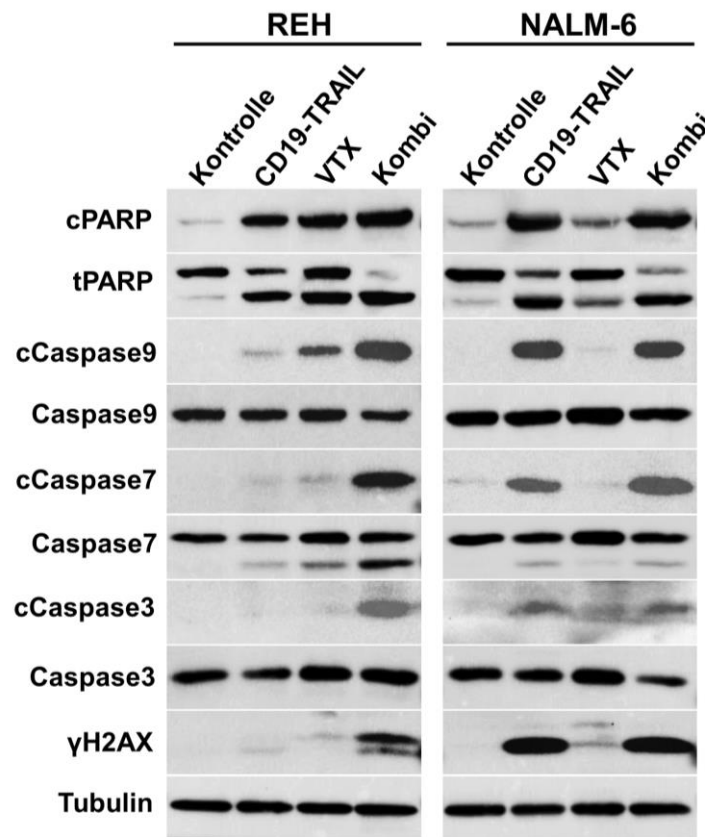


Abbildung 3.20: Die über CD19-TRAIL induzierte Apoptose in REH-Zellen wird gesteigert durch die Kombination mit VTX. Western-Blot Analyse von REH-Zellen behandelt mit 0,06 nM CD19-TRAIL, 6 nM VTX oder der Kombination und NALM-6-Zellen behandelt mit 0,03 nM CD19-TRAIL, 10 μ M VTX oder der Kombination. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Nach 48 h wurden Proteinlysate der Zellen präpariert, 50 μ g Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die pro-apoptotischen Proteine Caspase 3, Caspase 7, Caspase 9 und PARP und deren Spaltungsprodukte (cCaspase 3, cCaspase 7, cCaspase 9 und cPARP) sowie γ H2AX mittels Western-Blot und anschließender Immundetektion visualisiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Die *in vitro* beobachteten Effekte von CD19-TRAIL und VTX auf REH- und NALM-6-Zellen sollten nun *in vivo* validiert werden. Es wurde angenommen, dass vor allem REH-Zell-transplantierte Mäuse von einer Kombination beider Substanzen profitieren. Dafür wurden weiblichen NSG-Mäusen REH- oder NALM-6-Zellen intravenös injiziert und die Tiere entweder mit CD19-TRAIL (Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen), mit VTX (täglich) oder mit der Kombination beider Substanzen therapiert. Zusätzlich wurden mit Vektor behandelte Mäuse als Kontrollgruppe mitgeführt (n = 6/Gruppe). Tiere wurden aus dem Versuch genommen, wenn sie die oben genannten Anzeichen einer offenen Leukämie aufwiesen. Für REH-Xenograft-Tiere zeigte sich sowohl nach CD19-TRAIL- als auch nach VTX-Behandlung eine signifikante Verlängerung der mittleren Überlebensrate von 14 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe (48 vs. 34 Tage für beide Substanzen, p = 0,0009, Abb. 3.21A).

Besonders hervorzuheben ist, dass zusätzlich eine signifikante Steigerung der mittleren Überlebensrate zwischen den monotherapierten Tieren und denen, welche die Kombinationstherapie erhielten, zu beobachten war (48 vs. 63 Tage, $p = 0,0009$, Abb. 3. 21A).

Wie erwartet war bei mit NALM-6-Zellen transplantierten Mäusen keine signifikante Verlängerung des Überlebens durch VTX-Applikation zu beobachten und die mittlere Überlebensrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe betrug lediglich 0,5 Tage (20 vs 19,5 Tage, Abb. 3.21B). Dem gegenüber zeigte CD19-TRAIL im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren eine Steigerung der mittleren Überlebensrate von 9,5 Tagen (29 vs 19,5 Tage, $p = 0,0009$). Die Kombination beider Substanzen zeigte hier keine weitere Steigerung der Überlebensrate (Abb. 3.21B). Das verstärkt die Annahme, dass bei Zellen mit einer niedrigen Bcl-2-Expression wie NALM-6 keine Verstärkung der Effizienz von CD19-TRAIL mittels Bcl-2-Inhibition erfolgt.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Effizienz von CD19-TRAIL in Bcl-2 hoch-exprimierenden Zellen auch *in vivo* durch die Kombination mit VTX optimiert werden kann, während Zellen mit einer geringen Bcl-2-Expression nicht von der Kombination profitieren.

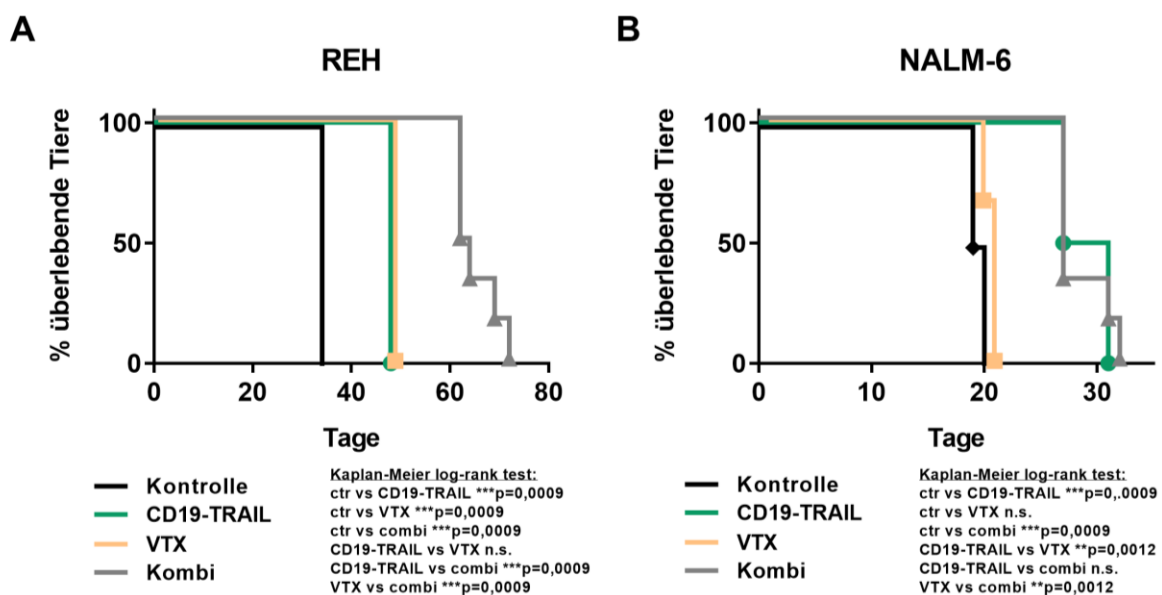


Abbildung 3.21: Die Kombinations-Therapie mit CD19-TRAIL und VTX verlängert das Überleben von REH-Zell-transplantierten Mäusen. Weiblichen NSG-Mäusen wurden intravenös je $0,5 \times 10^6$ A) REH- oder B) NALM-6-Zellen transplantiert. Behandelt wurden die Mäuse an den Tagen +1, +3, +6, +10, +13 sowie an allen folgenden 7 Tagen mit je 1,5 mg/kg CD19-TRAIL (intravenös); täglich mit 100 mg/kg VTX (oral), der Kombination beider Substanzen oder einer entsprechenden Vektorkontrolle ($n = 6$ Tiere/Gruppe). Bei Anzeichen einer Leukämie wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und geopfert. Unterschiede im Überleben der Tiere wurde mittels Kaplan-Meier log-rank Test bestimmt, ** $p = 0,0012$, *** $p = 0,0009$.

3.2. Herstellung eines ZNS-gängigen CD19-spezifischen Antikörpers

Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern zeigt vielversprechende Ergebnisse bei einer Vielzahl maligner Tumorerkrankungen [206]. Jedoch zeigen Antikörper bei ZNS-assoziierten Tumoren, aufgrund ihrer limitierten Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, kaum klinische Effizienz [207]. Ein vielversprechender Ansatz für den Transport von Molekülen über diese Barriere stellt das artifizielle Peptid Angiopep 2 (An2) dar [189,208,209]. Für dieses Peptid konnte gezeigt werden, dass es an LRP1, einem endozytierenden Rezeptor auf der Oberfläche von Kapillarendothelzellen im ZNS, bindet und so die Rezeptor-vermittelte Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein HER2-IgG1-Antikörper fusioniert an An2 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke von Mäusen zu überwinden und dort Hirnmetastasen von Brusttumoren zu eliminieren [210]. Auf dieser Grundlage wurde angenommen, dass über die Fusion von An2 der Transport von CD19-IgG1-Antikörpern über die Blut-Hirn-Schranke verstärkt vermittelt werden kann.

3.2.1. Konstruktion der Expressionsvektoren für die schweren und leichten Ketten von CD19-An2

Zunächst wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus CD19-IgG1 und An2, hergestellt (CD19-An2). Dafür wurden die Expressionsvektoren der schweren und leichten Kette von CD19-IgG1 aus den vorangegangenen Experimenten verwendet. Bei den leichten Ketten wurde C-Terminal ein An2-Peptid in den Expressionsvektor kloniert (Abb. 3.22A). Das rekombinante Protein CD19-An2 sollte so, nach korrekter Zusammenlagerung, zwei An2-Moleküle tragen, je eins an jeder leichten Kette des CD19-IgG1-Antikörpers (Abb. 3.22B)

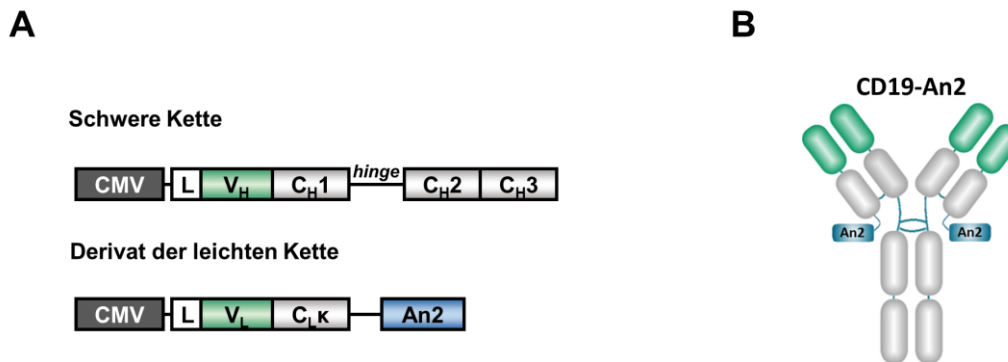


Abbildung 3.22: Strukturelle Darstellung von CD19-An2. A) Konstruktion der Expressionskassetten für CD19-An2. CMV, *cytomegalovirus immediate early promotor*; L, Sekretionsleader; V_H, V_L, kodierende Sequenzen für die variablen Regionen der schweren bzw. leichten Kette des CD19-Antikörpers (grün); C_H1-3, kodierende Sequenz der Regionen 1-3 der konstanten schweren Kette; *hinge*, Gelenkregion; C_{LK}, kodierende Sequenz für die κ-leichte Kette der konstanten Region; An2, Angiopep 2 Signalpeptid für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke. B) Schema des CD19-An2-Fusionsproteins, bestehend aus einem CD19-IgG1-Antikörper, der an jeder leichten Kette je ein An2 Transportpeptid trägt.

3.2.2. Expression des Fusionsproteins CD19-An2

Die Expression von CD19-An2 wurde analog zu CD19-TRAIL in CHO-S-Zellen durchgeführt. Nach der Reinigung des Antikörpers über eine C_H1-spezifische Affinitätschromatographie wurde mittels SEC gezeigt, dass CD19-An2 eine vergleichbare molekulare Masse wie CD19-IgG1 aufweist und es lediglich zu einer geringen Bildung von Antikörper-Aggregaten kommt (Abb. 3.23). Die berechnete Ausbeute von CD19-An2 lag im Mittel bei 20 mg/L Zellkulturüberstand.

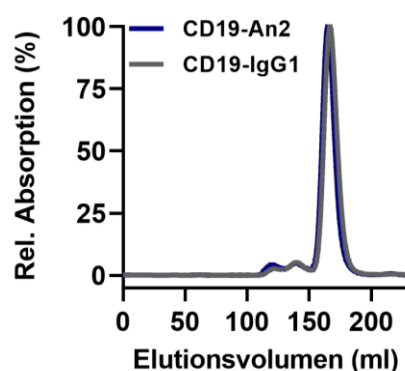


Abbildung 3.23: Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-An2. CD19-An2 wurde transient in CHO-S-Zellen transfiziert und mittels C_H1-spezifischer Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Anschließend wurde das Fusionsprotein mittels Größenausschluss-Chromatographie unter nativen Pufferbedingungen, mit einer Flussrate von 0,8-1 ml/min, im Vergleich zum parentalen CD19-IgG1-Antikörper, analysiert und die Fraktionen der jeweiligen Peaks gesammelt. Gezeigt sind die Absorptionswerte von CD19-IgG1 und CD19-An2, normalisiert auf die maximale Absorption.

Anschließend wurde die Reinheit und molekulare Masse von CD19-An2, im Vergleich zu CD19-IgG1 mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Es wurden je zwei Banden, die den aus den Sequenzen berechneten molekularen Massen der Antikörperketten, (LC = 25 kDa, LC + An2 = 30 kDa; HC = 50 kDa) entsprachen, identifiziert (Abb. 3.24A). Der spezifische Nachweis der Polypeptidketten erfolgte in Western-Blot Experimenten, mit Antikörpern gegen die leichte bzw. schwere Kette (Abb. 3.24B). Während die schwere Kette im Gel eine vergleichbare Mobilität zum ursprünglichen CD19-IgG1-Antikörper aufwies (50 kDa), zeigte die leichte Kette von CD19-An2 eine höhere molekulare Masse als die von CD19-IgG1 (30 kDa vs. 25 kDa). Die Daten deuten darauf hin, dass An2 erfolgreich an die leichte Kette des CD19-Antikörpers fusioniert wurde.

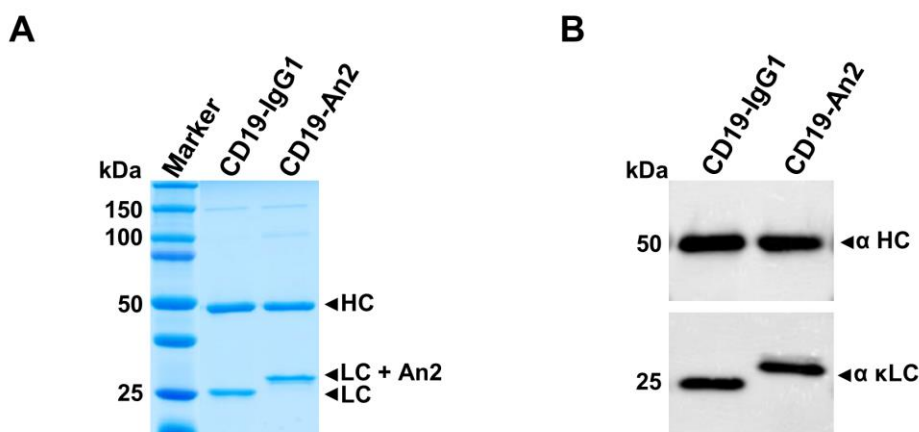


Abbildung 3.24: Nachweis des gereinigten CD19-An2-Antikörpers. Analyse der Reinheit und Größe des gereinigten Fusionsproteins CD19-An2 im Vergleich zu CD19-IgG1. 2 µg des jeweiligen Antikörpers wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden im Gel über A) Coomassie Blau Färbung visualisiert oder B) mittels Western-Blot Analyse mit spezifischer Immundetektion der leichten (α κ LC) und schweren Kette (α HC) detektiert.

3.2.3. CD19-An2 bindet spezifisch an CD19⁺- und LRP1⁺-Zellen

Aufgrund der erfolgreichen Fusion von An2 an CD19-IgG1 wurde angenommen, dass CD19-An2 sowohl an das Zielantigen CD19 als auch an den Transzytose-Rezeptor LRP1 bindet. Um dies zu untersuchen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. CD19-An2 zeigte eine zu CD19-IgG1 vergleichbare Bindung an die CD19⁺/LRP1⁺-Zelllinien REH und NALM-6, darüber hinaus war erwartungsgemäß keine Bindung an CD19⁻/LRP1⁻-CEM-Zellen feststellbar (Abb. 3.25). Um weiterhin zu untersuchen, ob das fusionierte Transportmolekül An2 eine Bindung an LRP1 vermittelt, wurden die CD19⁻/LRP1⁺-Glioblastom-Zelllinie U-87 MG mit CD19-An2 bzw.

CD19-IgG1 behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Wie erwartet zeigte CD19-An2 eine deutlich höhere Bindung an U-87 MG-Zellen im Vergleich zum Kontrollmolekül CD19-IgG1, was eine wichtige Voraussetzung für die Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke darstellt (Abb. 3.25).

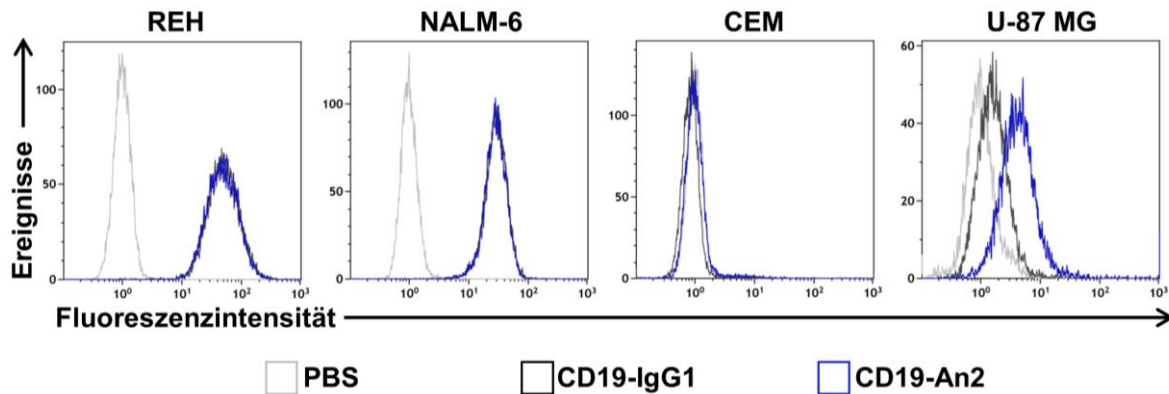


Abbildung 3.25: CD19-An2 bindet spezifisch an CD19⁺- und LRP1⁺-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Bindung von CD19-An2 an die CD19⁺/LRP1⁻-B-ALL-Zelllinien REH und NALM-6, die CD19⁻/LRP1⁻-T-ALL-Zelllinie CEM sowie die CD19⁺/LRP1⁺-Glioblastom-Zelllinie U-87 MG im Vergleich zum nativen CD19-IgG1. Mit PBS-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG F(ab')₂ Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Graphen aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.4. CD19-An2 akkumuliert im ZNS von NSG-Mäusen

Als nächstes wurde untersucht, ob CD19-An2 das ZNS von NSG-Mäusen erreichen kann. Die nachgewiesene Bindungsfähigkeit von CD19-An2 an den endothelialen Rezeptor LRP1 und der damit verbundene Transport über die Blut-Hirn-Schranke sollte *in vivo* zu einer Akkumulation des Antikörpers im ZNS führen. Um die Detektion der Antikörper *in vivo* zu ermöglichen, wurde CD19-An2 sowie das Kontrollmolekül CD19-IgG1 mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRDye800 markiert (CD19-An2-IRDye800, CD19-IgG1-IRDye800). Die Konstrukte wurden zunächst mit den Zelllinien REH, CEM und U-87 MG inkubiert und die Bindung der Antikörper über die Fluoreszenzintensität gemessen, um die Kopplung mit IRDye800 zu validieren und einen Einfluss des Farbstoffes auf das Bindungsverhalten der Antikörper ausschließen zu können. Dabei zeigte sich, wie zuvor in den durchflusszytometrischen Analysen (vgl. Abb. 3.25), eine signifikante Bindung beider Antikörper an CD19⁺-REH-Zellen im Vergleich zu den CD19⁻-CEM-Zellen (Abb. 3.26A). Zusätzlich konnte eine signifikant höhere Bindung von CD19-An2-IRDye800 an LRP1⁺-U-87 MG-Zellen im Vergleich zum CD19-IgG1-IRDye800 Antikörper beobachtet werden ($p < 0,05$; Abb. 3.26B).

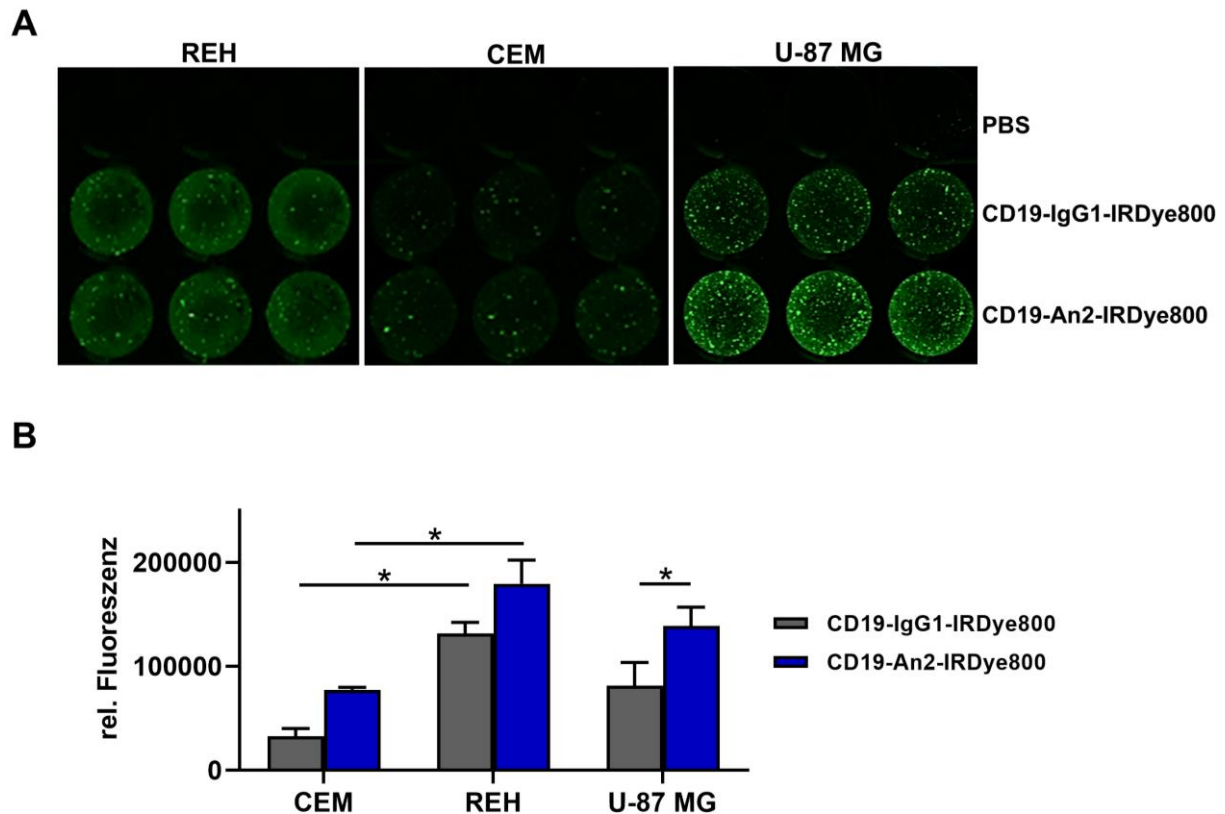


Abbildung 3.26: Der an IRDye800 fusionierte Antikörper CD19-An2 bindet spezifisch an CD19⁺- und LRP1⁺-Zellen. CD19-IgG1 und CD19-An2 wurden mit dem Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff IRDye800 gelabelt und mit der CD19⁺/LRP1⁺-B-ALL-Zelllinie REH, der CD19⁺/LRP1⁺-T-ALL-Zelllinie CEM oder der CD19⁺/LRP1⁺-Glioblastom-Zelllinie U-87 MG für 1 h inkubiert. Mit PBS-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. A) Die Fluoreszenzintensität wurde mittels LI-COR Odyssey Infrarot Bildgeber gemessen. B) Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-U-Test, $*p < 0,05$.

Um die Akkumulation von CD19-An2 im ZNS *in vivo* zu untersuchen, wurden je fünf gesunden Mäusen entweder das CD19-An2-IRDye800 Fusions-Antikörperkonjugat oder das CD19-IgG1-IRDye800 Kontroll-Antikörperkonjugat intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert. Nach 48 h erfolgte die Visualisierung und Messung der IRDye800-Signalstärke in der Schädelregion der Mäuse mittels *in vivo* Fluoreszenz-Molekular-Tomographie (FMT) (Abb. 3.27A). Tatsächlich zeigte CD19-An2-IRDye800 eine signifikant gesteigerte Anreicherung in der Kopfregion gegenüber dem Kontrollmolekül CD19-IgG-IRDye800 (112 pmol vs. 47 pmol, $p = 0,0054$; Abb. 3.27B).

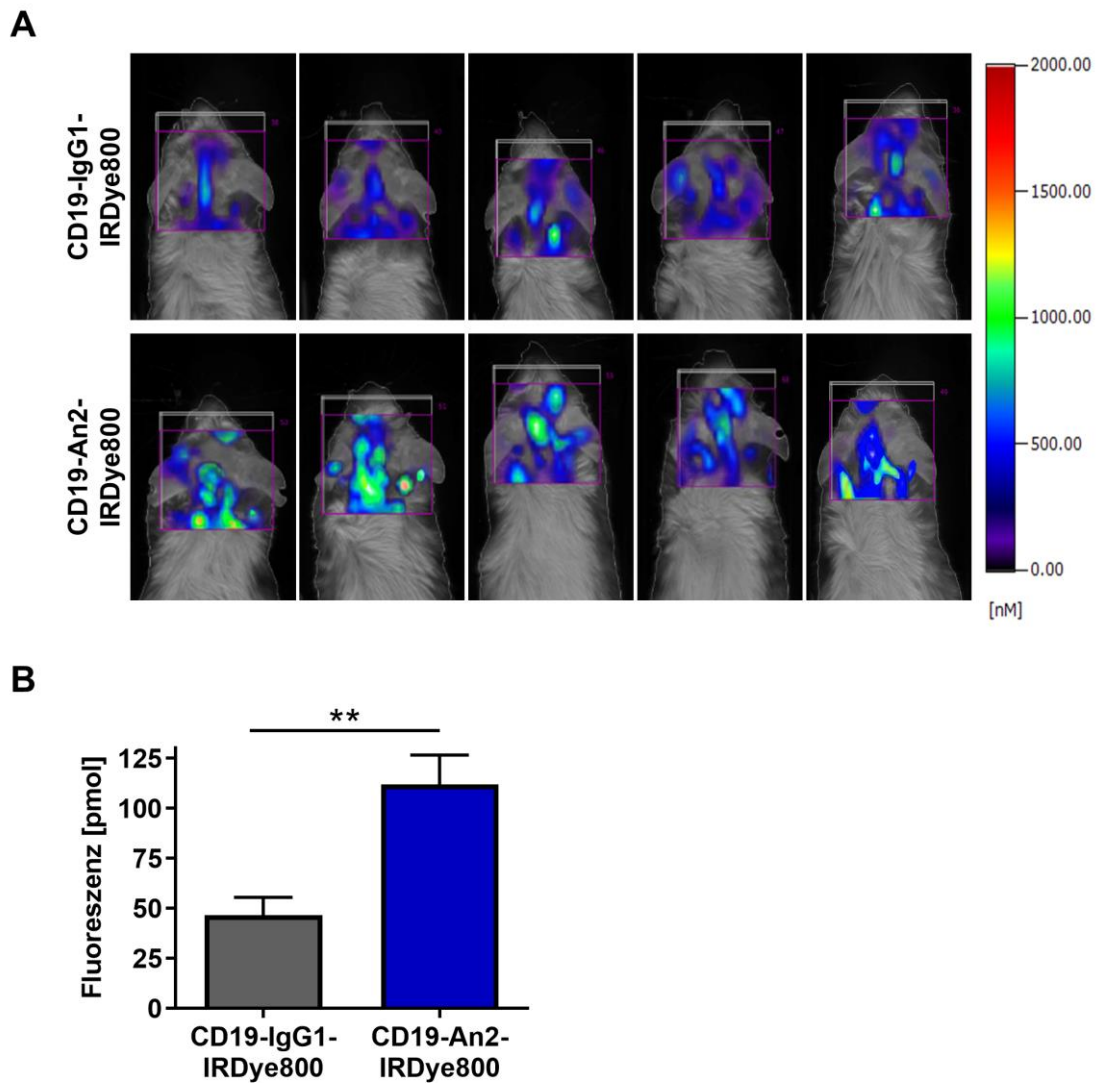


Abbildung 3.27: CD19-An2 akkumuliert im Kopf von NSG-Mäusen. Fünf weiblichen NSG-Mäusen wurden entweder 200 µg CD19-IgG1-IRDye800 oder CD19-An2-IRDye800 injiziert (je n=5). A) Nach 48 h wurde die Anreicherung der Antikörper in der Schädelregion mittels FMT analysiert. B) Quantifizierung der CD19-IgG1-IRDye800 oder CD19-An2-IRDye800 Fluoreszenzintensitäten in der Schädelregion der Mäuse aus den FMT-Analysen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 5 Mäusen. Mann-Whitney-U-Test, **p = 0,0054.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass der generierte CD19-An2 Antikörper sowohl an CD19 als auch an LRP1 bindet und deuten so darauf hin, dass CD19-An2 in der Lage ist das murine ZNS zu erreichen.

3.3. Herstellung und Charakterisierung eines CD19-spezifischen, heterodimeren, ZNS-gängigen TRAIL-Fusionsproteins

Neben ihrer schwachen Befähigung das ZNS zu penetrieren stellt der Mangel von Effektorzellen im ZNS eine weitere Limitation für die Wirksamkeit von Antikörpern in dieser Nische dar [211]. Um diese beiden Limitationen zu überwinden, sollte im Folgenden ein Molekül generiert werden, welches die Eigenschaft besitzt, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, ohne diese zu beschädigen und gleichzeitig in der Lage ist BCP-ALL-Zellen spezifisch zu eliminieren. Auf Grundlage der zuvor gezeigten starken und spezifischen Effizienz von CD19-TRAIL wurde nun TRAIL an CD19-An2 gekoppelt und so das Fusionsprotein CD19-An2-TRAIL generiert. Dieses sollte mittels seiner An2-Einheiten zum Transport über die Blut-Hirn-Schranke befähigt sein und über seine TRAIL-Domäne direkt die Apoptose von Tumorzellen vermitteln. Zur Generierung von CD19-An2-TRAIL wurden die zwei Derivate der schweren Kette von CD19-TRAIL (vgl. Abb. 3.1) und die leichte Kette von CD19-An2 (vgl. Abb. 3.22) in einem Molekül vereint. Das rekombinante Protein CD19-An2-TRAIL sollte so eine TRAIL-Domäne an einer der beiden schweren Ketten sowie zwei An2-Moleküle an den leichten Ketten besitzen und so die Bindung an den Transzytose-Rezeptor LRP1 sowie an CD19 und TRAIL-R auf Zielzellen vermitteln (Abb. 3.28).

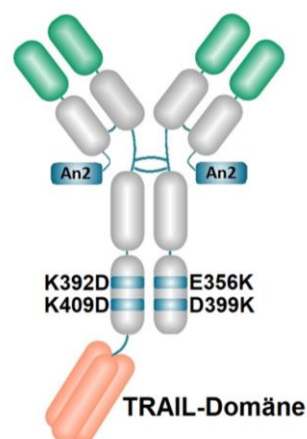


Abbildung 3.28: Schema des ZNS-gängigen heterodimeren CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-An2-TRAIL. CD19-An2-TRAIL, bestehend aus einem CD19-IgG1-Antikörper mit einer schweren Kette mit den AS-Substitutionen K392D und K409D sowie der c-terminale Fusion einer TRAIL-Domänen und einer zweiten schweren Kette mit den AS-Substitutionen E356K und D399K. Zusätzlich trägt es an den leichten Ketten je ein Angiopep2 (An2) Transportpeptid.

3.3.1. Expression des heterodimeren Fusionsproteins CD19-An2-TRAIL

Die Expression und Reinigung von CD19-An2-TRAIL wurde analog zu CD19-TRAIL in CHO-S-Zellen durchgeführt. Mittels SEC wurden vorhandene Aggregate sowie Fc-Homodimere detektiert (Abb. 3.29A), die Fraktionen, die CD19-An2-TRAIL entsprechen, gesammelt und mittels SEC re-analysiert (Abb. 3.29B). CD19-An2-TRAIL zeigte dabei einen einzelnen reinen Protein-Peak, der vergleichbar zu CD19-TRAIL war und ein niedrigeres Elutionsvolumen im Vergleich zu CD19-IgG1 zeigte. Dies sprach für eine höhere molekulare Masse des Konstrukts und somit die erfolgreiche Fusion von TRAIL. Die berechnete Ausbeute von CD19-An2-TRAIL lag im Mittel bei 5-6 mg/L Zellkulturüberstand.

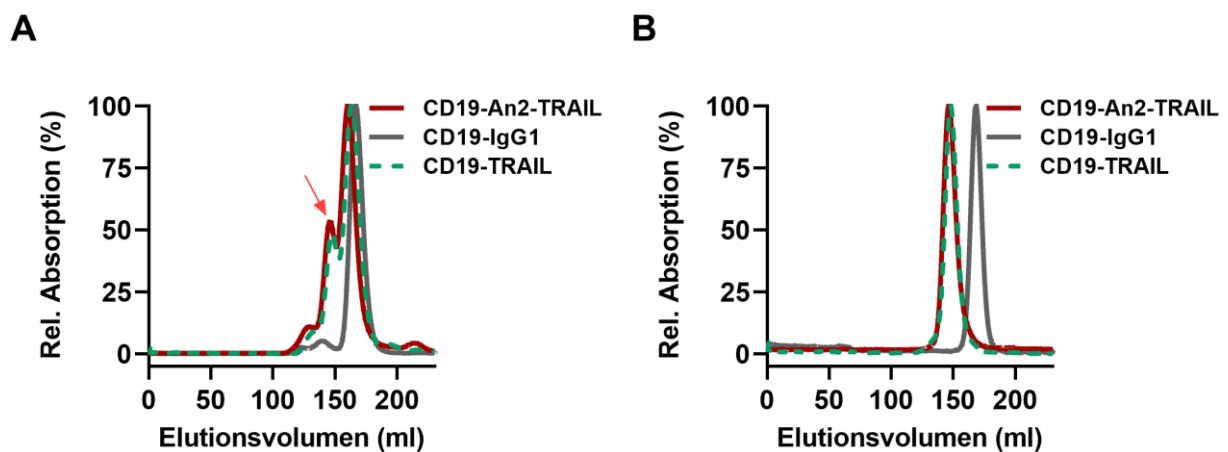


Abbildung 3.29: Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-An2-TRAIL. A) CD19-An2-TRAIL wurde transient in CHO-S-Zellen transfiziert und mittels C_{H1} -spezifischer Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Der gereinigte Antikörper wurde anschließend im Vergleich zu CD19-IgG1 und CD19-TRAIL mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert und die Fraktionen der jeweiligen Peaks gesammelt. Der rote Pfeil markiert die Proteinfractionen, die CD19-An2-TRAIL entsprechen. B) Re-Analyse der Peak-Fractionen von CD19-An2-TRAIL im Vergleich zu CD19-TRAIL und CD19-IgG1 mittels Größenausschluss-Chromatographie. Gezeigt sind die Absorptionen von CD19-IgG1, CD19-TRAIL und CD19-An2-TRAIL, normalisiert auf die maximale Absorption.

Die Reinheit und molekulare Masse von CD19-An2-TRAIL wurde mittels SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie Blau Färbung untersucht (Abb. 3.30A). Hierbei wurden drei Banden detektiert, die den auf Grundlage der Sequenzen berechneten, molekularen Massen der Antikörperketten entsprachen (LC + An2 = 30 kDa; HC = 50 kDa; HC + TRAIL = 112 kDa). Diese konnten auch mittels spezifischer Antikörper gegen die schwere bzw. leichte Antikörperkette und gegen TRAIL in Western-Blot Experimenten nachgewiesen werden (Abb. 3.30B). Dabei zeigte die leichte Kette von CD19-An2-TRAIL eine höhere molekulare Masse im Vergleich zu CD19-TRAIL auf (25 kDa vs. 30 kDa). Die beiden schweren Ketten von

CD19-An2-TRAIL wiesen wie erwartet eine vergleichbare elektrophoretische Mobilität im Gel wie CD19-TRAIL auf (50 kDa bzw. 112 kDa). Die Analysen deuten auf eine erfolgreiche Fusion der TRAIL-Domäne an eine der schweren Ketten von CD19-IgG1 und von An2 an die leichten Ketten des Antikörpers hin.

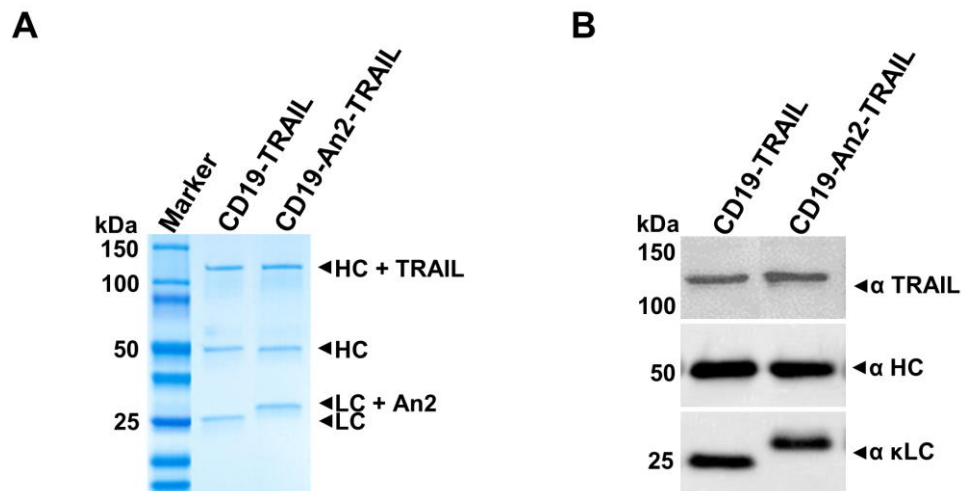


Abbildung 3.30: Nachweis des gereinigten CD19-An2-TRAIL-Antikörpers. Analyse der Reinheit und Größe des gereinigten Fusionsproteins CD19-An2-TRAIL im Vergleich zu CD19-TRAIL. Dafür wurden je 2 µg des jeweiligen Antikörpers unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden im Gel über A) Coomassie Blau Färbung visualisiert oder B) mittels Western-Blot Analyse mit spezifischer Immundetektion der leichten (α κLC) und schweren Kette (α HC) sowie von TRAIL (α TRAIL) validiert.

3.3.2. CD19-An2-TRAIL bindet spezifisch an CD19⁺-Zellen

Die spezifische Bindung von CD19-An2-TRAIL wurde an CD19⁺-REH- und NALM-6-Zellen sowie auf CD19⁻-CEM-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde angenommen, dass die Fusion der An2-Moleküle die Bindungseigenschaften des Antikörperkonstrukts gegenüber CD19-IgG1 und CD19-TRAIL nicht beeinflusst. Wie erwartet zeigte CD19-An2-TRAIL eine vergleichbare Bindung an REH- und NALM-6-Zellen wie CD19-IgG1 und CD19-TRAIL (Abb. 3.31). Für die CD19⁻-Kontrollzelllinie CEM wurde ebenfalls eine geringe Bindung von CD19-TRAIL und CD19-An2-TRAIL, nicht aber für CD19-IgG1, festgestellt. Diese ist vermutlich auf die Bindung von TRAIL an die nachgewiesenen TRAIL-Rezeptoren auf den CEM-Zellen zurückzuführen. Diese Daten zeigen, dass die Fusion an An2 keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsverhalten des Antikörpers hat.

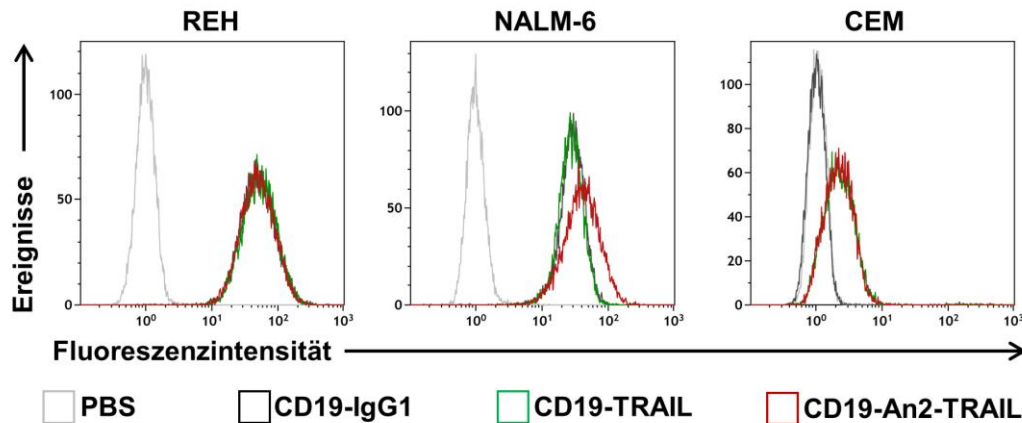


Abbildung 3.31: CD19-An2-TRAIL bindet spezifisch an CD19⁺-ALL-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen der Bindung von CD19-An2-TRAIL an die CD19⁺-Zelllinien REH und NALM-6 und die CD19⁺-T-ALL-Zelllinie CEM im Vergleich zu CD19-IgG1 und CD19-TRAIL. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG Fc F(ab')₂ Antikörper. PBS diente als Kontrolle. Gezeigt sind repräsentative Graphen aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.3.3. CD19-An2-TRAIL vermittelt direkte anti-proliferative Effekte auf BCP-ALL-Zellen

Aufgrund der pro-apoptotischen Effizienz von CD19-TRAIL sowie der vergleichbaren Bindungsfähigkeit von CD19-An2-TRAIL und CD19-TRAIL wurde erwartet, dass auch CD19-An2-TRAIL CD19⁺-Tumorzellen selektiv eliminiert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die CD19⁺-BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 sowie die CD19⁺-T-ALL-Zelllinie CEM mit steigenden Konzentrationen CD19-An2-TRAIL behandelt und die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. CD19-An2-TRAIL bewirkte eine Dosis-abhängige, signifikant reduzierte Vitalität der Zellen im Vergleich zum Kontrollmolekül HER2-TRAIL. Schon bei niedrigen Konzentrationen im nanomolaren Bereich wurde eine signifikante Reduktion der Zellvitalität beobachtet, die bei beiden Zelllinien vergleichbar mit dem Effekt von CD19-TRAIL war. Der EC₅₀-Wert beider Antikörper betrug in den REH-Zellen 0,062 nM. In den NALM-6-Zellen lag der EC₅₀-Wert von CD19-TRAIL bei 0,017 nM und für CD19-An2-TRAIL bei 0,016 nM (Abb. 3.32A-C). Hervorzuheben ist, dass sich keine Effekte auf die Zellproliferation der CD19-Zelllinie CEM nachweisen ließ, für die eine geringe Bindung durch CD19-An2-TRAIL gezeigt wurde (vgl. Abb. 3.31, Abb. 3.32C). In einem anschließenden Blockadeexperiment wurde die Spezifität von CD19-An2-TRAIL weiter verifiziert. Die ALL-Zellen wurden mit einer hohen Konzentration des parentalen CD19-IgG1-Antikörpers vorinkubiert und somit das CD19-Epitop blockiert. In der Folge blieb der vitalitätsmindernde Effekt von CD19-An2-TRAIL wie erwartet aus, was anzeigte, dass CD19-An2-TRAIL Antigen-spezifisch wirksam war (Abb. 3.32D).

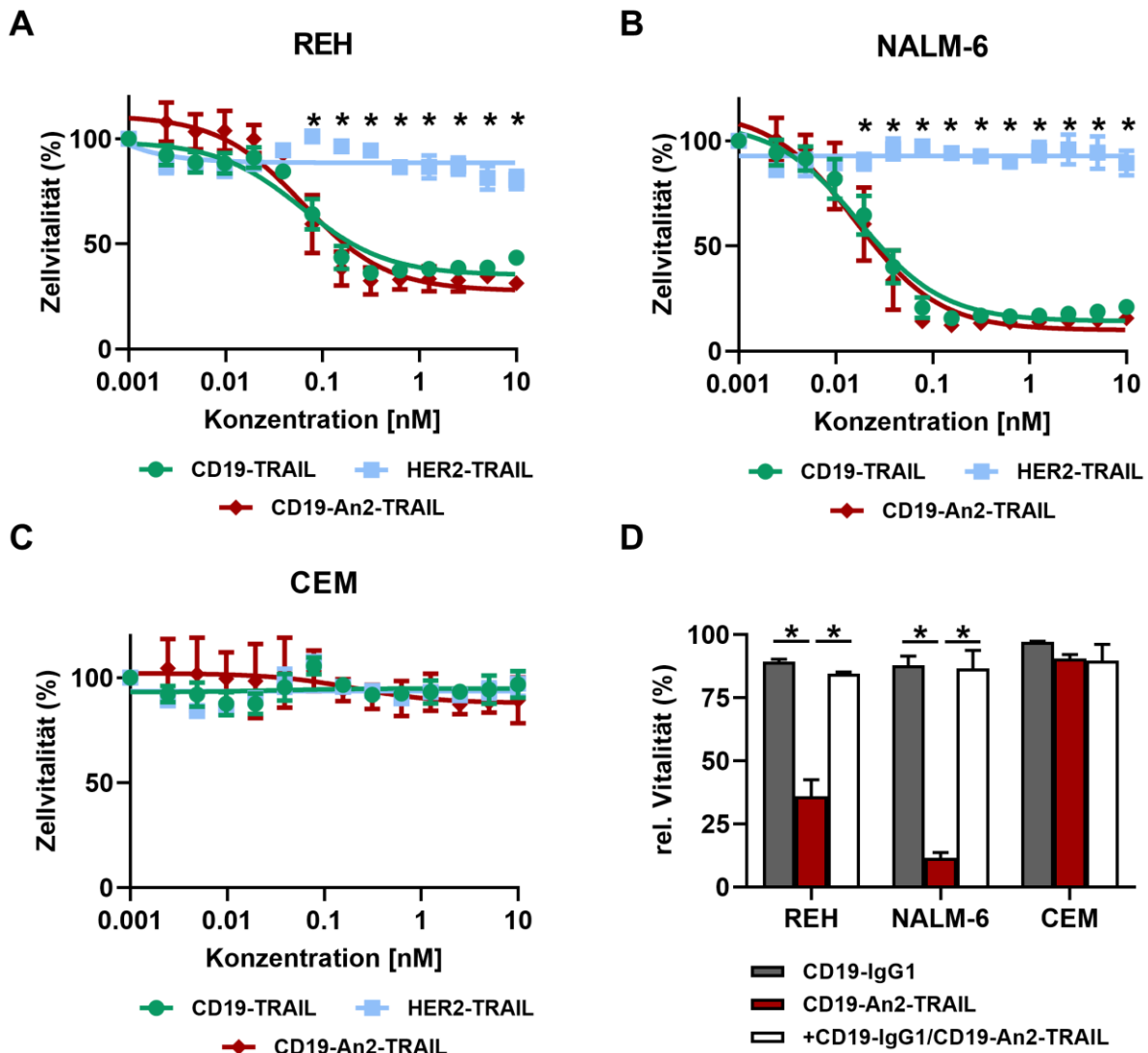


Abbildung 3.32: CD19-An2-TRAIL wirkt selektiv anti-proliferativ auf CD19⁺-ALL-Zellen. Die CD19⁺-Zelllinien A) REH und B) NALM-6 sowie die C) CD19-T-ALL-Zelllinie CEM wurden mit steigenden Konzentrationen CD19-An2-TRAIL, CD19-TRAIL oder dem Kontroll-Antikörper HER2-TRAIL behandelt und die Vitalität der Zellen nach 72 h mittels MTT-Assay bestimmt. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur. D) Zur Verifizierung des CD19-spezifischen anti-proliferativen Potentials von CD19-An2-TRAIL wurden REH-, NALM-6- und CEM-Zellen entweder mit 0,5 nM CD19-An2-TRAIL, mit 10 nM CD19-IgG1 oder mit 100 nM des parentalen CD19-IgG1-Antikörpers 1 h vor CD19-An2-TRAIL-Behandlung (0,5 nM) inkubiert und die Vitalität der Zellen nach 72 h mittels MTT-Assay bestimmt. Mann-Whitney-U-Test. Die Graphen zeigen Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$.

3.3.4. CD19-An2-TRAIL ist therapeutisch wirksam, verhindert jedoch nicht die ZNS-Infiltration von BCP-ALL-Zellen *in vivo*

Auf Grundlage der beobachteten Akkumulation von CD19-An2 in der Schädelregion von Mäusen sowie der vielversprechenden *in vitro* Effektivität von CD19-An2-TRAIL wurde angenommen, dass CD19-An2-TRAIL *in vivo* einerseits BCP-ALL-Zellen in der Peripherie eliminiert und darüber hinaus den Befall des ZNS durch ALL-Zellen

verhindert. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden zehn verschiedene PDX-Proben, bei denen eine ZNS-Infiltration zu erwarten war ausgewählt (PDX 1-4,8,10-14; Tabelle 3.1). Die PDX-Zellen wurden in je drei Mäuse injiziert und zufällig einer Behandlungsgruppen zugeteilt (Kontrolle, CD19-TRAIL, CD19-An2-TRAIL). An Tag +1, +3, +6, +10, +13 und an allen folgenden 7 Tagen wurden die Mäuse mit dem entsprechenden Antikörper oder der Vektorkontrolle therapiert. Zunächst wurde untersucht, ob CD19-An2-TRAIL ein vergleichbares systemisches therapeutisches Potential aufweist wie CD19-TRAIL. Dafür wurde am Tag des Versterbens eines Kontrolltieres dessen Blastenlast im peripheren Blut im Vergleich zu den beiden jeweiligen behandelten Tieren bestimmt. Als Ergebnis resultierte eine Behandlung mit CD19-An2-TRAIL in einer vergleichbaren therapeutischen Effizienz wie eine Behandlung mit CD19-TRAIL. Beide Antikörpertherapien erzielten eine signifikant niedrigere Blastenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe (jeweils $p = 0,0039$, Abb. 3.33). Bei einer Kontrollmaus und den dazugehörigen behandelten Mäusen konnte zum Zeitpunkt des Versterbens kein Blutausschrieb angefertigt werden. Die Tiere verstarben alle am gleichen Tag. Daher wurde die Milzgröße repräsentativ zur Bestimmung des leukämischen Engraftments bestimmt. Dabei zeigte die Kontrollmaus eine vergleichbar vergrößerte Milz wie die mit CD19-TRAIL bzw. CD19-An2-TRAIL behandelten Tiere ($0,36 \text{ cm}^2$ vs. $0,37 \text{ cm}^2$ vs. $0,37 \text{ cm}^2$).

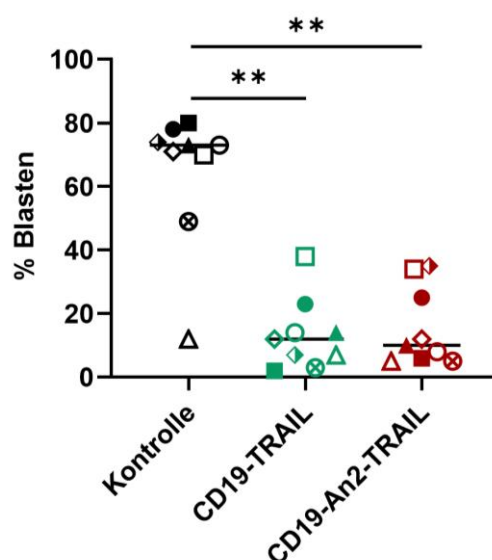


Abbildung 3.33: CD19-An2-TRAIL ist therapeutisch wirksam bei BCP-ALL-Xenografts. Je 1×10^5 PDX-Zellen von 10 BCP-ALL-Patientinnen/Patienten wurden in drei weibliche NSG-Mäuse injiziert (Tag 0) und diese zufällig in eine der Behandlungsgruppen (Vektorkontrolle, CD19-TRAIL oder CD19-An2-TRAIL) eingeteilt. Je $1,5 \text{ mg/kg}$ des jeweiligen Antikörpers bzw. der Vektorkontrolle wurde an den Tagen +1, +3, +6, +10, +13 sowie an allen folgenden 7 Tagen intravenös verabreicht. Tiere, die Anzeichen einer Leukämie zeigten, wurden aus dem Versuch genommen und geopfert. Detektion der Blastenlast im peripheren Blut der Mäuse am Tag der Opferung der Kontrolltiere. Individuelle Symbole repräsentieren PDX-Material von entsprechenden Patientinnen/Patienten. Zweiseitiger Wilcoxon Test. $**p = 0,0039$.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob CD19-An2-TRAIL im Vergleich zu CD19-TRAIL in der Lage ist, die Infiltration des ZNS durch leukämische Zellen zu verhindern. Dafür wurden jeweilige PDX-Mäuse beider Antikörper-Behandlungsgruppen gleichzeitig aus dem Versuch genommen, sobald eines der entsprechenden behandelten Tiere die oben genannten Anzeichen einer offenen Leukämie zeigten. Zur Bestimmung des ZNS-Status wurden histologische Schnitte von den Köpfen der Versuchstiere angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und diese verblindet durch einen Pathologen bewertet. Bei der mikroskopischen Befundung wurden bei acht der zehn Kontrolltieren ein leukämischer Befall des ZNS festgestellt (Tabelle 3.2). Weiterhin zeigten sieben der zehn mit CD19-TRAIL behandelten Tiere einen ZNS-Befall (Tabelle 3.2). Entgegen der Erwartung waren ebenfalls sieben der zehn Tiere, die mit CD19-An2-TRAIL behandelt wurden, ZNS-positiv zum Zeitpunkt der Opferung (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Vergleich der ZNS-Infiltration der mit CD19-TRAIL und CD19-An2-TRAIL behandelten Tiere.

ZNS-Status	Kontrolle	CD19-TRAIL	CD19-An2-TRAIL
-	2	3	3
+	8	7	7

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass CD19-An2-TRAIL, vergleichbar mit CD19-TRAIL, effektiv an BCP-ALL-Zellen bindet und direkte Antigen-spezifische Effekte vermittelt. Zusätzlich wurde in einem PDX-Modell die therapeutische Wirksamkeit von CD19-An2-TRAIL gezeigt. In dem hier untersuchten Setting war CD19-An2-TRAIL jedoch nicht in der Lage, den Befall des ZNS mit leukämischen Blasten zu verhindern.

4. Diskussion

Die Erfolge bei der Behandlung von pädiatrischen ALL-Patientinnen/Patienten wurden größtenteils über die Entwicklung geeigneter Chemotherapieprotokolle erzielt. Klinische Herausforderungen stellen jedoch nach wie vor starke Nebenwirkungen verwendeter Zytostatika oder Resistenzentwicklungen dar, aber auch das Auftreten von Rezidiven und die Infiltration des ZNS. Außerdem sind einige Sub-Typen von Leukämien mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert [9]. Antikörperbasierte Immuntherapien stellen einen vielversprechenden Ansatz bei der Bekämpfung dieser Probleme dar, da sie Tumorzell-spezifisch agieren und so mit einer geringen Toxizität in Verbindung stehen. Trotz einiger klinischer Erfolge, die mit Antikörpern wie Rituximab, Blinatumomab oder Inotuzumab-Ozogamicin bei der Therapie von B-Zell-Neoplasien erzielt wurden, stehen auch diese im Zusammenhang mit Nebenwirkungen, Resistenzentwicklungen und therapeutischen Limitationen [37,100,212,213]. So zeigen native Antikörper gegen das B-lymphoide Zielantigen CD19 bislang kaum prä-klinische Erfolge [122,214]. Zusätzlich können Antikörper die Barriersysteme des ZNS nicht überwinden und sind daher bei Patientinnen/Patienten mit einer ZNS-Leukämie nur begrenzt wirksam [207]. Deshalb ist es sinnvoll, neue Strategien zu entwickeln, um das klinische Potential von Antikörpern zu verbessern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene CD19-IgG1-Fusionsproteine hergestellt, charakterisiert und prä-klinisch validiert. CD19-IgG1 wurde dafür entweder an das pro-apoptotische Molekül TRAIL (CD19-TRAIL), an das ZNS-gängige Peptid An2 (CD19-An2) oder an TRAIL und An2 (CD19-An2-TRAIL) fusioniert, um das zytotoxische Potential von CD19-IgG1 zu steigern und den Antikörper zu befähigen, das ZNS zu erreichen, um dort gezielt anti-leukämische Effekte zu initiieren. Es konnte gezeigt werden, dass CD19-TRAIL eine selektive pro-apoptotische Aktivität gegenüber CD19-exprimierenden malignen B-Zellen zeigt und darüber hinaus das Überleben von xenotransplantierten Mäusen verlängert. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von VTX verstärkt werden. Darüber hinaus führte die Fusion von CD19-Antikörpern an An2 zu einer verstärkten Akkumulierung im ZNS von NSG-Mäusen. Ein CD19-TRAIL-An2-Konstrukt zeigte therapeutische, wenngleich nicht ZNS-gerichtete, Wirkung gegen BCP-ALL-PDX-Zellen *in vivo*.

4.1. CD19 und TRAIL-Rezeptoren als Immuntherapie-Zielstrukturen auf malignen B-Zellen

Aufgrund seines vorteilhaften Expressionsprofils stellt CD19 eine wichtige Zielstruktur bei malignen Erkrankungen der B-Zellreihe dar. Vor allem Leukämien, in denen die Zellen in einem frühen Stadium der Differenzierung arretiert sind, profitieren von einer Behandlung mit CD19-gerichteten Antikörpern, da CD19 im Vergleich zu CD20 bereits ab dem Entwicklungsstadium der pro-B-Zelle exprimiert wird [95]. Jedoch konnte für native CD19-Antikörper bislang kaum zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen festgestellt werden, da sie nur geringe direkte und indirekte Wirkmechanismen vermitteln. Sie sind daher in dieser Form für den klinischen Einsatz nicht geeignet [122,214]. Um diese Limitationen zu überwinden, wurden verschiedene Strategien entwickelt, welche die Effizienz therapeutischer Antikörper optimieren sollen. Dazu gehören beispielsweise Fc-optimierte Antikörper, die eine gesteigerten FcγR-Affinität und somit eine effizientere Effektorzell-Rekrutierung bewirken, aber auch sogenannte Immunkonjugate, bei denen native Antikörper an zytotoxische Agenzien fusioniert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde TRAIL, ein potenter Induktor der Apoptose, an einen CD19-IgG1-Antikörper fusioniert, um das therapeutische Potential des Antikörpers zu steigern. Der Vorteil von TRAIL im Vergleich zu anderen anti-tumoralen Wirkstoffen ist zum einen, dass es als Ligand der Todesrezeptoren die Apoptose unabhängig vom Tumorsuppressor p53 induziert, der in vielen humanen Tumorentitäten inaktiviert vorliegt [168]. Zum anderen zeigt TRAIL im Gegensatz zu den Todesrezeptorliganden TNFα und CD95L bei systemischer Gabe keine Toxizität gegenüber gesunden Zellen, sondern greift maligne Zellen selektiv und effizient an [152,153,215,216].

TRAIL liegt physiologisch meist als Typ II Glykoprotein vor (memTRAIL), bei der die extrazelluläre Domäne abgespalten werden kann (sTRAIL) [154]. Erste Versuche, rekombinantes Histidin-Tag sTRAIL therapeutisch zu nutzen, scheiterten an der Antikörper-Präparation, da diese aufgrund von inaktiven Dimeren entweder wirkungslos waren oder durch die Aggregation der sTRAIL-Homotrimere mit einer schweren Hepatotoxizität verbunden waren [217,218]. Die Entfernung des Histidin-Tags sowie die Nutzung eukaryotischer Produktionssysteme, die mit Hilfe von Zink-Ionen die funktionelle Zusammenlagerung von sTRAIL zu aktiven Homotrimeren

gewährleistete, half dabei diese Limitationen zu überwinden [156,218,219]. In verschiedenen prä-klinischen Studien mit Nagern und nicht humanen Primaten zeigte die Behandlung mit neuen sTRAIL-Präparationen eine gute Verträglichkeit sowie eine potente anti-tumorale Wirksamkeit bei Kolonkarzinomen und bei der BCP-ALL [172]. In klinischen Studien mit Dulanermin, einer rekombinanten humanen sTRAIL-Variante, konnte jedoch nur ein eingeschränktes therapeutisches Potential bei Patientinnen/Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom oder Non-Hodgkin Lymphom nachgewiesen werden [178,179].

Mitverantwortlich für die limitierte Wirksamkeit von sTRAIL ist vermutlich die eingeschränkte Aktivierung des TRAIL-R2, der im Vergleich zu TRAIL-R1 nur von memTRAIL aktiviert werden kann und zudem eine stärkere Bindungsaffinität für sTRAIL hat [220,221]. Somit wird sTRAIL zwar von TRAIL-R2 verstärkt gebunden, jedoch reicht hier im Vergleich zu TRAIL-R1 eine Trimerisierung der Rezeptoren nicht aus, um apoptotische Signale weiterzuleiten. Stattdessen müssen mehrere Rezeptoren kreuzvernetzt werden, um ein ausreichendes Apoptosesignal zu induzieren [185]. Auch für TRAIL-R1 ist beschrieben, dass es über memTRAIL effizienter aktiviert wird als über sTRAIL [222]. Eine Akkumulation von sTRAIL auf malignen Zellen wird vermutlich aufgrund der verbreiteten TRAIL-R-Expression auf gesunden Zellen sowie der hohen Dissoziationsrate von Zytokinen verhindert. Zudem zeigt sTRAIL *in vivo* nur eine sehr kurze Serumhalbwertszeit [172].

Die Erforschung neuer Strategien zur Nutzung von sTRAIL brachte eine Gruppe von sTRAIL-Fusionsproteinen hervor, die es ermöglichten, die beschriebenen Limitationen von sTRAIL teilweise zu überwinden. Über die Fusionen von sTRAIL an Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente sowie an Liganden für Tumor-spezifische Antigene wird sTRAIL spezifisch an die Tumorzellen dirigiert, aggregiert hier und führt somit zur zusätzlichen Aktivierung von TRAIL-R2 [88–91,191,223,224]. Für maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems sind bisher scFV:sTRAIL Fusionsproteine gegen CD7 und CD19 beschrieben, sowie die Fusion eines CD19-Liganden an sTRAIL [88,91,223].

Das im Rahmen dieser Arbeit generierte und charakterisierte Fusionsprotein CD19-TRAIL basiert auf einem humanen IgG1-Antikörper, die im Vergleich zu den scFv-Fragmenten eine höhere Plasmahalbwertszeit aufweisen [184]. Im Vergleich zum scFvCD19:sTRAIL trägt es außerdem kein einzelnes sTRAIL-Monomer, sondern

eine scTRAIL-Domäne, bestehend aus drei TRAIL Monomeren. So wird keine Homotrimerisierung benötigt, um ein funktionelles Molekül zu erhalten, wodurch die Bildung von Aggregaten verhindert werden kann [88,90].

In Vorversuchen in unserem Labor wurden mit einem homodimeren CD19-TRAIL₂-Fusionsprotein Antigen-unabhängige Effekte beobachtet. Dabei wurden neben CD19⁺-Zellen auch CD19⁻-Zellen mit CD19-TRAIL₂ eliminiert (persönliche Kommunikation mit cand. med. Maren Oßwald, Medizinische Klinik II des UKSH, Campus Kiel und CAU, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie). Um diese unspezifischen Effekte zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine Variante mit heterologen schweren Ketten generiert, in der die scTRAIL-Domäne nur an eine der beiden schweren Ketten fusioniert ist. Um eine korrekte Zusammenlagerung der unterschiedlichen schweren Ketten zu gewährleisten, wurden im finalen Molekül sogenannte *knob-into-hole* Modifikationen eingefügt (vgl. Abb. 3.1). Diese erhöhen die Heterodimerisierung von Antikörpern über elektrostatische Lenkungseffekte [188]. Dafür werden in die C_H3-Region der schweren Ketten AS-Substitutionen eingefügt, die eine veränderte Ladungspolarität bewirken. In der Folge kommt es zu einer höheren Anziehung der unterschiedlichen schweren Ketten und somit zur gewünschten Fc-Heterodimer-Bildung. Mit dieser Technologie lassen sich beispielsweise bispezifische Antikörperfusionen mit minimalen Homodimer-Verunreinigungen herstellen [188].

In dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein CD19-TRAIL in den eukaryotischen CHO-S-Zellen exprimiert, um die Heterodimerisierung des Fusionsproteins zu gewährleisten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gunasekaran und Kollegen, die nur sehr geringe Verunreinigungen mit Fc-Homodimeren beobachteten, lagen in dieser Arbeit nur etwa 50 % der exprimierten Antikörper als Fc-Heterodimere und somit als korrekt zusammengelagertes CD19-TRAIL vor (vgl. Abb. 3.2) [188]. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich der Größenunterschied zwischen den beiden unterschiedlichen schweren Ketten. So ist die an TRAIL-fusionierte schwere Kette mit etwa 120 kDa mehr als doppelt so schwer wie die schwere Kette ohne TRAIL (50 kDa). Um die Bildung von Fc-Homodimeren weiter zu reduzieren könnten zusätzliche AS-Substitutionen eingefügt werden, welche die elektrostatischen Ladungseffekte verstärken. Dies wurde ebenfalls in der Studie von Gunasekaran und Kollegen beobachtet. Über das Einbringen einer weiteren Mutation (E357K/K370D) wurden

keine Fc-Homodimere mehr detektiert, jedoch ging dies mit einer signifikant verringerten Antikörpermenge einher [188]. Da wir die Heterodimere über eine Größenausschuss-Chromatographie erfolgreich von den Homodimeren trennen konnten, was in Western-Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die unterschiedlichen Antikörperketten gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.3), wurde eine weitere Optimierung der Heterodimerisierung im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

4.2. CD19-TRAIL-Fusionsproteine als effiziente Anti-Tumorwirkstoffe

Das neue Fusionsprotein CD19-TRAIL zeigte hervorragende Bindungseigenschaften gegenüber CD19-exprimierenden Zellen, jedoch auch eine schwache Bindung an CD19-T-ALL-Zellen (vgl. Abb. 3.5). Diese exprimieren ebenfalls TRAIL-R, wodurch das Fusionsprotein über seine TRAIL-Domäne auch an diese Zellen binden kann. Jedoch induzierte CD19-TRAIL die Apoptose einzig in Zellen, die sowohl CD19 als auch zumindest einen der TRAIL-R exprimieren (vgl. Abb. 3.6-3.9). Das deutet darauf hin, dass die Kreuzvernetzung zwischen dem Zielantigen CD19 und den TRAIL-R auf den Tumorzellen notwendig ist, um die Zellen zu eliminieren. Hier ist hervorzuheben, dass CD19-TRAIL auch in NALM-6-Zellen effektiv die Apoptose induzierte, obwohl diese lediglich eine Expression des TRAIL-R2 aufwiesen (vgl. Abb. 3.4), der nur von memTRAIL aktiviert werden kann. Dies bestätigt die Hypothese, dass CD19-TRAIL über die Bindung an CD19 auf Tumorzellen stabilisiert wird und so in der Lage ist, über die verstärkte Kreuzvernetzung des TRAIL-R2, die Apoptose auszulösen. Die unterschiedlich starke TRAIL-R-Expression auf REH- und NALM-6-Zellen, könnte auch für das unterschiedlich ausgeprägte apoptotische Potential von CD19-TRAIL auf den beiden Zelllinien verantwortlich sein. So konnten auch bei hohen CD19-TRAIL Konzentrationen nur etwa 60 % der REH-Zellen eliminiert werden, wohingegen die NALM-6-Zellen fast vollständig abgetötet wurden (vgl. Abb. 3.6). In Studien mit einem scFvCD19:sTRAIL wurden solche Differenzen nicht beobachtet [88]. Jedoch wurde in der genannten Studie auch eine stärkere TRAIL-R2 Expression in REH-Zellen im Vergleich zu verwendeten NALM-6-Zellen gemessen, die in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde [88]. Zusätzlich zeigte sich bei Stieglmaier und Kollegen bei den NALM-6-Zellen eine vergleichsweise hohe TRAIL-R1-Expression, die in dieser

Arbeit nicht bestätigt wurde. Um diese unterschiedlichen Ergebnisse zu verstehen, müssten Untersuchungen mit weiteren Zelllinien erfolgen.

Die Hypothese, dass eine Kreuzvernetzung zwischen dem Zielantigen und den TRAIL-R benötigt wird, um die Apoptose auf Zielzellen zu induzieren, wird dadurch unterstützt, dass in unseren Versuchen die Apoptose der B-ALL-Zellen, nach Blockierung des CD19-Epitops mit dem parentalen CD19-IgG1-Antikörper, weitgehend inhibiert wurde (vgl. Abb. 3.6). Das steht in Einklang mit früheren Studien zur zielgerichteten Apoptose von Tumorzellen über die Fusion von TRAIL an scFvs. In diesen konnte auch gezeigt werden, dass gesunde Blutzellen nicht über die TRAIL-Fusionsproteine angegriffen werden [88,91,191]. Die spezifische Eliminierung der CD19⁺-Zellen liegt vermutlich auch an der heterodimeren Struktur des Antikörpers. Es grenzt sich so von zuvor beschriebenen TRAIL-Antikörperfusionen ab, bei denen die scTRAIL-Domäne jeweils an beide leichten Ketten und/oder an beide schweren Ketten konjugiert wurde. Die daraus resultierenden hexavalenten oder dodekavalenten EGFR-gerichteten scTRAIL-Konstrukte zeigten *in vitro* zwar lediglich schwache Antigen-unabhängige pro-apoptotische Effekte, *in vivo* wurde mit einem unspezifischen hexavalenten scTRAIL-Konstrukt jedoch eine vergleichbare therapeutische Effizienz erreicht wie mit dem spezifischen EGFR-scTRAIL Konstrukt [89].

In der vorliegenden Arbeit zeigten auch hohe Konzentrationen eines heterodimeren HER2-TRAIL Kontroll-Antikörpers *in vitro* keine Effekte auf die Vitalität der Zellen (vgl. Abb. 3.6), was dafürspricht, dass der hier charakterisierte Antikörper CD19-TRAIL Antigen-abhängig die Apoptose induziert. Diese Daten deuten darauf hin, dass CD19-TRAIL Tumorzell-spezifisch agiert. Das ist vor allem im klinischen Kontext von Bedeutung, da davon ausgegangen werden kann, dass bei einer Therapie mit CD19-TRAIL gesunde Zellen nicht angegriffen werden und folglich mit weniger Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Neben der effizienten Induktion der Apoptose in CD19⁺-Zellen *in vitro*, wurde in dieser Arbeit auch ein hohes therapeutisches Potential für CD19-TRAIL in einem Xenograft-Mausmodell mit den humanen BCP-ALL-Zelllinien REH und NALM-6 nachgewiesen (vgl. Abb. 3.12). Interessanterweise wurden hier, im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen, keine Unterschiede bei der Wirksamkeit von CD19-TRAIL auf die beiden verwendeten Zelllinien REH und NALM-6 beobachtet. Trotz schwacher

pro-apoptotischer Effekte *in vitro*, wies der native CD19-IgG1 in *in vivo* Versuchen ebenfalls eine gewisse therapeutische Wirksamkeit auf, welche jedoch von CD19-TRAIL signifikant übertroffen wurde (vgl. Abb. 3.13). Auch in Studien von Horton und Kollegen wurde beobachtet, dass ein nativer CD19-Antikörper, in einem Lymphom-Mausmodell, eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens um 57 %, im Vergleich zu unbehandelten Tieren bewirkte. In der genannten Studie zeigte jedoch auch ein CD19-FcKO Antikörper eine Reduktion der Tumormasse um 26 % [122]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass native CD19-Antikörper, wie der in dieser Arbeit verwendete CD19-IgG1, *in vivo* nicht nur indirekt über die Rekrutierung von Effektorzellen wirkt, sondern auch direkte Effekte vermittelt. CD19-IgG1 besitzt demnach eine gewisse therapeutische Effizienz, die über die Fusion mit TRAIL und der daraus resultierenden Induktion der Apoptose signifikant verbessert werden kann. Das deutet darauf hin, dass CD19-TRAIL im Vergleich zu nativen CD19-Antikörpern klinisch wirksam sein kann.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Einzel-Behandlung mit CD19-TRAIL auch in einem Mausmodell mit PDX-Zellen von verschiedenen BCP-ALL-Patientinnen/Patienten eine signifikante Überlebensverlängerung (vgl. Abb. 3.15, 3.16). Dies konnte nach unserem Erkenntnisstand bisher noch nicht für andere TRAIL-Fusionen an CD19-Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch wurde in früheren Studien die hohe prä-klinische Effizienz eines Fusionsproteins, bestehend aus einem CD19-Liganden und sTRAIL, im PDX-Modell beschrieben [223]. Im Vergleich zu den BCP-ALL-Zelllinien war bei den PDX-Proben TRAIL-R2 der dominierende Rezeptor (vgl. Abb. 3.14). Das deutet darauf hin, dass CD19-TRAIL die Apoptose sowohl über TRAIL-R1 als auch über TRAIL-R2 induzieren kann. Auffällig ist, dass nicht alle PDX-Proben von der Behandlung mit CD19-TRAIL gleichermaßen profitierten. So verlängerte CD19-TRAIL das Überleben von einigen PDX-Mäusen nur um wenige Tage und ein PDX zeigte gar kein Ansprechen auf CD19-TRAIL (vgl. Abb. 3.16). Das Expressionsmuster der TRAIL-R1 und TRAIL-R2 der verschiedenen PDX-Proben war heterogen und korrelierte nicht mit dem Ansprechen auf die Behandlung mit CD19-TRAIL (vgl. Abb. 3.14, 3.16). Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf TRAIL und der TRAIL-R-Expression von B-ALL-Zellen zeigen konnten [225,226].

Auch für CD19 wurden variante Expressionslevel auf den in dieser Arbeit verwendeten PDX-Proben nachgewiesen, die ebenfalls nicht mit dem Therapieansprechen korrelierten (vgl. Abb. 3.14, 3.16). Daher sind vermutlich weitere Faktoren für die scheinbare Resistenz gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose verantwortlich. Mutationen in den agonistischen TRAIL-R sowie die Expression von sogenannten konkurrierenden Köderrezeptoren, welche keine funktionale Todesdomäne besitzen, spielen dabei vermutlich eine entscheidende regulatorische Rolle. Bei der Suche nach Biomarkern, die für das Ansprechen auf die TRAIL-induzierte Apoptose relevant sind, konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das Expressionslevel der O-Glycosyltransferase GALNT14 mit der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber TRAIL korreliert [227]. Auch die Überexpression von Inhibitoren der Apoptose (*inhibitors of apoptosis*, IAPs) könnte eine Resistenz gegenüber TRAIL vermitteln, diese regulieren die Aktivität von Effektor-Caspasen und hemmen so die Signalweiterleitung [228,229]. Ob ein Zusammenhang zwischen diesen Resistenzvermittelnden Faktoren und dem geringen Ansprechen einiger Patientinnen/Patienten in der prä-klinischen Studie in dieser Arbeit besteht, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Um potentielle Marker für das Ansprechen auf CD19-TRAIL zu identifizieren, könnten die in dieser Arbeit untersuchten PDX-Proben, die auf die Therapie mit CD19-TRAIL angesprochen haben, mit PDX-Proben die nicht ansprechen, hinsichtlich der genannten Faktoren untersucht werden.

Ebenfalls ist noch zu klären, ob CD19 nach Behandlung mit CD19-TRAIL auf den Tumorzellen herunterreguliert wird, wie es beispielsweise nach der Behandlung mit CAR-T-Zellen und Blinatumomab beobachtet wird [230]. Das könnte dazu führen, dass die Zellen im Verlauf der Therapie nicht mehr auf CD19-TRAIL ansprechen. Jedoch ist zumindest für scFv:TRAIL-Fusionsproteine beschrieben, dass sie sogenannte *bystander*-Effekte vermitteln können. Dabei induzieren Antigen-gebundene TRAIL-Fusionsproteine in benachbarten, Antigen-negativen Zellen die Apoptose über die Bindung an deren TRAIL-R [224]. Ob auch CD19-TRAIL in der Lage ist über *bystander*-Effekte benachbarte CD19-Zellen zu eliminieren, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Neben dem Verlust der Antigen-Expression ist die Therapie mit Blinatumomab und CAR-T-Zellen aufgrund der T-Zell-Aktivierung mit einigen unerwünschten Nebenwirkungen wie dem Zytokin-Freisetzungssyndrom verbunden, die für

CD19-TRAIL nicht zu erwarten sind, da hier keine T-Zell-Aktivierung erfolgt [37,230]. Die dauerhafte Persistenz von CAR-T-Zellen in Patientinnen/Patienten ist zudem mit einer anhaltenden B-Zell-Aplasie assoziiert, da sie zwischen gesunden und malignen Zellen nicht differenzieren können [231]. Zusätzlich ist Blinatumomab aufgrund seiner geringen Größe von 54 kDa mit einer sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von nur etwa zwei Stunden assoziiert, weshalb eine Dauerinfusion über mehrere Wochen notwendig ist [232]. Dagegen steht CD19-TRAIL als IgG1-Antikörper-Derivat mit einer deutlich längeren Halbwertszeit und einer guten Verträglichkeit in Zusammenhang [214]. Insgesamt stellt CD19-TRAIL damit eine vielversprechende potentielle Alternative zu BiTEs (z.B. Blinatumomab) und CAR-T-Zellen dar. Ob sie vergleichbare Effizienz zeigen und nicht zu einer B-Zell-Aplasie führen müsste jedoch prä-klinisch und klinisch umfassend untersucht werden. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass CD19-TRAIL als Monotherapie eine hohe Wirksamkeit besitzt, könnte dieses Therapeutikum künftig genutzt werden, um klassische Chemotherapien zu deeskalieren, was ebenfalls im PDX-NSG-Mausmodell untersucht werden kann.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Fusion von CD19-IgG1 an TRAIL ein hohes zytotoxisches Potential gegenüber humanen BCP-ALL-Zellen hat. Es ist daher für die klinische Anwendung von hohem Interesse, vor allem für Patientinnen/Patienten, die schwere Nebenwirkungen bei der Therapie mit BiTEs oder CAR-T-Zellen aufweisen. Voraussetzung ist, dass die Patientinnen/Patienten sowohl das Zielantigen CD19 als auch zumindest einen der TRAIL-R exprimieren. CD19-TRAIL könnte als Modellsystem auch für Antigene im Kontext anderer hämatologischer Malignitäten angewendet werden, wie CD20, CD38 und CD7, für die bereits TRAIL-Fusionskonstrukte im scFv-Format beschrieben sind [91,233,234].

4.3. Venetoclax potenziert das pro-apoptotische Potenzial von CD19-TRAIL

Die Induktion der Apoptose kann neben der Aktivierung der Todesrezeptoren auch über den mitochondrialen Signalweg initiiert werden. Für einige Zellsysteme ist beschrieben, dass die extrinsischen pro-apoptotischen Signale nicht ausreichen, um effektiv die Apoptose der Zellen auszulösen und daher die Aktivierung der intrinsischen Signalkaskade über die Spaltung von Bid zusätzlich notwendig ist [235]. In diesen sogenannten Typ II-Zellen können zytoprotektive Moleküle, wie Bcl-2, die in

verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert vorliegen und die an der Regulation des mitochondrialen Signalweges beteiligt sind, zu einer TRAIL-Resistenz führen [197–199].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die BCP-ALL-Zelllinie REH eine partielle Resistenz gegenüber CD19-TRAIL aufweist, die bei den NALM-6-Zellen nicht beobachtet wurde. So wurden nur etwa 60 % der REH-Zellen, jedoch über 80 % der NALM-6-Zellen durch Behandlung CD19-TRAIL eliminiert (vgl. Abb. 3.6). Da REH- und NALM-6-Zellen nach CD19-TRAIL-Behandlung eine Aktivierung der Initiator-Caspase 9 des mitochondrialen Signalweges zeigten (vgl. Abb. 3.9), ist davon auszugehen, dass es sich hier um Typ II-Zellen handelt. Bei der Untersuchung der Bcl-2-Expression beider Zelllinien, zeigte sich für die REH-Zellen zudem eine erhöhte Bcl-2-Expression im Vergleich zu NALM-6-Zellen (vgl. Abb. 3.17), die zu der beobachteten TRAIL-Resistenz beitragen könnte. Für REH-Zellen wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Effizienz von CD19-TRAIL über die Kombination mit dem Bcl-2-Inhibitor VTX sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikant und synergistisch gesteigert wird (vgl. Abb. 3.19-3.21). Diese Daten deuten darauf hin, dass VTX über die Freisetzung des pro-apoptotischen Proteins Bim die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges induziert und so Bcl-2-positive, TRAIL-resistente Zellen für TRAIL-induzierte apoptotische Signale re-sensitivieren. Ähnliche synergistische Effekte von Bcl-2-Inhibitoren und TRAIL wurden auch in anderen Studien beobachtet. So steigerte VTX die TRAIL-induzierte Apoptose auch in TRAIL-resistenten Glioblastom-Zellen und Pankreastumor-Zellen [204,236]. Des Weiteren zeigte ABBV-621, ein Fusionsprotein bestehend aus dem Fc-Fragment eines IgG1-Antikörpers und zwei scTRAIL-Domänen, in Kombination mit VTX und dem Bcl-2/Bcl-X_L-Inhibitor Navitoclax ein hohes therapeutischen Potential bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) sowie dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) [203]. In einer klinischen Phase I Studie wird derzeit die Kombination von ABBV-621 mit VTX in verschiedenen soliden und hämatologischen Tumorerkrankungen untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03082209). Auch im Kontext der BCP-ALL wurde die Wirksamkeit von VTX bereits in prä-klinischen Studien gezeigt, vor allem Patientinnen/Patienten mit einer TCF3-HLF Translokation und bei MLL-rearrangierten Leukämien [190,237]. Die Ergebnisse aus einer klinischen Phase I Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03181126) legen außerdem nahe, dass VTX

in Kombination mit Navitoclax und Chemotherapie bei pädiatrischen und erwachsenen Patientinnen/Patienten mit rezidivierender oder refraktärer ALL gut vertragen wird und wirksam ist [238].

In Einklang mit der im Vergleich zu REH-Zellen geringen Bcl-2-Expression, sprachen NALM-6-Zellen kaum auf die Behandlung mit VTX an (vgl. Abb. 3.17, 3.18). Selbst bei hohen, mikromolaren Konzentrationen wurde die Zellvitalität lediglich um etwa 55 % reduziert. Ein zusätzlicher anti-tumoraler Effekt durch die Kombination von CD19-TRAIL und VTX wurde ebenfalls nicht beobachtet (vgl. Abb. 3.19-3.21). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine geringe Bcl-2-Expression mit einer Resistenz gegenüber VTX assoziiert ist. Diese Resultate decken sich mit den Daten von Soares und Kollegen, die anhand verschiedener Lymphom- und ALL-Zelllinien zeigen konnten, dass die Sensitivität gegenüber VTX mit der Bcl-2-Expression der Zellen korreliert [201].

Neben Bcl-2 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Expressionslevel des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 untersucht, das ebenfalls mit einer TRAIL-Resistenz in Verbindung steht [239,240]. Für NALM-6-Zellen, die eine hohe Mcl-1-Expression auswiesen (vgl. Abb. 3.17), konnte ein Zusammenhang in dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Auch in einer Studie mit Gliom-Zellen wurde die Verbindung zwischen der Expression von Mcl-1 und einer TRAIL-Resistenz nicht bestätigt. Ein *knockout* von Mcl-1 brachte hier keine Steigerung der Apoptoseeffizienz über TRAIL [241]. Damit scheint die TRAIL-Resistenz über Mcl-1 Entitäts- oder Zelltyp-spezifisch zu sein.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass hohe Bcl-2-Spiegel auch in BCP-ALL-Zellen mit einer TRAIL-Resistenz in Zusammenhang stehen. Über die gleichzeitige Behandlung mit Bcl-2-Inhibitoren kann diese Resistenz überwunden werden und so die über CD19-TRAIL induzierte Apoptose synergistisch verstärkt werden. Ob tatsächlich eine Bcl-2-Abhängigkeit besteht, müsste in weiteren Zelllinien sowie in REH-Zellen mit einem *Bcl-2-knockout* bestätigt werden. Nur wenn die *knockout*-Zellen nicht mehr auf VTX reagieren kann hier von einer Abhängigkeit gesprochen werden. Von einer Kombinationstherapie könnten somit vor allem Patientinnen/Patienten profitieren die eine hohe Bcl-2-Expression aufweisen. Ein Vorteil von VTX ist, dass es bereits klinisch zugelassen ist und daher vermutlich schneller für die Verwendung neuer Therapiestrategien eingesetzt werden kann. Unter diesem Aspekt könnten die in dieser Arbeit verwendeten PDX-Proben auf deren

Bcl-2-Expression untersucht werden, um herauszufinden, ob solche, die wenig oder gar nicht auf die Therapie mit CD19-TRAIL ansprechen, erhöhte Bcl-2-Werte zeigen und ob eine Kombinationstherapie hier die Effizienz von CD19-TRAIL positiv beeinflussen kann.

4.4. An2-Fusionskonstrukte als Konzept zur Bekämpfung der ZNS-Leukämie

Aufgrund der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke können größere Moleküle wie Antikörper nicht ins ZNS vordringen [207]. Der Eintritt von Substanzen wird dabei über sogenannte *tight junction* zwischen den Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke reguliert, die den parazellulären Eintritt verhindern. Zusätzlich sorgen aktive Transporter, sogenannte Efflux-Pumpen, dafür, dass Substrate zurück ins Blut transportiert werden. Diese Schutzfunktion des Gehirns erschwert die medikamentöse Behandlung von neurologischen Erkrankungen [242]. Um diese Limitationen zu überwinden, sind endogene Rezeptor-vermittelte Transportmechanismen der Endothelzellen, die auch physiologisch für den Transfer von Makromolekülen genutzt werden, Gegenstand neuer Studien zur Intervention bei malignen und nicht-malignen ZNS-assoziierten Erkrankungen [243].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential einer kürzlich postulierten Strategie untersucht, therapeutische Antikörper mittels LRP1, einem Transzytoserezeptor auf den Kapillarendothelzellen des ZNS, über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Über die Konjugation an das artifizielle Transportpeptid An2, welches von Demeule und Kollegen über den Abgleich der Kunitz-Protease Inhibitor (KPI) Domäne von LRP1-Liganden identifiziert wurde, soll dabei CD19-IgG1 ins ZNS transportiert werden [189,244]. An2 wurde dafür genetisch an die leichte Kette von CD19-IgG1 fusioniert. Das so entstandene Fusionsprotein CD19-An2 trägt damit insgesamt zwei An2-Moleküle (vgl. Abb. 3.22,3.24). Die Bindung an das Zielantigen CD19 wurde über die Fusion an An2 nicht beeinflusst. Zusätzlich zeigte CD19-An2 eine moderate Bindung an LRP1 (vgl. Abb. 3.25). Diese vergleichsweise schwache Bindung an LRP1 könnte dabei von Vorteil für die Effizienz der Rezeptor-vermittelten Transzytose sein. In einer Studie von Yu und Kollegen, wurde beobachtet, dass Antikörper mit einer hohen Affinität zum Transferrin-Rezeptor (TfR), ein weiterer Transzytose-Rezeptor des

ZNS, an der Blut-Hirn-Schranke gebunden bleiben, während niedrig affinere Varianten die Blut-Hirn-Schranke eher überwinden [245].

Neben der bestätigten Bindung von CD19-An2 an CD19⁺-und LRP1⁺-Zellen wurde in dieser Arbeit zusätzlich gezeigt, dass der Antikörper *in vivo* im ZNS-Bereich gesunder Mäuse signifikant stärker akkumuliert als ein unkonjugierter CD19-IgG1-Antikörper (vgl. Abb. 3.27). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Antikörper an LRP1 der Kapillarendothelzellen bindet und so den Antikörper mittels Transzytose ins ZNS transportieren kann.

Obwohl An2 bislang hauptsächlich für den Transport kleinerer Moleküle wie Paclitaxel genutzt wurde, konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein HER2-gerichteter IgG1-Antikörper fusioniert an An2 (ANG4043) die murine Blut-Hirn-Schranke überwindet und therapeutisch wirksam gegen HER2-positive Hirnmetastasen ist [209,210]. Untersucht wurde die ZNS-Gängigkeit in der genannten Studie, anders als in der hier vorgestellten Studie, über ein *in situ* Hirnperfusions-Assay, bei dem radioaktiv-markierte Antikörper über die Halsschlagader sedierter Mäuse verabreicht werden und die Radioaktivität in den Köpfen der Mäuse gemessen wird. Zusätzlich wurden die Kapillargefäße aus dem Hirnparenchym der Mäuse präpariert und eine höhere Radioaktivität im Parenchym im Vergleich zu den Kapillaren festgestellt. Regina und Kollegen schlossen daraus, dass der Antikörper die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Auch *in vivo* stellten sie eine Reduktion von Hirnmetastasen nach ANG4043-Behandlung fest. Um zu bestätigen, dass CD19-An2 tatsächlich die Blut-Hirn-Schranke der Mäuse überwindet, könnten in zukünftigen Untersuchungen die beschriebenen Methoden auch für unser Konstrukt angewendet werden.

Aufgrund des Mangels an Effektorzellen, vor allem NK-Zellen, in der ZNS-Nische können Antikörper, die wenig bzw. keine direkten Effekte vermitteln, wie CD19-IgG1 nicht eingesetzt werden [211]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Fusionsprotein generiert, welches das zytotoxische Potential von CD19-TRAIL mit der ZNS-Gängigkeit von CD19-An2 verbindet. Das entstandene Fusionsprotein CD19-An2-TRAIL trägt damit eine TRAIL-Domäne an einer der schweren Ketten sowie zwei An2-Moleküle (vgl. Abb. 3.28). CD19-An2-TRAIL zeigte eine vergleichbare Bindung an CD19-exprimierende Zellen wie CD19-TRAIL und CD19-IgG1 (vgl. Abb. 3.31). Wie bei CD19-TRAIL wurde ebenfalls eine schwache Bindung an CD19⁻-Zellen beobachtet, jedoch wurde die Apoptose auch hier lediglich in Zellen, die

sowohl CD19 als auch zumindest einen der TRAIL-R exprimieren, ausgelöst (vgl. Abb. 3.32). Diese Daten zeigen, dass auch für CD19-An2-TRAIL die Kreuzvernetzung zwischen dem Zielantigen CD19 und den TRAIL-R auf den Tumorzellen notwendig ist, um die Zellen zu eliminieren und die Fusion an An2 die pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu CD19-TRAIL nicht beeinträchtigt. In einem Mausmodell mit PDX-Zellen wurde in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen, dass CD19-An2-TRAIL *in vivo* eine vergleichbare therapeutische Wirksamkeit besitzt wie CD19-TRAIL, jedoch wurde kein zusätzlicher Überlebensvorteil von therapierten PDX-Mäusen beobachtet (vgl. Abb. 3.33). Ebenso wie die mit CD19-TRAIL behandelten Tiere zeigten auch 7 von 10 mit CD19-An2-TRAIL behandelte Tiere einen leukämischen ZNS-Befall und verstarben letztendlich an dessen Folgen (vgl. Tabelle 3.2.). Demnach scheint CD19-An2-TRAIL im Kontext der ZNS-Leukämie, zumindest in dem angewandten Setting, nicht wirksam zu sein. Ein möglicher Grund für die fehlende Wirksamkeit von CD19-An2-TRAIL gegen leukämische Blasten im ZNS könnte die im Vergleich zu ANG4043 niedrigere Anzahl an An2-Molekülen darstellen. Für ANG4043 wurde gezeigt, dass vier An2-Moleküle über eine kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition an freie Amine des Antikörpers fusioniert wurden. Der in dieser Arbeit vorgestellte CD19-An2-TRAIL Antikörper besitzt lediglich zwei An2-Moleküle, die genetisch an die leichte Kette fusioniert sind. Es ist möglich, dass die Anzahl der Moleküle nicht ausreichend sind, um den Transport über die Blut-Hirn-Schranke zu gewährleisten oder, dass An2 nicht mehr zugänglich ist, aufgrund von ungünstigen Proteinfaltungen des Antikörpers. Zudem ist anzunehmen, dass kleine Proteine besser mittels LRP1 über die Blut-Hirn-Schranke transloziert werden können. Somit würde CD19-An2-TRAIL (220 kDa) weniger effizient LRP1-vermittelt transportiert werden als ANG4043 (150 kDa) [210].

Um diese Annahme zu prüfen, müssten weitere Untersuchungen folgen, da bislang nicht beschrieben ist, ab welcher Proteingröße die Rezeptor-vermittelte Transzytose über An2 nicht mehr gewährleistet ist. Eine Möglichkeit, um die Molekülgröße zu verringern, wäre statt eines vollständigen IgG1-Antikörpers, einen CD19scFv an An2 und TRAIL zu fusionieren, ein solches Fusionsprotein hätte lediglich eine Größe von ca. 95 kDa und wäre somit sogar kleiner als ANG4043. Weiterhin wären Veränderungen des Fusionsproteins denkbar, welche den Einbau weiterer An2-Moleküle einschließt, entweder über die zusätzliche genetische Fusion von An2

an die leichten Antikörperketten oder wie bei Regina und Kollegen über die chemische Fusion an freie Amine innerhalb des Antikörpers.

Ein entscheidender Unterschied zu der Studie von Regina und Kollegen und der hier vorgestellten Studie ist die Lokalisierung der Tumore im ZNS. Während die Hirnmetastasen von Mammakarzinomen im Parenchym vorliegen, handelt es sich bei ZNS-Leukämien um eine leptomeningeale Erkrankung, bei der das Hirnparenchym meist erst in sehr fortgeschrittenen Stadien befallen wird [31,246,247]. In verschiedenen *in vivo* Studien mit Xenograft-ALL-Modellen wurde gezeigt, dass leukämische Zellen vor allem im Subarachnoidalraum der Leptomeningen lokalisiert sind und damit vermutlich eher über die Blut-Leptomeningen-Schranke oder die Blut-Liquor-Schranke ins ZNS eindringen als über die Blut-Hirn-Schranke [246,248,249]. Daher besteht die Möglichkeit, dass ein Transport von Wirkstoffen über die Blut-Hirn-Schranke nicht ausreichend ist, um leukämische Zellen im ZNS zu eliminieren, da über diese Route Substanzen vermutlich hauptsächlich ins Parenchym transportiert werden. Zudem ist beschrieben, dass LRP1 nicht nur auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird, sondern auch auf den Endothelzellen der meningealen Gefäße und auf den Epithelzellen des Plexus Choroideus [250,251]. Somit wäre zwar ein Transport über die Blut-Leptomeningen-Schranke als auch über die Blut-Liquor-Schranke denkbar, jedoch ist beschrieben, dass LRP1 hauptsächlich abluminal exprimiert wird und so eher den Transport vom Gehirn ins Blut vermittelt wird [252]. Eine intrathekale Gabe des Antikörpers könnte daher notwendig sein, um therapeutische Konzentrationen in den Meningen zu erreichen. Das therapeutische Konzept der intrathekalen Applikation von Antikörpern wird bereits klinisch erprobt. So zeigte z.B. die intrathekale Gabe von Rituximab eine therapeutische Wirksamkeit in verschiedenen Studien mit adulten und pädiatrischen Patientinnen/Patienten mit einer CD20-positiven, B-lymphoiden Erkrankung bei gleichzeitiger vergleichsweise geringer Ausprägung von Nebenwirkungen [253–255].

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit am Beispiel CD19-gerichteter Antikörper gezeigt, dass Antikörper, die aufgrund ihrer schwachen direkten und indirekten Wirkmechanismen keine klinische Relevanz besitzen, über die Fusion an TRAIL in potente Therapeutika verwandelt werden können. Über die Tumor-spezifische Aktivierung der Todesrezeptoren wurde in malignen Zellen gezielt die Apoptose induziert und so das leukämische Engraftment auch *in vivo* hinausgezögert. Damit

könnte es in der klinischen Anwendung von hohem Interesse sein. Weiterhin deuteten erste Ergebnisse in dieser Arbeit darauf hin, dass An2 eine effiziente Peptid-basierte Transporttechnologie darstellt, um CD19-Antikörperkonstrukte ins ZNS zu transportieren und so auch ZNS-Leukämien zu therapieren. In diesem Kontext sind jedoch zusätzliche Weiterentwicklungen des hier generierten Moleküls nötig, um eine therapeutische Effizienz zu erzielen.

4.4. Ausblick

Das Prinzip, einen IgG1-Antikörper, der mit einer hervorragenden Pharmakokinetik assoziiert ist, an den potenten Apoptoseinduktor TRAIL zu fusionieren, könnte in Zukunft auch auf andere hämatologische Tumorentitäten übertragen werden, indem CD19 oder andere charakteristische Zielantigene anvisiert werden. Somit könnten beispielsweise Immuntherapien gegen Lymphome entwickelt werden, die B-Zell-Moleküle wie CD19, CD20 oder CD79b in hoher Zahl exprimieren [95]

Von besonderem klinischen Interesse könnte darüber hinaus die Generation von Fusionsproteinen sein, die Zielstrukturen auf T-Zell-Leukämien erkennen. T-Zell-Leukämien sind häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert und es existieren bislang keine effektiven Immuntherapien für diese Subform. Neben CD7, für den bereits ein TRAIL-Fusionskonstrukt im scFv-Format beschrieben ist, könnten auch CD38 oder CD52 als Zielantigene attraktive Zielstrukturen darstellen, da diese erhöhte Expressionen in T-Zell-Leukämien zeigen [91]. Ebenfalls sinnvoll wäre die Entwicklung und Testung von TRAIL-Fusionsantikörper gegen Wachstumsrezeptoren wie EGFR, da diese auf vielen verschiedenen nicht-hämatologischen Tumorentitäten hochreguliert vorliegen und so auch verschiedene solide Tumorerkrankungen angegriffen werden könnten.

Da fast alle Therapiekonzepte bei der ALL auf Chemotherapieprotokollen basieren, wäre von großem Interesse die kombinierte Gabe von CD19-TRAIL und anderen TRAIL-Fusionsmolekülen in Kombination mit zytotoxischen Agenzien zu untersuchen. Im Falle der gemeinsamen Verträglichkeit und anti-tumoralen Effizienz einer solchen Kombinationstherapie könnte in Betracht gezogen werden weniger intensive Chemotherapien zu verwenden. Ferner finden pro-apoptotische Therapeutika wie VTX zunehmend Anwendung bei der Behandlung von hämatologischen Tumorerkrankungen [237,238]. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob die

in ALL-Zelllinien festgestellte synergistische Effizienz von VTX und CD19-TRAIL auch auf PDX-Modelle übertragbar ist. Hierzu könnte man in dieser Arbeit verwendete PDX-Proben auf ihre Bcl-2-Expression untersucht werden. Es wäre denkbar, dass PDX-Proben, die nur vermindert auf CD19-TRAIL-Therapie ansprechen, im Falle einer nachweisbaren Bcl-2-Expression, deutlich in ihrem Therapieansprechen gesteigert werden könnten.

In diesem Kontext wäre es von hohem Interesse weitere Biomarker für die Voraussage eines CD19-TRAIL-Therapieansprechens zu untersuchen. Es ließ sich keine Korrelation des Ansprechens auf CD19-TRAIL und der Expression von CD19 oder der TRAIL-R bzw. der BCP-ALL-Subgruppe feststellen. Die vertiefte molekulare Analyse von auf CD19-TRAIL ansprechenden versus nicht-ansprechenden PDX-Proben, beispielsweise mittels Transkriptom-Analyse, könnte Aufschluss auf eventuelle prädiktive Biomarker erbringen. Die erfolgreiche Validierung für das Ansprechen auf eine CD19-TRAIL-Behandlung würde, weitere präklinische Validierung vorausgesetzt, die Chancen einer Übertragung der Therapie in die klinische Praxis deutlich erhöhen.

Weiterhin müsste in Mäusen festgestellte gute Verträglichkeit von CD19-TRAIL perspektivisch in nicht-humanen Primaten bestätigt werden, da für die murinen TRAIL-Rezeptoren keine Interaktion mit humanem TRAIL beschrieben ist [164]. Dieses Modell würde sich zusätzlich dafür anbieten, die Toxizität von CD19-TRAIL gegenüber gesunden B-Zellen sowie die Aplasie von B-Zellen zu untersuchen, die häufig bei CD19-gerichteten Immuntherapien wie CD19-spezifischen CAR-T-Zellen beobachtet werden [230].

Der hier vorgestellte CD19-TRAIL Antikörper könnte in der Lage sein, über die Kreuzvernetzung mit TRAIL auch benachbarte CD19-Tumorzellen zu zerstören, wie es für andere TRAIL-Fusionsantikörper bereits gezeigt wurde [88,224]. Diese sogenannten *bystander*-Effekte wurden sowohl bei leukämischen Zellen als auch bei soliden Tumoren beobachtet, wobei gesunde Zellen kaum betroffen waren. Dies ist vor allem nach Therapie-bedingten Verlust der CD19-Expression von Bedeutung, wie sie nach der Behandlung mit CAR-T-Zellen und Blinatumomab beobachtet wird [230].

In weiteren Versuchen müsste zusätzlich untersucht werden, welche Modifikationen notwendig sind, um CD19-An2-TRAIL über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS zu transportieren. Vor allem über die Reduktion der Molekülgröße könnte hier eine Verbesserung der ZNS-Gängigkeit erreicht werden, da die Penetration der Blut-Hirn-

Schranke für Antikörper bis zu einer Größe von 150 kDa bereits nachgewiesen werden konnte [210]. Auch die zusätzliche Fusion weiterer An2-Moleküle an CD19-An2-TRAIL könnte zu einer Verbesserung der ZNS-Penetration beitragen und sollte in weiterführenden Experimenten analysiert werden. Weiterhin könnte neben TRAIL auch andere anti-tumorale Wirkstoffe als Antikörperkonjugate untersucht werden. Vielversprechend wäre hier das Spindelgift MMAE, für das bereits über die Konjugation an CD79b-Antikörper eine zytotoxische Wirkung gegen B-Zell-Lymphome klinisch bestätigt wurde [256]. Zu klären wäre hier jedoch, ob es bei der Transzytose über die Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke keine neurologischen Schäden verursacht.

Ferner ist es wichtig zu klären welche der verschiedenen ZNS-Kompartimente durch ZNS-gerichtete Antikörper erreicht werden können. Für den Befall des ZNS durch Leukämiezellen müssen vermutlich verschiedene Infiltrationsrouten und somit auch verschiedene Barriersysteme (beispielsweise die Blut-Leptomeningen-Schranke oder die Blut-Liquor-Schranke) überwunden werden. Daher könnte eine wichtige Prerequisite für die Wirksamkeit von ZNS-gerichteten Antikörpern sein, dass sie in der Lage sind, diese verschiedenen Barrieren spezifisch zu penetrieren. Für die Entwicklung effektiver ZNS-gerichteter Antikörper bedarf es daher auch einer umfassenden Analyse der molekularen und zellulären Zusammensetzung der verschiedenen meningealen Schichten. Um das Problem der limitierten Penetration der Antikörper über die Blut-Hirn-Schranke oder andere Barrieren zu umgehen wären weiterhin Untersuchungen zur intrathekalen Gabe von CD19-TRAIL und anderen Antikörper-Konstrukten sinnvoll, um therapeutische Konzentrationen im ZNS zu erreichen.

Die bestehenden klinischen Herausforderungen, wie die Entstehung von Rezidiven und Infiltration des ZNS motivieren weitere Vorhaben zur Entwicklung und Verbesserung von Immuntherapiestrategien bei der ALL und anderen hämatologischen Erkrankungen.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
α	Anti-
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
An2	Angiopep 2
APS	Ammoniumpersulfat
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosinetriphosphate
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma/leukemia-2</i>
BCR-ABL1	Fusionsgen auf Chromosom 22
BCP-ALL	<i>B-cell precursor ALL</i>
BH3	<i>Bcl-2-homology</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BiTE	<i>bispecific T-cell engager</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bzw.	beziehungsweise
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CAR-T-Zelle	<i>chimeric antigen receptor-T-Zelle</i>
Caspase	<i>Cysteine-aspartate specific protease</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>Complementarity determining region</i>
C _H	Konstante Domäne der schweren Kette
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette
CMV	Cytomegalovirus
Cmp	<i>Counts per minute</i>

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DD	<i>Death domain</i>
DISC	<i>Death inducing signalling complex</i>
DNA	deoxyribonucleic acid
EC ₅₀	Effektive Konzentration
E.coli	Escherichia coli
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
F _{ab}	<i>fragment antigen binding</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Fc	<i>fragment crystallizable/fragment constant</i>
FcR(n)	Fc-Rezeptor (<i>neonatale</i>)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>
h	Stunden
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSZT	hämatopoetischen Stammzelltransplantation
kDa	Kilodalton
IAP	<i>inhibitors of apoptosis</i>
Ig	Immunglobulin
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
M	Molar
MAPK	<i>mitogen activated kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukaemia sequence-1</i>
memTRAIL	membranständiges TRAIL
min	Minute
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OPG	Osteoprotegrin
PARP	<i>Poly-(ADP-ribose)-polymerases</i>
PBA	<i>phosphate buffered saline with albumine</i>

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDX	<i>Patient-derived Xenograft</i>
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidium iodide
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SCID	<i>Severe combined immune deficiency</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel elektrophoresis</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
sTRAIL	lösliches Trail
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL Rezeptor
tBid	<i>Truncated Bid</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleich
V _H	Variable Region der schweren Kette
V _L	Variable Region der leichten Kette
v/v	<i>volume per volume</i>
vs.	<i>versus</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
Z-VAD	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Klassifikation und Häufigkeiten der verschiedenen ALL-Subgruppen im Kindesalter.....	7
Abbildung 1.2:	Schematischer Aufbau eines IgG1-Antikörpers.....	13
Abbildung 1.3:	Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und deren immunogenes Potential.	14
Abbildung 1.4:	Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.....	17
Abbildung 1.5:	Immunphänotypische Marker bei der B-Zell-Entwicklung.....	21
Abbildung 1.6:	Die Signalwege der Apoptose.	27
Abbildung 3.1:	Strukturelle Darstellung des heterodimeren CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-TRAIL.....	56
Abbildung 3.2:	Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-TRAIL.....	57
Abbildung 3.3:	Nachweis des gereinigten CD19-TRAIL-Antikörpers.	58
Abbildung 3.4:	Expressionsprofil des CD19-Antigens und der TRAIL-Rezeptoren.....	59
Abbildung 3.5:	CD19-TRAIL bindet spezifisch an CD19 ⁺ -ALL-Zellen.....	60
Abbildung 3.6:	CD19-TRAIL vermittelt selektiv anti-proliferative Effekte auf CD19 ⁺ -ALL-Zellen.	62
Abbildung 3.7:	CD19-TRAIL eliminiert BCP-ALL-Zellen durch die Induktion von Apoptose.....	63
Abbildung 3.8:	Z-VAD inhibiert über CD19-TRAIL vermittelten Zelltod in ALL-Zellen.....	64
Abbildung 3.9:	CD19-TRAIL induziert selektiv die Apoptose in CD19 ⁺ -BCP-ALL-Zellen.....	65
Abbildung 3.10:	CD19-TRAIL vermittelt keine erhöhte Tumorzelllyse.....	66
Abbildung 3.11:	CD19-TRAIL vermittelt keine erhöhte Phagozytose.....	67
Abbildung 3.12:	CD19-TRAIL verlängert das Überleben von BCP-ALL-transplantierten Mäusen.....	68
Abbildung 3.13:	CD19-TRAIL zeigt stärkere anti-tumorale Effekte als der native CD19-IgG1-Antikörper in <i>in vivo</i> Xenograft Mausmodellen.	70
Abbildung 3.14:	Expressionsprofil des CD19-Antigens und der TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) auf BCP-ALL-PDX-Proben.....	71
Abbildung 3.15:	CD19-TRAIL verlängert das Überleben von BCP-ALL-Xenografts.....	72
Abbildung 3.16:	CD19-TRAIL ist wirksam in einer prä-klinischen Studie mit BCP-ALL-Xenografts.	75
Abbildung 3.17:	REH-Zellen exprimieren das Protoonkogen Bcl-2.	76
Abbildung 3.18:	Der Bcl-2-Inhibitor VTX zeigt anti-proliferative Effekte in CD19 ⁺ -REH-Zellen.	77
Abbildung 3.19:	Der CD19-TRAIL vermittelte Zelltod von REH-Zellen wird durch die Kombination mit VTX synergistisch erhöht.....	79
Abbildung 3.20:	Die über CD19-TRAIL induzierte Apoptose in REH-Zellen wird gesteigert durch die Kombination mit VTX.	81
Abbildung 3.21:	Die Kombinations-Therapie mit CD19-TRAIL und VTX verlängert das Überleben von REH-Zell-transplantierten Mäusen.....	82
Abbildung 3.22:	Strukturelle Darstellung von CD19-An2.....	84
Abbildung 3.23:	Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-An2.....	84
Abbildung 3.24:	Nachweis des gereinigten CD19-An2-Antikörpers.....	85
Abbildung 3.25:	CD19-An2 bindet spezifisch an CD19 ⁺ -und LRP1 ⁺ -Zellen.....	86

Abbildung 3.26: Der an IRDye800 fusionierte Antikörper CD19-An2 bindet spezifisch an CD19 ⁺ - und LRP1 ⁺ -Zellen.	87
Abbildung 3.27: CD19-An2 akkumuliert im Kopf von NSG-Mäusen.	88
Abbildung 3.28: Schema des ZNS-gängigen heterodimeren CD19-spezifischen TRAIL-Fusionsproteins CD19-An2-TRAIL.	89
Abbildung 3.29: Größenausschluss-chromatographische Analyse von CD19-An2-TRAIL.	90
Abbildung 3.30: Nachweis des gereinigten CD19-An2-TRAIL-Antikörpers.	91
Abbildung 3.31: CD19-An2-TRAIL bindet spezifisch an CD19 ⁺ -ALL-Zellen.	92
Abbildung 3.32: CD19-An2-TRAIL wirkt selektiv anti-proliferativ auf CD19 ⁺ -ALL-Zellen.	93
Abbildung 3.33: CD19-An2-TRAIL ist therapeutisch wirksam bei BCP-ALL-Xenografts.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Klinische Charakteristika von BCP-ALL-PDX-Proben und Expressionsprofile von CD19 und TRAIL-R1/2.	74
Tabelle 3.2: Vergleich der ZNS-Infiltration der mit CD19-TRAIL und CD19-An2-TRAIL behandelten Tiere.	95

Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. *Krebs in Deutschland 2015/2016*, **2019**.
2. Erdmann F.; Kaatsch P.; Grabow D.; Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). **2020**.
3. E.S. Jaffe; N.L. Harris; H. Stein; J.W. Vardiman. Classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (*World Health Organization*), **2001**.
4. Mullighan, C.G. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology* **2013**, *50*, 314–324, doi:10.1053/j.seminhematol.2013.10.001.
5. Inaba, H.; Mullighan, C.G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *haematol* **2020**, *105*, 2524–2539, doi:10.3324/haematol.2020.247031.
6. Mullighan, C.G.; Goorha, S.; Radtke, I.; Miller, C.B.; Coustan-Smith, E.; Dalton, J.D.; Girtman, K.; Mathew, S.; Ma, J.; Pounds, S.B.; et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2007**, *446*, 758–764, doi:10.1038/nature05690.
7. Kuiper, R.P.; Schoenmakers, E.F.P.M.; van Reijmersdal, S.V.; Hehir-Kwa, J.Y.; van Kessel, A.G.; van Leeuwen, F.N.; Hoogerbrugge, P.M. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* **2007**, *21*, 1258–1266, doi:10.1038/sj.leu.2404691.
8. Inaba, H.; Pui, C.-H. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCM* **2021**, *10*, 1926, doi:10.3390/jcm10091926.
9. Hunger, S.P.; Mullighan, C.G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1541–1552, doi:10.1056/NEJMra1400972.
10. Berry, D.A.; Zhou, S.; Higley, H.; Mukundan, L.; Fu, S.; Reaman, G.H.; Wood, B.L.; Kelloff, G.J.; Jessup, J.M.; Radich, J.P. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* **2017**, *3*, e170580, doi:10.1001/jamaoncol.2017.0580.
11. Borowitz, M.J.; Devidas, M.; Hunger, S.P.; Bowman, W.P.; Carroll, A.J.; Carroll, W.L.; Linda, S.; Martin, P.L.; Pullen, D.J.; Viswanatha, D.; et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* **2008**, *111*, 5477–5485, doi:10.1182/blood-2008-01-132837.
12. Malard, F.; Mohty, M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **2020**, *395*, 1146–1162, doi:10.1016/S0140-6736(19)33018-1.
13. Oeffinger, K.C.; Hudson, M.M. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2004**, *54*, 208–236, doi:10.3322/canjclin.54.4.208.

14. Long-term follow-up care for pediatric cancer survivors. *PEDIATRICS* **2009**, *123*, 906–915, doi:10.1542/peds.2008-3688.
15. Peters, C.; Schrappe, M.; Stackelberg, A. von; Schrauder, A.; Bader, P.; Ebell, W.; Lang, P.; Sykora, K.-W.; Schrum, J.; Kremens, B.; et al. Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: A prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors-The ALL-SCT-BFM-2003 trial. *JCO* **2015**, *33*, 1265–1274, doi:10.1200/JCO.2014.58.9747.
16. Horowitz, M.M.; Gale, R.P.; Sondel, P.M.; Goldman, J.M.; Kersey, J.; Kolb, H.J.; Rimm, A.A.; Ringden, O.; Rozman, C.; Speck, B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **1990**, *75*, 555–562, doi:10.1182/blood.V75.3.555.555.
17. Negrin, R.S. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology* **2015**, *2015*, 225–230, doi:10.1182/asheducation-2015.1.225.
18. Ma, H.; Sun, H.; Sun, X. Survival improvement by decade of patients aged 0-14 years with acute lymphoblastic leukemia: a SEER analysis. *Sci Rep* **2014**, *4*, 4227, doi:10.1038/srep04227.
19. Nguyen, K.; Devidas, M.; Cheng, S.-C.; La, M.; Raetz, E.A.; Carroll, W.L.; Winick, N.J.; Hunger, S.P.; Gaynon, P.S.; Loh, M.L. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* **2008**, *22*, 2142–2150, doi:10.1038/leu.2008.251.
20. Meyer, J.A.; Wang, J.; Hogan, L.E.; Yang, J.J.; Dandekar, S.; Patel, J.P.; Tang, Z.; Zumbo, P.; Li, S.; Zavadil, J.; et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **2013**, *45*, 290–294, doi:10.1038/ng.2558.
21. Mullighan, C.G.; Zhang, J.; Kasper, L.H.; Lerach, S.; Payne-Turner, D.; Phillips, L.A.; Heatley, S.L.; Holmfeldt, L.; Collins-Underwood, J.R.; Ma, J.; et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2011**, *471*, 235–239, doi:10.1038/nature09727.
22. Pui, C.-H.; Howard, S.C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The Lancet Oncology* **2008**, *9*, 257–268, doi:10.1016/S1470-2045(08)70070-6.
23. Bürger, B.; Zimmermann, M.; Mann, G.; Köhl, J.; Löning, L.; Riehm, H.; Reiter, A.; Schrappe, M. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *JCO* **2003**, *21*, 184–188, doi:10.1200/JCO.2003.04.096.
24. Richards, S.; Pui, C.-H.; Gayon, P. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **2013**, *60*, 185–195, doi:10.1002/pbc.24228.
25. Laningham, F.H.; Kun, L.E.; Reddick, W.E.; Ogg, R.J.; Morris, E.B.; Pui, C.-H. Childhood central nervous system leukemia: historical perspectives, current therapy, and acute neurological sequelae. *Neuroradiology* **2007**, *49*, 873–888, doi:10.1007/s00234-007-0300-7.

26. Pui, C.-H.; Campana, D.; Pei, D.; Bowman, W.P.; Sandlund, J.T.; Kaste, S.C.; Ribeiro, R.C.; Rubnitz, J.E.; Raimondi, S.C.; Onciu, M.; et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* **2009**, *360*, 2730–2741, doi:10.1056/NEJMoa0900386.
27. Frishman-Levy, L.; Izraeli, S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *Br J Haematol* **2017**, *176*, 157–167, doi:10.1111/bjh.14411.
28. Jeha, S.; Pei, D.; Raimondi, S.C.; Onciu, M.; Campana, D.; Cheng, C.; Sandlund, J.T.; Ribeiro, R.C.; Rubnitz, J.E.; Howard, S.C.; et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia* **2009**, *23*, 1406–1409, doi:10.1038/leu.2009.42.
29. Tomizawa, D.; Koh, K.; Sato, T.; Kinukawa, N.; Morimoto, A.; Isoyama, K.; Kosaka, Y.; Oda, T.; Oda, M.; Hayashi, Y.; et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* **2007**, *21*, 2258–2263, doi:10.1038/sj.leu.2404903.
30. Sanchez, R.; Ayala, R.; Alonso, R.A.; Martínez, M.P.; Ribera, J.; García, O.; Sanchez-Pina, J.; Mercadal, S.; Montesinos, P.; Martino, R.; et al. Clinical characteristics of patients with central nervous system relapse in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: the importance of characterizing ABL1 mutations in cerebrospinal fluid. *Ann Hematol* **2017**, *96*, 1069–1075, doi:10.1007/s00277-017-3002-1.
31. Ginsberg, L.E.; Leeds, N.E. Neuroradiology of leukemia. *American Journal of Roentgenology* **1995**, *165*, 525–534, doi:10.2214/ajr.165.3.7645463.
32. Lenk, L.; Alsadeq, A.; Schewe, D.M. Involvement of the central nervous system in acute lymphoblastic leukemia: opinions on molecular mechanisms and clinical implications based on recent data. *Cancer Metastasis Rev* **2020**, 173–187.
33. Yousif, L.F.; Di Russo, J.; Sorokin, L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh. Migr.* **2013**, *7*, 101–110, doi:10.4161/cam.22680.
34. Louveau, A.; Herz, J.; Alme, M.N.; Salvador, A.F.; Dong, M.Q.; Viar, K.E.; Herod, S.G.; Knopp, J.; Setliff, J.C.; Lupi, A.L.; et al. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nat Neurosci* **2018**, *21*, 1380–1391, doi:10.1038/s41593-018-0227-9.
35. Mrass, P.; Weninger, W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev* **2006**, *213*, 195–212, doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00433.x.
36. Locatelli, F.; Zugmaier, G.; Mergen, N.; Bader, P.; Jeha, S.; Schlegel, P.-G.; Bourquin, J.-P.; Handgretinger, R.; Brethon, B.; Rossig, C.; et al. Blinatumomab in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: results of the RIALTO trial, an expanded access study. *Blood Cancer J.* **2020**, *10*, 77, doi:10.1038/s41408-020-00342-x.

37. Kantarjian, H.; Stein, A.; Gökbuget, N.; Fielding, A.K.; Schuh, A.C.; Ribera, J.-M.; Wei, A.; Dombret, H.; Foà, R.; Bassan, R.; et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 836–847, doi:10.1056/NEJMoa1609783.
38. Anagnostou, T.; Riaz, I.B.; Hashmi, S.K.; Murad, M.H.; Kenderian, S.S. Anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy in acute lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Haematology* **2020**, *7*, e816-e826, doi:10.1016/S2352-3026(20)30277-5.
39. Locatelli, F.; Zugmaier, G.; Bader, P.; Jeha, S.; Schlegel, P.-G.; Bourquin, J.-P.; Handgretinger, R.; Brethon, B.; Rossig, C.; Chen-Santel, C. Blinatumomab in Pediatric Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Precursor and Molecularly Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia (R/R ALL): Updated Analysis of 110 Patients Treated in an Expanded Access Study (RIALTO). *Blood* **2019**, *134*, 1294, doi:10.1182/blood-2019-121615.
40. Kantarjian, H.M.; DeAngelo, D.J.; Stelljes, M.; Liedtke, M.; Stock, W.; Gökbuget, N.; O'Brien, S.M.; Jabbour, E.; Wang, T.; Liang White, J.; et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study. *Cancer* **2019**, *125*, 2474–2487, doi:10.1002/cncr.32116.
41. Berczi, I.; Szentivanyi, A. Immunoglobulins. The Immune-Neuroendocrine Circuitry History and Progress; *Elsevier*, **2003**; pp 117–127, ISBN 9780444508515.
42. Murphy, K.; Weaver, C. *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. 2018; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2018**, ISBN 9783662560044.
43. Liu, L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* **2018**, *9*, 15–32, doi:10.1007/s13238-017-0408-4.
44. Schroeder, H.W.; Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S41-52, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
45. Roopenian, D.C.; Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 715–725, doi:10.1038/nri2155.
46. Carter, P.J.; Lazar, G.A. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 197–223, doi:10.1038/nrd.2017.227.
47. Behring, E. von. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren **1890**, doi:10.17192/eb2013.0164.
48. Paul Ehrlich. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond.* **1900**, *66*, 424–448, doi:10.1098/rspl.1899.0121.
49. KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497, doi:10.1038/256495a0.
50. Silberstein, S.; Lenz, R.; Xu, C. Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Headache Specialists Need to Know. *Headache* **2015**, *55*, 1171–1182, doi:10.1111/head.12642.

51. Kung, P.; Goldstein, G.; Reinherz, E.L.; Schlossman, S.F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* **1979**, *206*, 347–349, doi:10.1126/science.314668.
52. Schroeder, T.J.; First, M.R.; Mansour, M.E.; Hurtubise, P.E.; Hariharan, S.; Ryckman, F.C.; Munda, R.; Melvin, D.B.; Penn, I.; Ballistreri, W.F. Antimurine antibody formation following OKT3 therapy. *Transplantation* **1990**, *49*, 48–51, doi:10.1097/00007890-199001000-00010.
53. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 118–129, doi:10.1038/35101072.
54. Morrison, S.L.; Johnson, M.J.; Herzenberg, L.A.; Oi, V.T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81*, 6851–6855, doi:10.1073/pnas.81.21.6851.
55. Jones, P.T.; Dear, P.H.; Foote, J.; Neuberger, M.S.; Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **1986**, *321*, 522–525, doi:10.1038/321522a0.
56. Barbas, C.F.; Bain, J.D.; Hoekstra, D.M.; Lerner, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 4457–4461, doi:10.1073/pnas.89.10.4457.
57. Lee, E.-C.; Liang, Q.; Ali, H.; Bayliss, L.; Beasley, A.; Bloomfield-Gerdes, T.; Bonoli, L.; Brown, R.; Campbell, J.; Carpenter, A.; et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 356–363, doi:10.1038/nbt.2825.
58. Mullard, A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20*, 491–495, doi:10.1038/d41573-021-00079-7.
59. Scott, A.M.; Wolchok, J.D.; Old, L.J. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 278–287, doi:10.1038/nrc3236.
60. Slamon, D.J.; Godolphin, W.; Jones, L.A.; Holt, J.A.; Wong, S.G.; Keith, D.E.; Levin, W.J.; Stuart, S.G.; Udove, J.; Ullrich, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **1989**, *244*, 707–712, doi:10.1126/science.2470152.
61. Salomon, D.S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **1995**, *19*, 183–232, doi:10.1016/1040-8428(94)00144-I.
62. Vincenzi, B.; Schiavon, G.; Silletta, M.; Santini, D.; Tonini, G. The biological properties of cetuximab. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2008**, *68*, 93–106, doi:10.1016/j.critrevonc.2008.07.006.
63. Harries, M.; Smith, I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-related cancer* **2002**, *9*, 75–85, doi:10.1677/erc.0.0090075.
64. Vitale, C.; Romagnani, C.; Falco, M.; Ponte, M.; Vitale, M.; Moretta, A.; Bacigalupo, A.; Moretta, L.; Mingari, M.C. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of

- normal or leukemic myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96, 15091–15096, doi:10.1073/pnas.96.26.15091.
65. Shan, D.; Ledbetter, J.A.; Press, O.W. Apoptosis of Malignant Human B Cells by Ligation of CD20 With Monoclonal Antibodies. *Blood* **1998**, 91, 1644–1652, doi:10.1182/blood.V91.5.1644.
66. Lemke, J.; Karstedt, S. von; Zinngrebe, J.; Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ* **2014**, 21, 1350–1364, doi:10.1038/cdd.2014.81.
67. Sharma, S.; Vries, E.G. de; Infante, J.R.; Oldenhuis, C.N.; Gietema, J.A.; Yang, L.; Bilic, S.; Parker, K.; Goldbrunner, M.; Scott, J.W.; et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the DR5 antibody LBY135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **2014**, 32, 135–144, doi:10.1007/s10637-013-9952-9.
68. Younes, A.; Vose, J.M.; Zelenetz, A.D.; Smith, M.R.; Burris, H.A.; Ansell, S.M.; Klein, J.; Halpern, W.; Miceli, R.; Kumm, E.; et al. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* **2010**, 103, 1783–1787, doi:10.1038/sj.bjc.6605987.
69. Ravetch, J.V.; Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 275–290, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.275.
70. Charmsaz, S.; Scott, A.M.; Boyd, A.W. Targeted therapies in hematological malignancies using therapeutic monoclonal antibodies against Eph family receptors. *Experimental Hematology* **2017**, 54, 31–39, doi:10.1016/j.exphem.2017.07.003.
71. Sulica, A.; Morel, P.; Metes, D.; Herberman, R.B. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *International Reviews of Immunology* **2001**, 20, 371–414, doi:10.3109/08830180109054414.
72. Weers, M. de; Tai, Y.-T.; van der Veer, M.S.; Bakker, J.M.; Vink, T.; Jacobs, D.C.H.; Oomen, L.A.; Peipp, M.; Valerius, T.; Slootstra, J.W.; et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* **2011**, 186, 1840–1848, doi:10.4049/jimmunol.1003032.
73. Gül, N.; Babes, L.; Siegmund, K.; Korthouwer, R.; Bögels, M.; Braster, R.; Vidarsson, G.; Hagen, T.L.M. ten; Kubes, P.; van Egmond, M. Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Invest.* **2014**, 124, 812–823, doi:10.1172/JCI66776.
74. Dunkelberger, J.R.; Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **2010**, 20, 34–50, doi:10.1038/cr.2009.139.
75. Di Gaetano, N.; Cittera, E.; Nota, R.; Vecchi, A.; Grieco, V.; Scanziani, E.; Botto, M.; Introna, M.; Golay, J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol* **2003**, 171, 1581–1587, doi:10.4049/jimmunol.171.3.1581.
76. Teeling, J.L.; French, R.R.; Cragg, M.S.; van den Brakel, J.; Pluyter, M.; Huang, H.; Chan, C.; Parren, P.W.H.I.; Hack, C.E.; Dechant, M.; et al. Characterization of new human CD20

- monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **2004**, *104*, 1793–1800, doi:10.1182/blood-2004-01-0039.
77. Löffler, A.; Kufer, P.; Lutterbüse, R.; Zettl, F.; Daniel, P.T.; Schwenkenbecher, J.M.; Riethmüller, G.; Dörken, B.; Bargou, R.C. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* **2000**, *95*, 2098–2103.
78. Sterner, R.C.; Sterner, R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal* **2021**, *11*, 69, doi:10.1038/s41408-021-00459-7.
79. Dotti, G.; Gottschalk, S.; Savoldo, B.; Brenner, M.K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev* **2014**, *257*, 107–126, doi:10.1111/imr.12131.
80. Pianko, M.J.; Liu, Y.; Bagchi, S.; Lesokhin, A.M. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig.* **2017**, *4*, 32, doi:10.21037/sci.2017.03.04.
81. Chan, T.S.Y.; Hwang, Y.-Y.; Khong, P.-L.; Leung, A.Y.H.; Chim, C.-S.; Tse, E.W.C.; Kwong, Y.-L. Low-dose pembrolizumab and nivolumab were efficacious and safe in relapsed and refractory classical Hodgkin lymphoma: Experience in a resource-constrained setting. *Hematol. Oncol.* **2020**, *38*, 726–736, doi:10.1002/hon.2787.
82. Garnett, M.C. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *53*, 171–216, doi:10.1016/S0169-409X(01)00227-7.
83. Witzig, T.E.; Flinn, I.W.; Gordon, L.I.; Emmanouilides, C.; Czuczman, M.S.; Saleh, M.N.; Cripe, L.; Wiseman, G.; Olejnik, T.; Multani, P.S.; et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *JCO* **2002**, *20*, 3262–3269, doi:10.1200/JCO.2002.11.017.
84. Sutherland, M.S.K.; Sanderson, R.J.; Gordon, K.A.; Andreyka, J.; Cervený, C.G.; Yu, C.; Lewis, T.S.; Meyer, D.L.; Zabinski, R.F.; Doronina, S.O.; et al. Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 10540–10547, doi:10.1074/jbc.M510026200.
85. Younes, A.; Gopal, A.K.; Smith, S.E.; Ansell, S.M.; Rosenblatt, J.D.; Savage, K.J.; Ramchandren, R.; Bartlett, N.L.; Cheson, B.D.; Vos, S. de; et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *JCO* **2012**, *30*, 2183–2189, doi:10.1200/JCO.2011.38.0410.
86. Janus, A.; Robak, T. Moxetumomab pasudotox for the treatment of hairy cell leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2019**, *19*, 501–508, doi:10.1080/14712598.2019.1614558.
87. Neri, D.; Sondel, P.M. Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future. *Current Opinion in Immunology* **2016**, *40*, 96–102, doi:10.1016/j.coi.2016.03.006.
88. Stieglmaier, J.; Bremer, E.; Kellner, C.; Liebig, T.M.; Cate, B. ten; Peipp, M.; Schulze-Koops, H.; Pfeiffer, M.; Bühring, H.-J.; Greil, J.; et al. Selective induction of apoptosis in leukemic B-

- lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 233–246, doi:10.1007/s00262-007-0370-8.
89. Siegemund, M.; Schneider, F.; Hutt, M.; Seifert, O.; Müller, I.; Kulms, D.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R.E. IgG-single-chain TRAIL fusion proteins for tumour therapy. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7808, doi:10.1038/s41598-018-24450-8.
90. Schneider, B.; Münkler, S.; Krippner-Heidenreich, A.; Grunwald, I.; Wels, W.S.; Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Gerspach, J. Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e68, doi:10.1038/cddis.2010.45.
91. Bremer, E.; Samplonius, D.F.; Peipp, M.; van Genne, L.; Kroesen, B.-J.; Fey, G.H.; Gramatzki, M.; Leij, L.F.M.H. de; Helfrich, W. Target cell-restricted apoptosis induction of acute leukemic T cells by a recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion protein with specificity for human CD7. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3380–3388, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2756.
92. Carter, P.; Smith, L.; Ryan, M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocrine-related cancer* **2004**, *11*, 659–687, doi:10.1677/erc.1.00766.
93. Park, C.Y.; Tseng, D.; Weissman, I.L. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 219–230, doi:10.1038/mt.2008.254.
94. Thomas, A.; Teicher, B.A.; Hassan, R. Antibody–drug conjugates for cancer therapy. *The Lancet Oncology* **2016**, *17*, e254-e262, doi:10.1016/S1470-2045(16)30030-4.
95. Schroeder, H.W.; Radbruch, A.; Berek, C. B-Cell Development and Differentiation. *Clinical Immunology; Elsevier*, **2019**; 107-118.e1, ISBN 9780702068966.
96. Thomas, D.A.; O'Brien, S.; Jorgensen, J.L.; Cortes, J.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; Verstovsek, S.; Koller, C.; Pierce, S.; Huh, Y.; et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2009**, *113*, 6330–6337, doi:10.1182/blood-2008-04-151860.
97. Chevallier, P.; Pigneux, A.; Robillard, N.; Ayari, S.; Guillaume, T.; Delaunay, J.; Eveillard, M.; Dumas, P.-Y.; Lippert, E.; Mohty, M.; et al. Rituximab for the treatment of adult relapsed/refractory CD20 positive B-ALL patients: a pilot series. *Leukemia Research* **2012**, *36*, 311–315, doi:10.1016/j.leukres.2011.11.010.
98. Kennedy, G.A.; Tey, S.-K.; Cobcroft, R.; Marlton, P.; Cull, G.; Grimmett, K.; Thomson, D.; Gill, D. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol* **2002**, *119*, 412–416, doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03843.x.
99. O'Reilly, M.K.; Tian, H.; Paulson, J.C. CD22 is a recycling receptor that can shuttle cargo between the cell surface and endosomal compartments of B cells. *J Immunol* **2011**, *186*, 1554–1563, doi:10.4049/jimmunol.1003005.
100. Kantarjian, H.M.; DeAngelo, D.J.; Advani, A.S.; Stelljes, M.; Kebriaei, P.; Cassaday, R.D.; Merchant, A.A.; Fujishima, N.; Uchida, T.; Calbacho, M.; et al. Hepatic adverse event profile

- of inotuzumab ozogamicin in adult patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: results from the open-label, randomised, phase 3 INO-VATE study. *The Lancet Haematology* **2017**, *4*, e387-e398, doi:10.1016/S2352-3026(17)30103-5.
101. Scheuermann, R.H.; Racila, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk. Lymphoma* **1995**, *18*, 385–397, doi:10.3109/10428199509059636.
102. Uckun, F.M.; Jaszcz, W.; Ambrus, J.L.; Fauci, A.S.; Gajl-Peczalska, K.; Song, C.W.; Wick, M.R.; Myers, D.E.; Waddick, K.; Ledbetter, J.A. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* **1988**, *71*, 13–29.
103. Nadler, L.M.; Anderson, K.C.; Marti, G.; Bates, M.; Park, E.; Daley, J.F.; Schlossman, S.F. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.* **1983**, *131*, 244–250.
104. Raponi, S.; Propriis, M.S. de; Intoppa, S.; Milani, M.L.; Vitale, A.; Elia, L.; Perbellini, O.; Pizzolo, G.; Foá, R.; Guarini, A. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma* **2011**, *52*, 1098–1107, doi:10.3109/10428194.2011.559668.
105. Rothe, G.; Schmitz, G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* **1996**, *10*, 877–895.
106. Tedder, T.F.; Isaacs, C.M. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **1989**, *143*, 712–717.
107. Wang, K.; Wei, G.; Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* **2012**, *1*, 36, doi:10.1186/2162-3619-1-36.
108. Bradbury, L.E.; Kansas, G.S.; Levy, S.; Evans, R.L.; Tedder, T.F. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* **1992**, *149*, 2841–2850.
109. Carter, R.H.; Wang, Y.; Brooks, S. Role of CD19 Signal Transduction in B Cell Biology. *IR* **2002**, *26*, 45–54, doi:10.1385/IR:26:1-3:045.
110. Matsumoto, A.K.; Martin, D.R.; Carter, R.H.; Klickstein, L.B.; Ahearn, J.M.; Fearon, D.T. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **1993**, *178*, 1407–1417, doi:10.1084/jem.178.4.1407.
111. Chalupny, N.J.; Kanner, S.B.; Schieven, G.L.; Wee, S.F.; Gilliland, L.K.; Aruffo, A.; Ledbetter, J.A. Tyrosine phosphorylation of CD19 in pre-B and mature B cells. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2691–2696.
112. Uckun, F.M.; Burkhardt, A.L.; Jarvis, L.; Jun, X.; Stealey, B.; Dibirdik, I.; Myers, D.E.; Tuel-Ahlgren, L.; Bolen, J.B. Signal transduction through the CD19 receptor during discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 21172–21184.

113. Carter, R.H.; Fearon, D.T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* **1992**, *256*, 105–107, doi:10.1126/science.1373518.
114. Engel, P.; Zhou, L.-J.; Ord, D.C.; Sato, S.; Koller, B.; Tedder, T.F. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* **1995**, *3*, 39–50, doi:10.1016/1074-7613(95)90157-4.
115. Rickert, R.C.; Rajewsky, K.; Roes, J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* **1995**, *376*, 352–355, doi:10.1038/376352a0.
116. van Zelm, M.C.; Reisli, I.; van der Burg, M.; Castaño, D.; van Noesel, C.J.M.; van Tol, M.J.D.; Woellner, C.; Grimbacher, B.; Patiño, P.J.; van Dongen, J.J.M.; et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* **2006**, *354*, 1901–1912, doi:10.1056/NEJMoa051568.
117. Press, O.W.; Farr, A.G.; Borroz, K.I.; Anderson, S.K.; Martin, P.J. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4906–4912.
118. Caimi, P.F.; Ai, W.; Alderuccio, J.P.; Ardeshtna, K.M.; Hamadani, M.; Hess, B.; Kahl, B.S.; Radford, J.; Solh, M.; Stathis, A.; et al. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (LOTIS-2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **2021**, *22*, 790–800, doi:10.1016/S1470-2045(21)00139-X.
119. FDA grants accelerated approval to loncastuximab tesirine-lpyl for large B-cell lymphoma. *FDA [Online]*, <time datetime="2021-06-11T08:30:51Z">Fri, June 11, 2021 - 08:30</time>. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-loncastuximab-tesirine-lpyl-large-b-cell-lymphoma> (accessed on 1 November **2021**).
120. Jain, T.; Litzow, M.R. Management of toxicities associated with novel immunotherapy agents in acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology* **2020**, *11*, 2040620719899897, doi:10.1177/2040620719899897.
121. Kellner, C.; Otte, A.; Cappuzzello, E.; Klausz, K.; Peipp, M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother* **2017**, *44*, 327–336, doi:10.1159/000479980.
122. Horton, H.M.; Bennett, M.J.; Pong, E.; Peipp, M.; Karki, S.; Chu, S.Y.; Richards, J.O.; Vostiar, I.; Joyce, P.F.; Repp, R.; et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8049–8057, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2268.
123. Schewe, D.M.; Alsadeq, A.; Sattler, C.; Lenk, L.; Vogiatzi, F.; Cario, G.; Vieth, S.; Valerius, T.; Roskopf, S.; Meyersieck, F.; et al. An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood* **2017**, *130*, 1543–1552, doi:10.1182/blood-2017-01-764316.

124. Klisovic, R.B.; Leung, W.H.; Brugger, W.; Dirnberger-Hertweck, M.; Winderlich, M.; Ambarkhane, S.V.; Jabbour, E.J. A phase 2a, single-arm, open-label study of tafasitamab, a humanized, Fc-modified, anti-CD19 antibody, in patients with relapsed/refractory B-precursor cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **2021**, doi:10.1002/cncr.33796.
125. Lockshin, R.A.; Williams, C.M. Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. *Journal of Insect Physiology* **1965**, *11*, 123–133, doi:10.1016/0022-1910(65)90099-5.
126. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **1972**, *26*, 239–257, doi:10.1038/bjc.1972.33.
127. Zeiss, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* **2003**, *40*, 481–495, doi:10.1354/vp.40-5-481.
128. Wyllie, A.H.; Kerr, J.; Currie, A.R. Cell Death: The Significance of Apoptosis; *Elsevier*, **1980**; pp 251–306, ISBN 9780123644688.
129. Fadok, V.A.; Savill, J.S.; Haslett, C.; Bratton, D.L.; Doherty, D.E.; Campbell, P.A.; Henson, P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J.I.* **1992**, *149*, 4029–4035.
130. Surh, C.D.; Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **1994**, *372*, 100–103, doi:10.1038/372100a0.
131. Brill, A.; Torchinsky, A.; Carp, H.; Toder, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **1999**, *16*, 512–519, doi:10.1023/A:1020541019347.
132. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
133. Mattson, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 120–129, doi:10.1038/35040009.
134. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* **2019**, *43*, 582–592, doi:10.1002/cbin.11137.
135. Stroh, C.; Schulze-Osthoff, K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* **1998**, *5*, 997–1000, doi:10.1038/sj.cdd.4400451.
136. Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **1998**, *281*, 1312–1316, doi:10.1126/science.281.5381.1312.
137. Wesselborg, S.; Engels, I.H.; Rossmann, E.; Los, M.; Schulze-Osthoff, K. Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* **1999**, *93*, 3053–3063.
138. Obeng, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz. J. Biol.* **2021**, *81*, 1133–1143, doi:10.1590/1519-6984.228437.

139. Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **2000**, *288*, 1053–1058, doi:10.1126/science.288.5468.1053.
140. Nakano, K.; Vousden, K.H. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* **2001**, *7*, 683–694, doi:10.1016/S1097-2765(01)00214-3.
141. Toshiyuki, M.; Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **1995**, *80*, 293–299, doi:10.1016/0092-8674(95)90412-3.
142. Sarosiek, K.A.; Chi, X.; Bachman, J.A.; Sims, J.J.; Montero, J.; Patel, L.; Flanagan, A.; Andrews, D.W.; Sorger, P.; Letai, A. BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Molecular Cell* **2013**, *51*, 751–765, doi:10.1016/j.molcel.2013.08.048.
143. Green, D.R.; Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **2004**, *305*, 626–629, doi:10.1126/science.1099320.
144. Liu, X.; Kim, C.N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* **1996**, *86*, 147–157, doi:10.1016/S0092-8674(00)80085-9.
145. Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 11549–11556, doi:10.1074/jbc.274.17.11549.
146. Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization. *Molecular Cell* **1998**, *1*, 949–957, doi:10.1016/S1097-2765(00)80095-7.
147. Saelens, X.; Festjens, N.; Vande Walle, L.; van Gorp, M.; van Loo, G.; Vandenberghe, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **2004**, *23*, 2861–2874, doi:10.1038/sj.onc.1207523.
148. Itoh, N.; Nagata, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 10932–10937, doi:10.1016/s0021-9258(18)82075-0.
149. Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P.H. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* **2005**, *118*, 265–267, doi:10.1242/jcs.01610.
150. Keller, N.; Mares, J.; Zerbe, O.; Grütter, M.G. Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* **2009**, *17*, 438–448, doi:10.1016/j.str.2008.12.019.
151. Ichim, G.; Tait, S.W.G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 539–548, doi:10.1038/nrc.2016.58.
152. Wiley, S.R.; Schooley, K.; Smolak, P.J.; Din, W.S.; Huang, C.-P.; Nicholl, J.K.; Sutherland, G.R.; Smith, T.D.; Rauch, C.; Smith, C.A.; et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**, *3*, 673–682, doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8.

153. Pitti, R.M.; Marsters, S.A.; Ruppert, S.; Donahue, C.J.; Moore, A.; Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12687–12690, doi:10.1074/jbc.271.22.12687.
154. Mariani, S.M.; Krammer, P.H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 973–982, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<973:AID-IMMU973>3.0.CO;2-T.
155. Hymowitz, S.G.; Christinger, H.W.; Fuh, G.; Ultsch, M.; O'Connell, M.; Kelley, R.F.; Ashkenazi, A.; Vos, A.M. de. Triggering Cell Death. *Molecular Cell* **1999**, *4*, 563–571, doi:10.1016/S1097-2765(00)80207-5.
156. Bodmer, J.L.; Meier, P.; Tschopp, J.; Schneider, P. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 20632–20637, doi:10.1074/jbc.M909721199.
157. Pan, G.; O'Rourke, K.; Chinnaiyan, A.M.; Gentz, R.; Ebner, R.; Ni, J.; Dixit, V.M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **1997**, *276*, 111–113, doi:10.1126/science.276.5309.111.
158. Emery, J.G.; McDonnell, P.; Burke, M.B.; Deen, K.C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E.R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14363–14367, doi:10.1074/jbc.273.23.14363.
159. Sheridan, J.P.; Marsters, S.A.; Pitti, R.M.; Gurney, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Ramakrishnan, L.; Gray, C.L.; Baker, K.; Wood, W.I.; et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **1997**, *277*, 818–821, doi:10.1126/science.277.5327.818.
160. Pan, G.; Ni, J.; Wei, Y.F.; Yu, G.; Gentz, R.; Dixit, V.M. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **1997**, *277*, 815–818, doi:10.1126/science.277.5327.815.
161. Degli-Esposti, M.A.; Dougall, W.C.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Smith, C.A.; Goodwin, R.G. The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* **1997**, *7*, 813–820, doi:10.1016/S1074-7613(00)80399-4.
162. Marsters, S.A.; Sheridan, J.P.; Pitti, R.M.; Huang, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Yuan, J.; Gurney, A.; Goddard, A.D.; Godowski, P.; et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology* **1997**, *7*, 1003–1006, doi:10.1016/S0960-9822(06)00422-2.
163. Wu, G.S.; Burns, T.F.; Zhan, Y.; Alnemri, E.S.; El-Deiry, W.S. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* **1999**, *59*, 2770–2775.
164. Bossen, C.; Ingold, K.; Tardivel, A.; Bodmer, J.-L.; Gaide, O.; Hertig, S.; Ambrose, C.; Tschopp, J.; Schneider, P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family

- members in the mouse and human. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13964–13971, doi:10.1074/jbc.M601553200.
165. Ozören, N.; El-Deiry, W.S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* **2002**, *4*, 551–557, doi:10.1038/sj.neo.7900270.
166. Schug, Z.T.; Gonzalvez, F.; Houtkooper, R.H.; Vaz, F.M.; Gottlieb, E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ* **2011**, *18*, 538–548, doi:10.1038/cdd.2010.135.
167. Azijli, K.; Weyhenmeyer, B.; Peters, G.J.; Jong, S. de; Kruyt, F.A.E. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 858–868, doi:10.1038/cdd.2013.28.
168. Leroy, B.; Anderson, M.; Soussi, T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Human Mutation* **2014**, *35*, 672–688, doi:10.1002/humu.22552.
169. Walczak, H.; Miller, R.E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T.S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones, J.; Woodward, A.; Le, T.; et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157–163, doi:10.1038/5517.
170. Ashkenazi, A.; Pai, R.C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D.A.; Marsters, S.A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A.E.; Hebert, A.; et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 155–162, doi:10.1172/JCI6926.
171. Gazitt, Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* **1999**, *13*, 1817–1824, doi:10.1038/sj.leu.2401501.
172. Kelley, S.K.; Harris, L.A.; Xie, D.; DeForge, L.; Totpal, K.; Bussiere, J.; Fox, J.A. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 31–38.
173. Gliniak, B.; Le, T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 6153–6158.
174. Chinnaiyan, A.M.; Prasad, U.; Shankar, S.; Hamstra, D.A.; Shanaiah, M.; Chenevert, T.L.; Ross, B.D.; Rehemtulla, A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 1754–1759, doi:10.1073/pnas.030545097.
175. Mitsiades, C.S.; Treon, S.P.; Mitsiades, N.; Shima, Y.; Richardson, P.; Schlossman, R.; Hideshima, T.; Anderson, K.C. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **2001**, *98*, 795–804, doi:10.1182/blood.V98.3.795.
176. Pollack, I.F.; Erff, M.; Ashkenazi, A. Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of

- glioma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2001**, 7, 1362–1369.
177. Castro Alves, C.; Terziyska, N.; Grunert, M.; Gündisch, S.; Graubner, U.; Quintanilla-Martinez, L.; Jeremias, I. Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL. *Blood* **2012**, 119, 4224–4227, doi:10.1182/blood-2011-08-370114.
178. Belada, D.; Mayer, J.; Czuczman, M.S.; Flinn, I.W.; Durbin-Johnson, B.; Bray, G.L. Phase II study of dulanermin plus rituximab in patients with relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *JCO* **2010**, 28, 8104, doi:10.1200/jco.2010.28.15_suppl.8104.
179. Soria, J.-C.; Márk, Z.; Zatloukal, P.; Szima, B.; Albert, I.; Juhász, E.; Pujol, J.-L.; Kozielski, J.; Baker, N.; Smethurst, D.; et al. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 4442–4451, doi:10.1200/JCO.2011.37.2623.
180. Greco, F.A.; Bonomi, P.; Crawford, J.; Kelly, K.; Oh, Y.; Halpern, W.; Lo, L.; Gallant, G.; Klein, J. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2008**, 61, 82–90, doi:10.1016/j.lungcan.2007.12.011.
181. Paz-Ares, L.; Bálint, B.; Boer, R.H. de; van Meerbeeck, J.P.; Wierzbicki, R.; Souza, P. de; Galimi, F.; Haddad, V.; Sabin, T.; Hei, Y.; et al. A randomized phase 2 study of paclitaxel and carboplatin with or without conatumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, 8, 329–337, doi:10.1097/JTO.0b013e31827ce554.
182. Reck, M.; Krzakowski, M.; Chmielowska, E.; Sebastian, M.; Hadler, D.; Fox, T.; Wang, Q.; Greenberg, J.; Beckman, R.A.; Pawel, J. von. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naïve metastatic/unresectable non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2013**, 82, 441–448, doi:10.1016/j.lungcan.2013.09.014.
183. Herbst, R.S.; Eckhardt, S.G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P.J.; Gordon, M.S.; Novotny, W.; Goldwasser, M.A.; Tohny, T.M.; Lum, B.L.; et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28, 2839–2846, doi:10.1200/JCO.2009.25.1991.
184. Unverdorben, F.; Richter, F.; Hutt, M.; Seifert, O.; Malinge, P.; Fischer, N.; Kontermann, R.E. Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *MAbs* **2016**, 8, 120–128, doi:10.1080/19420862.2015.1113360.
185. Wajant, H.; Moosmayer, D.; Wüest, T.; Bartke, T.; Gerlach, E.; Schönherr, U.; Peters, N.; Scheurich, P.; Pfizenmaier, K. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **2001**, 20, 4101–4106, doi:10.1038/sj.onc.1204558.

186. Amersdorffer J, Steidl S, Winderlich M, Krohn S, Rojkjaer L, inventors; Morphosys AG, assignee. Combination therapy with an anti-CD19 antibody and a purine analog.: US patent 20140227277. 14 August **2012**.
187. Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C.M.; Ridgway, J.B.; Henner, D.; Wong, W.L.; Rowland, A.M.; Kotts, C.; Carver, M.E.; Shepard, H.M. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 4285–4289, doi:10.1073/pnas.89.10.4285.
188. Gunasekaran, K.; Pentony, M.; Shen, M.; Garrett, L.; Forte, C.; Woodward, A.; Ng, S.B.; Born, T.; Retter, M.; Manchulenko, K.; et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19637–19646, doi:10.1074/jbc.M110.117382.
189. Demeule, M.; Régina, A.; Ché, C.; Poirier, J.; Nguyen, T.; Gabathuler, R.; Castaigne, J.-P.; Béliveau, R. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, *324*, 1064–1072, doi:10.1124/jpet.107.131318.
190. Fischer, U.; Forster, M.; Rinaldi, A.; Risch, T.; Sungalee, S.; Warnatz, H.-J.; Bornhauser, B.; Gombert, M.; Kratsch, C.; Stütz, A.M.; et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1020–1029, doi:10.1038/ng.3362.
191. Bremer, E.; Kuijlen, J.; Samplonius, D.; Walczak, H.; Leij, L. de; Helfrich, W. Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2. *Int. J. Cancer* **2004**, *109*, 281–290, doi:10.1002/ijc.11702.
192. Jutta Amersdorffer, Stefan Steidl, Mark Winderlich, Susanne Krohn, Lisa Rojkjaer. Combination therapy with an anti-CD19 antibody and a purine analog: US patent 20140227277. 14 August **2012**.
193. Redman, J.M.; Hill, E.M.; AlDeghaither, D.; Weiner, L.M. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Molecular Immunology* **2015**, *67*, 28–45, doi:10.1016/j.molimm.2015.04.002.
194. Wang, S.; El-Deiry, W.S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **2003**, *22*, 8628–8633, doi:10.1038/sj.onc.1207232.
195. Schlegel, R.A.; Williamson, P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* **2001**, *8*, 551–563, doi:10.1038/sj.cdd.4400817.
196. Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Frasch, S.C.; Warner, M.L.; Henson, P.M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **1998**, *5*, 551–562, doi:10.1038/sj.cdd.4400404.
197. Fulda, S.; Meyer, E.; Debatin, K.-M. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **2002**, *21*, 2283–2294, doi:10.1038/sj.onc.1205258.

198. Rokhlin, O.W.; Guseva, N.; Tagiyev, A.; Knudson, C.M.; Cohen, M.B. Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis. *Oncogene* **2001**, *20*, 2836–2843, doi:10.1038/sj.onc.1204410.
199. Sun, S.Y.; Yue, P.; Zhou, J.Y.; Wang, Y.; Choi Kim, H.R.; Lotan, R.; Wu, G.S. Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *280*, 788–797, doi:10.1006/bbrc.2000.4218.
200. Kapoor, I.; Bodo, J.; Hill, B.T.; Hsi, E.D.; Almasan, A. Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance. *Cell Death Dis* **2020**, *11*, 941, doi:10.1038/s41419-020-03144-y.
201. Souers, A.J.; Levenson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J.; Dayton, B.D.; Ding, H.; Enschede, S.H.; Fairbrother, W.J.; et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202–208, doi:10.1038/nm.3048.
202. Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R.D.; Korsmeyer, S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **1990**, *348*, 334–336, doi:10.1038/348334a0.
203. Tahir, S.K.; Smith, M.L.; Solomon, L.R.; Zhang, H.; Xue, J.C.; Xiao, Y.; Cheng, D.; Buchanan, G.; Morgan-Lappe, S.; Phillips, D.C. Abbv-621 Is a Novel and Potent TRAIL Receptor Agonist Fusion Protein That Induces Apoptosis Alone and in Combination with Navitoclax and Venetoclax in Hematological Tumors. *Blood* **2017**, *130*, 2812, doi:10.1182/blood.V130.Suppl_1.2812.2812.
204. Lincoln, F.A.; Imig, D.; Boccellato, C.; Juric, V.; Noonan, J.; Kontermann, R.E.; Allgöwer, F.; Murphy, B.M.; Rehm, M. Sensitization of glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by IAP- and Bcl-2 antagonism. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 1112, doi:10.1038/s41419-018-1160-2.
205. Chou, T.-C.; Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* **1984**, *22*, 27–55, doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
206. Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)* **2020**, *9*, doi:10.3390/antib9030034.
207. Wang, W.; Wang, E.Q.; Balthasar, J.P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical pharmacology and therapeutics* **2008**, *84*, 548–558, doi:10.1038/clpt.2008.170.
208. Ché, C.; Yang, G.; Thiot, C.; Lacoste, M.-C.; Currie, J.-C.; Demeule, M.; Régina, A.; Béliveau, R.; Castaigne, J.-P. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2814–2824, doi:10.1021/jm9016637.
209. Régina, A.; Demeule, M.; Ché, C.; Lavallée, I.; Poirier, J.; Gabathuler, R.; Béliveau, R.; Castaigne, J.-P. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new

- brain delivery vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 185–197, doi:10.1038/bjp.2008.260.
210. Regina, A.; Demeule, M.; Tripathy, S.; Lord-Dufour, S.; Currie, J.-C.; Iddir, M.; Annabi, B.; Castaigne, J.-P.; Lachowicz, J.E. ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice. *Mol Cancer Ther* **2015**, *14*, 129–140, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0399.
211. Frishman-Levy, L.; Shemesh, A.; Bar-Sinai, A.; Ma, C.; Ni, Z.; Frenkel, S.; Muench, V.; Bruckmueller, H.; Vokuhl, C.; Debatin, K.-M.; et al. Central nervous system acute lymphoblastic leukemia: role of natural killer cells. *Blood* **2015**, *125*, 3420–3431, doi:10.1182/blood-2014-08-595108.
212. Hansel, T.T.; Kropshofer, H.; Singer, T.; Mitchell, J.A.; George, A.J.T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 325–338, doi:10.1038/nrd3003.
213. Hainsworth, J.D. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma: Interim follow-up of a multicenter phase II trial. *Seminars in Oncology* **2002**, *29*, 25–29, doi:10.1053/sonc.2002.30154.
214. Hekman, A.; Honselaar, A.; Vuist, W.M.; Sein, J.J.; Rodenhuis, S.; Bokkel Huinink, W.W. ten; Somers, R.; Rümke, P.; Melief, C.J. Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* **1991**, *32*, 364–372, doi:10.1007/BF01741331.
215. Ogasawara, J.; Watanabe-Fukunaga, R.; Adachi, M.; Matsuzawa, A.; Kasugai, T.; Kitamura, Y.; Itoh, N.; Suda, T.; Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **1993**, *364*, 806–809, doi:10.1038/364806a0.
216. Hersh, E.M.; Metch, B.S.; Muggia, F.M.; Brown, T.D.; Whitehead, R.P.; Budd, G.T.; Rinehart, J.J.; Crawford, E.D.; Bonnet, J.D.; Behrens, B.C. Phase II studies of recombinant human tumor necrosis factor alpha in patients with malignant disease: a summary of the Southwest Oncology Group experience. *Journal of immunotherapy : official journal of the Society for Biological Therapy* **1991**, *10*, 426–431, doi:10.1097/00002371-199112000-00006.
217. Jo, M.; Kim, T.H.; Seol, D.W.; Esplen, J.E.; Dorko, K.; Billiar, T.R.; Strom, S.C. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 564–567, doi:10.1038/75045.
218. Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 383–385, doi:10.1038/86397.
219. Hao, C.; Song, J.H.; Hsi, B.; Lewis, J.; Song, D.K.; Petruk, K.C.; Tyrrell, D.L.J.; Kneteman, N.M. TRAIL inhibits tumor growth but is nontoxic to human hepatocytes in chimeric mice. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8502–8506, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2599.
220. Mühlenbeck, F.; Schneider, P.; Bodmer, J.L.; Schwenzler, R.; Hauser, A.; Schubert, G.; Scheurich, P.; Moosmayer, D.; Tschopp, J.; Wajant, H. The tumor necrosis factor-related

- apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 32208–32213, doi:10.1074/jbc.M000482200.
221. Truneh, A.; Sharma, S.; Silverman, C.; Khandekar, S.; Reddy, M.P.; Deen, K.C.; McLaughlin, M.M.; Srinivasula, S.M.; Livi, G.P.; Marshall, L.A.; et al. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 23319–23325, doi:10.1074/jbc.M910438199.
222. Trebing, J.; El-Mesery, M.; Schäfer, V.; Weisenberger, D.; Siegmund, D.; Silence, K.; Wajant, H. CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1035, doi:10.1038/cddis.2013.555.
223. Uckun, F.M.; Myers, D.E.; Qazi, S.; Ozer, Z.; Rose, R.; D'Cruz, O.J.; Ma, H. Recombinant human CD19L-sTRAIL effectively targets B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 1006–1018, doi:10.1172/JCI76610.
224. Bremer, E.; Samplonius, D.; Kroesen, B.-J.; van Genne, L.; Leij, L. de; Helfrich, W. Exceptionally potent anti-tumor bystander activity of an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for EGP2 toward target antigen-negative tumor cells. *Neoplasia* **2004**, *6*, 636–645, doi:10.1593/neo.04229.
225. Wuchter, C.; Krappmann, D.; Cai, Z.; Ruppert, V.; Scheidereit, C.; Dörken, B.; Ludwig, W.D.; Karawajew, L. In vitro susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of acute leukemia cells in the context of TRAIL receptor gene expression and constitutive NF-kappa B activity. *Leukemia* **2001**, *15*, 921–928, doi:10.1038/sj.leu.2402131.
226. Clodi, K.; Wimmer, D.; Li, Y.; Goodwin, R.; Jaeger, U.; Mann, G.; Gardner, H.; Younes, A. Expression of tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary B-cell acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol* **2000**, *111*, 580–586, doi:10.1111/j.1365-2141.2000.02404.x.
227. Wagner, K.W.; Punnoose, E.A.; Januario, T.; Lawrence, D.A.; Pitti, R.M.; Lancaster, K.; Lee, D.; Goetz, M. von; Yee, S.F.; Totpal, K.; et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1070–1077, doi:10.1038/nm1627.
228. Nagata, M.; Nakayama, H.; Tanaka, T.; Yoshida, R.; Yoshitake, Y.; Fukuma, D.; Kawahara, K.; Nakagawa, Y.; Ota, K.; Hiraki, A.; et al. Overexpression of cIAP2 contributes to 5-FU resistance and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* **2011**, *105*, 1322–1330, doi:10.1038/bjc.2011.387.
229. Vogler, M.; Walczak, H.; Stadel, D.; Haas, T.L.; Genze, F.; Jovanovic, M.; Gschwend, J.E.; Simmet, T.; Debatin, K.-M.; Fulda, S. Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* **2008**, *68*, 7956–7965, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1296.
230. Maude, S.L.; Laetsch, T.W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M.R.; Stefanski, H.E.; Myers, G.D.; et al. Tisagenlecleucel in Children and Young

- Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378, 439–448, doi:10.1056/NEJMoa1709866.
231. Maude, S.; Barrett, D.M. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br J Haematol* **2016**, 172, 11–22, doi:10.1111/bjh.13792.
232. Zhu, M.; Wu, B.; Brandl, C.; Johnson, J.; Wolf, A.; Chow, A.; Doshi, S. Blinatumomab, a Bispecific T-cell Engager (BiTE®) for CD-19 Targeted Cancer Immunotherapy: Clinical Pharmacology and Its Implications. *Clin Pharmacokinet* **2016**, 55, 1271–1288, doi:10.1007/s40262-016-0405-4.
233. Yan, C.; Li, S.; Li, Z.; Peng, H.; Yuan, X.; Jiang, L.; Zhang, Y.; Fan, D.; Hu, X.; Yang, M.; et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: a double-target therapy against non-Hodgkin's lymphoma. *Mol. Pharm.* **2013**, 10, 142–151, doi:10.1021/mp300261e.
234. Luca, R. de; Kachel, P.; Kropivsek, K.; Snijder, B.; Manz, M.G.; Neri, D. A novel dual-cytokine-antibody fusion protein for the treatment of CD38-positive malignancies. *Protein Eng. Des. Sel.* **2018**, 31, 173–179, doi:10.1093/protein/gzy015.
235. Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K.J.; Debatin, K.M.; Krammer, P.H.; Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **1998**, 17, 1675–1687, doi:10.1093/emboj/17.6.1675.
236. Huang, S.; Sinicrope, F.A. BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **2008**, 68, 2944–2951, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2508.
237. Khaw, S.L.; Suryani, S.; Evans, K.; Richmond, J.; Robbins, A.; Kurmasheva, R.T.; Billups, C.A.; Erickson, S.W.; Guo, Y.; Houghton, P.J.; et al. Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia. *Blood* **2016**, 128, 1382–1395, doi:10.1182/blood-2016-03-707414.
238. Pullarkat, V.A.; Lacayo, N.J.; Jabbour, E.; Rubnitz, J.E.; Bajel, A.; Laetsch, T.W.; Leonard, J.; Colace, S.I.; Khaw, S.L.; Fleming, S.A.; et al. Venetoclax and Navitoclax in Combination with Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancer Discov* **2021**, 11, 1440–1453, doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1465.
239. Taniai, M.; Grambihler, A.; Higuchi, H.; Werneburg, N.; Bronk, S.F.; Farrugia, D.J.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res.* **2004**, 64, 3517–3524, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2770.
240. Song, J.H.; Kandasamy, K.; Kraft, A.S. ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 25003–25013, doi:10.1074/jbc.M802511200.

241. Hetschko, H.; Voss, V.; Horn, S.; Seifert, V.; Prehn, J.H.M.; Kögel, D. Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology* **2008**, *86*, 265–272, doi:10.1007/s11060-007-9472-6.
242. Freskgård, P.-O.; Urich, E. Antibody therapies in CNS diseases. *Neuropharmacology* **2017**, *120*, 38–55, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.014.
243. Oller-Salvia, B.; Sánchez-Navarro, M.; Giralt, E.; Teixidó, M. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4690–4707, doi:10.1039/C6CS00076B.
244. Demeule, M.; Currie, J.-C.; Bertrand, Y.; Ché, C.; Nguyen, T.; Régina, A.; Gabathuler, R.; Castaigne, J.-P.; Béliveau, R. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *Journal of Neurochemistry* **2008**, *106*, 1534–1544, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05492.x.
245. Yu, Y.J.; Zhang, Y.; Kenrick, M.; Hoyte, K.; Luk, W.; Lu, Y.; Atwal, J.; Elliott, J.M.; Prabhu, S.; Watts, R.J.; et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Science Translational Medicine* **2011**, *3*, 84ra44, doi:10.1126/scitranslmed.3002230.
246. Price, R.A.; Johnson, W.W. The central nervous system in childhood leukemia: I. The arachnoid. *Cancer* **1973**, *31*, 520–533, doi:10.1002/1097-0142(197303)31:3<520:AID-CNCR2820310306>3.0.CO;2-2.
247. Price, R.A. Histopathology of CNS leukemia and complications of therapy. *The American journal of pediatric hematology/oncology* **1979**, *1*, 21–30.
248. Münch, V.; Trentin, L.; Herzig, J.; Demir, S.; Seyfried, F.; Kraus, J.M.; Kestler, H.A.; Köhler, R.; Barth, T.F.E.; Te Kronnie, G.; et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor. *Blood* **2017**, *130*, 643–654, doi:10.1182/blood-2017-03-769315.
249. Williams, M.T.S.; Yousafzai, Y.M.; Elder, A.; Rehe, K.; Bomken, S.; Frishman-Levy, L.; Tavor, S.; Sinclair, P.; Dormon, K.; Masic, D.; et al. The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts. *Blood* **2016**, *127*, 1998–2006, doi:10.1182/blood-2015-08-665034.
250. Ruzali, W.A.W.; Kehoe, P.G.; Love, S. LRP1 expression in cerebral cortex, choroid plexus and meningeal blood vessels: relationship to cerebral amyloid angiopathy and APOE status. *Neuroscience Letters* **2012**, *525*, 123–128, doi:10.1016/j.neulet.2012.07.065.
251. Fujiyoshi, M.; Tachikawa, M.; Ohtsuki, S.; Ito, S.; Uchida, Y.; Akanuma, S.; Kamiie, J.; Hashimoto, T.; Hosoya, K.; Iwatsubo, T.; et al. Amyloid- β peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Neurochemistry* **2011**, *118*, 407–415, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07311.x.
252. Zlokovic, B.V.; Deane, R.; Sagare, A.P.; Bell, R.D.; Winkler, E.A. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's

- amyloid β -peptide elimination from the brain. *Journal of Neurochemistry* **2010**, *115*, 1077–1089, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x.
253. Jaime-Pérez, J.C.; Rodríguez-Romo, L.N.; González-Llano, O.; Chapa-Rodríguez, A.; Gómez-Almaguer, D. Effectiveness of intrathecal rituximab in patients with acute lymphoblastic leukaemia relapsed to the CNS and resistant to conventional therapy. *Br J Haematol* **2009**, *144*, 794–795, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07497.x.
254. Rubenstein, J.L.; Li, J.; Chen, L.; Advani, R.; Drappatz, J.; Gerstner, E.; Batchelor, T.; Krouwer, H.; Hwang, J.; Auerback, G.; et al. Multicenter phase 1 trial of intraventricular immunochemotherapy in recurrent CNS lymphoma. *Blood* **2013**, *121*, 745–751, doi:10.1182/blood-2012-07-440974.
255. Ceppi, F.; Weitzman, S.; Woessmann, W.; Davies, K.; Lassaletta, A.; Reismüller, B.; Mellgren, K.; Uyttebroeck, A.; Maia, I.; Abdullah, S.; et al. Safety and efficacy of intrathecal rituximab in children with B cell lymphoid CD20+ malignancies: An international retrospective study. *American Journal of Hematology* **2016**, *91*, 486–491, doi:10.1002/ajh.24329.
256. Tilly, H.; Morschhauser, F.; Sehn, L.H.; Friedberg, J.W.; Trněný, M.; Sharman, J.P.; Herbaux, C.; Burke, J.M.; Matasar, M.; Rai, S.; et al. Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2021**, doi:10.1056/NEJMoa2115304.

Publikationsliste

Dissertationsbezogene Publikationen

Winterberg, D.; Lenk, L.; Oßwald, M.; Vogiatzi, F.; Gehlert, C.L.; Frielitz, F.-S.; Klausz, K.; Rösner, T.; Valerius, T.; Trauzold, A.; et al. Engineering of CD19 Antibodies: A CD19-TRAIL Fusion Construct Specifically Induces Apoptosis in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) Cells In Vivo. *JCM* **2021**, *10*, 2634, doi:10.3390/jcm10122634.

Weitere Publikationen

Lenk, L.; Carlet, M.; Vogiatzi, F.; Spory, L.; **Winterberg, D.;** Cousins, A.; Vossen-Gajcy, M.; Ibruli, O.; Vokuhl, C.; Cario, G.; et al. CD79a promotes CNS-infiltration and leukemia engraftment in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Commun Biol* **2021**, *4*, 73, doi:10.1038/s42003-020-01591-z.

Baumann, N.; Rösner, T.; Jansen, J.H.M.; Chan, C.; Marie Eichholz, K.; Klausz, K.; **Winterberg, D.;** Müller, K.; Humpe, A.; Burger, R.; et al. Enhancement of epidermal growth factor receptor antibody tumor immunotherapy by glutaminy cyclase inhibition to interfere with CD47/signal regulatory protein alpha interactions. *Cancer Sci.* **2021**, doi:10.1111/cas.14999.

Roßkopf, S.; Eichholz, K.M.; **Winterberg, D.;** Diemer, K.J.; Lutz, S.; Münnich, I.A.; Klausz, K.; Rösner, T.; Valerius, T.; Schewe, D.M.; et al. Enhancing CDC and ADCC of CD19 Antibodies by Combining Fc Protein-Engineering with Fc Glyco-Engineering. *Antibodies (Basel)* **2020**, *9*, doi:10.3390/antib9040063.

Vogiatzi, F.; **Winterberg, D.;** Lenk, L.; Buchmann, S.; Cario, G.; Schrappe, M.; Peipp, M.; Richter-Pechanska, P.; Kulozik, A.E.; Lentz, J.; et al. Daratumumab eradicates minimal residual disease in a preclinical model of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2019**, *134*, 713–716, doi:10.1182/blood.2019000904.

Schewe, D.M.; Lenk, L.; Vogiatzi, F.; **Winterberg, D.;** Rademacher, A.V.; Buchmann, S.; Henry, D.; Bergmann, A.K.; Cario, G.; Cox, M.C. Larotrectinib in TRK fusion-positive pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 3499–3502, doi:10.1182/bloodadvances.2019000700.

Kongressbeiträge

- **American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition, 2020**

“Co-Targeting of CD38 and CD47 in T cell acute lymphoblastic leukemia”

Fotini Vogiatzi, Kristina Müller, **Dorothee Winterberg**, Thies Rösner, Lennart Lenk, Gunnar Cario, Martin Schrappe, Andreas Kulozik, Beat Bornhauser, Jean-Pierre Bourquin, Thomas Valerius, Matthias Peipp, Christian Kellner, Denis M. Schewe

- **Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH), 2020**

„Immuntherapeutisches Co-targeting von CD38 und CD47 bei der T-ALL“

Kristina Müller, Fotini Vogiatzi, **Dorothee Winterberg**, Thies Rösner, Lennart Lenk, Gunnar, Cario, Martin Schrappe, Beat Bornhauser, Jean-Pierre Bourquin, Thomas Valerius, Matthias Peipp, Christian Kellner, Denis Schewe

- **2th I-BFM Biennial Childhood Leukemia and Lymphoma Symposium, 2020**

“Immunotherapeutic co-targeting of CD38 and CD47 in T-cell acute lymphoblastic leukemia”

Vogiatzi F, Müller K, **Winterberg D**, Rösner T, Cario G, Schrappe M, Peipp M, Valerius T, Kellner C, Schewe DM

- **Kind-Philipp-Tagung, Wilsede, 2019**

“Development of a novel central nervous system (CNS)-targeted CD19-antibody (AB) in acute lymphoblastic leukemia (ALL)”

Winterberg D, Lenk L, Tiwari S, Oßwald M, Vogiatzi F, Schrappe M, Gramatzki M, Peipp M, Kellner C, Schewe DM

- **Acute Leukemias XVII, Biology and Treatment Strategies, München, 2019**

“Enhanced Phagocytosis of leukemia cells by combination of an Fc-engineered CD19 antibody with CD47 immune checkpoint blockade”

T. Rösner, K.M. Eichholz, **D. Winterberg**, C. Wichmann, R. Windisch, A. Humpe, D.M. Schewe, M. Gramatzki, T. Valerius, M. Peipp and C. Kellner

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Denis M. Schewe für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit auf einem sehr spannenden Forschungsgebiet in seiner Arbeitsgruppe zu absolvieren, für die hervorragende Betreuung in allen Angelegenheiten, sein persönliches Engagement und seine fortwährende Unterstützung bei der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Thomas Röder möchte ich mich für die Zweitbegutachtung meiner Doktorarbeit bedanken.

Auch bei Herrn PD Dr. Christian Kellner möchte ich mich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, für die sehr gute Betreuung sowie für alle hilfreichen Anregungen und Denkanstöße und die Anleitung in wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Peipp für die Mitbetreuung meiner Arbeit, die Möglichkeit der Durchführung des Großteils der experimentellen Versuche in seiner Arbeitsgruppe sowie für die umfassende methodische und wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Dr. Lennart Lenk möchte ich mich ebenfalls für die sehr gute Betreuung im Labor, die vielen interessanten Diskussionen und zahlreichen Ratschläge, sowohl zur Laborpraxis als auch zum Schreiben einer wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Danke für Deine Geduld, Deine Unterstützung und Motivation und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Fotini Vogiatzi möchte ich für die vielen wertvollen Tipps und Hilfestellungen in experimentellen Fragestellungen, insbesondere für die Unterstützung bei den Western-Blot Analysen und den Tierexperimenten bedanken.

Mein weiterer Dank richtet sich an Britta von Below, Katrin Timm-Richert, Katrin Neumann, Anja Muskulus und Gabriele Riesen für die technische Assistenz, die Einarbeitung in die Methoden und Hilfestellung bei der Durchführung der zahlreichen Experimente, aber auch für die vielen Gespräche und das familiäre Arbeitsklima.

Ein weiteres Dankeschön geht an Carina Gehlert, Marta Lustig, Ammelie Boje, Steffen Krohn, Katja Klausz, Thies Rösner, Niklas Baumann, Lea Spory, Kristina Müller und Marie Autenrieb für das gemeinsame Arbeiten im Labor und die zuverlässige Unterstützung und Hilfe bei den experimentellen Versuchen. Danke, dass ihr immer Ansprechpartner wart und euer Wissen mit mir geteilt habt.

Auch für die gute Zusammenarbeit mit der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel, vor allem mit Prof. Dr. Gerhard Schultheiß und Sarah Vieten möchte ich mich bedanken.

Bei Prof. Dr. Christian Vokuhl bedanke ich mich für Aufbereitung und Auswertung der histologischen Schnitte.

Dr. Sanjay Tiwari danke ich für die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Bildgebenden Verfahren.

Bei allen möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor und darüber hinaus bedanken. Danke für die freundliche Aufnahme in beide Arbeitsgruppen, das herzliche und humorvolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Mutter Haike und meiner Schwester Charlotte sowie bei meinem Partner Frank bedanken, die immer für mich da sind, mich stets bedingungslos unterstützen und an mich glauben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dorothee Winterberg, geboren am 02.06.1989 in Magdeburg, die hier vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche ausgewiesen zu haben. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Ein akademischer Grad wurde mir nicht entzogen.

Ort, Datum

Dorothee Winterberg