

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktorin: Prof. Dr. med. Claudia Baldus)
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. Friedrich Stölzel)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

FUSIONSPROTEINE AUS TRAIL UND TUMORZELLGERICHTETEN ANTIKÖRPERN ZUR BESEITIGUNG MALIGNER B-ZELLEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Maren Sophia Oßwald

aus Konstanz

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Kellner, Klinikum der Universität München, Klinik für Anaesthesiologie, Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie, ATMZH Forschungslabor

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2025

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09.05.2025

gez.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Kellner
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

III

1	EINLEITUNG	1
1.1	LEUKÄMIEN	1
1.1.1	B-ZELL AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE	2
1.2	ANTIKÖRPER IN DER KREBSTHERAPIE	4
1.2.1	AUFBAU THERAPEUTISCHER ANTIKÖRPER	5
1.2.2	WIRKMECHANISMEN THERAPEUTISCHER ANTIKÖRPER	7
1.2.3	OPTIMIERUNG THERAPEUTISCHER ANTIKÖRPER	10
1.3	ZIELSTRUKTUREN AUF TUMORZELLEN FÜR ANTIKÖRPER-BASIERTE THERAPIEN	12
1.3.1	ANFORDERUNGEN AN EIN ZIELANTIGEN	12
1.3.2	ZIELSTRUKTUREN AUF DER OBERFLÄCHE VON B-ZELL-NEOPLASIEN	12
1.4	INDUKTION VON APOPTOSE DURCH MITGLIEDER DER TNF-SUPERFAMILIE	15
1.4.1	DER <i>TNF-RELATED APOPTOSIS INDUCING LIGAND</i> (TRAIL)	15
1.4.2	TRAIL IN DER KREBSTHERAPIE	18
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT	20
2	MATERIAL	21
2.1	GERÄTE	21
2.2	LABORMATERIALIEN	22
2.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	23
2.4	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	24
2.5	PLASMIDE	25
2.6	ENZYME	25
2.7	KITS	26
2.8	OLIGONUKLEOTIDE	26
2.9	BAKTERIENSTÄMME	26
2.10	ZELLINIEN UND ZELLKULTURMEDIENTEN	27
2.11	ANTI-KÖRPER	27
2.12	COMPUTERPROGRAMME	28
3	METHODEN	29
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.1.1	KULTIVIERUNG TRANSFORMierter BAKTERIEN	29
3.1.2	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN	29
3.1.3	VERDAU VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN	29
3.1.4	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	29
3.1.5	EXTRAKTION DER PLASMID-DNA AUS AGAROSEGELEN	30
3.1.6	ABSCHÄTZGEL FÜR PLASMID-DNA	30
3.1.7	LIGATIONSREAKTION	30
3.1.8	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA	30
3.1.9	ÜBERPRÜFEN DER KLONIERUNG DURCH RESTRIKTIONSANALYSE	31
3.1.10	SEQUENZANALYSE DER PLASMIDE	31
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.2.1	ZELLKULTUR	31
3.2.2	EXPRESSION DER FUSIONS-PROTEINE IN EUKARYOTISCHEN-ZELLEN	32
3.2.3	PROLIFERATIONSINHIBITIONSVERSUCHE	32

3.2.4	HERSTELLUNG VON ZELL-LYSATEN	33
3.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	33
3.3.1	REINIGUNG DER FUSIONSPROTEINE AUS DEM ZELLÜBERSTAND	33
3.3.2	SDS-PAGE	34
3.3.3	ANKONZENTRATION DER PROTEINE	35
3.3.4	WESTERN-TRANSFER-EXPERIMENTE UND IMMUNDETEKTION	35
3.3.5	PROTEINCHROMATOGRAPHIE	36
3.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	37
3.4.1	ANALYSE DER BINDUNG VON ANTIKÖRPERN UND IMMUNKONSTRUKTEN	37
3.4.2	ANNEXIN V- ALLOPHYCOCYANIN (APC)/ PROPIDIUMIODID (PI)-FÄRBUNG ALS APOPTOSE-ASSAY	37
3.5	GRAPHISCHE UND STATISTISCHE ANALYSEN	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	HERSTELLUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR ANTIKÖRPER-TRAIL-FUSIONSPROTEINE	40
4.1.1	KLONIERUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR CD19-scTRAIL	40
4.1.2	KLONIERUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR HER2-scTRAIL	43
4.2	EXPRESSION, AUFREINIGUNG UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	45
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN	51
4.4	WACHSTUMSINHIBITION VON B-ALL-ZELLEN DURCH CD19-scTRAIL	52
4.5	BESTIMMUNG DER ANTIGENSPEZIFITÄT DER WACHSTUMS-INHIBITORISCHEN EFFEKTE	54
4.6	NACHWEIS DES APOPTOSE-SIGNALWEGS	54
5	DISKUSSION	57
5.1	CD19 ALS ZIELSTRUKTUR ANTIKÖRPER-BASIERTER THERAPIEN	57
5.2	THERAPIE MALIGNER NEOPLASIEN MITTELS TRAIL-INDUZierter APOPTOSE	62
5.3	CD19-GERICHTETE TRAIL-FUSIONSPROTEINE ZUR THERAPIE VON B-ZELL-NEOPLASIEN	65
5.4	DIE BALANCE ZWISCHEN ANTIGENSPEZIFITÄT UND POTENTER APOPTOSE-INDUKTION VON ANTIKÖRPER-TRAIL-FUSIONSPROTEINEN	67
5.5	CD19-scTRAIL ALS ALTERNATIVE ZUR T-ZELL-AKTIVIERUNG ÜBER CD19-GERICHTETE WIRKSTOFFE	69
5.6	CD19-scTRAIL GEGEN DIE TUMOR-ESCAPE-STRATEGIE DES ANTIGEN-VERLUSTES	70
5.7	ÜBERWINDUNG POTENZIELLER TRAIL-RESISTENZMECHANISMEN	71
5.8	AUSBLICK	74
6	QUELLENVERZEICHNIS	76
6.1	LITERATURVERZEICHNIS	76
6.2	INTERNETSEITEN	96
7	ZUSAMMENFASSUNG	97
8	ANHANG	98
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	99
9	ERKLÄRUNG	100
10	PUBLIKATION	101
11	DANKSAGUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i> , Antikörper-Wirkstoff-Konjugat
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody-dependent cell-mediated phagocytosis</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bak	<i>Bcl-2 antagonist or killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
Bid	<i>Bcl-2-homology domain (BH3) - interacting death domain agonist</i>
BiTE	<i>Bi-specific T-cell engagers</i>
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	chimärer Antigen-Rezeptor
cCaspase	<i>cleaved Caspase</i> , gespaltene Caspase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> , komplementabhängige Zytotoxizität
CDR	<i>complementarity determining regions</i> , komplementaritätsbestimmende Regionen
cFLIP	<i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CH	<i>constant heavy</i> , konstante Region der schweren Kette
CI	Konfidenzintervall
CL	<i>constant light</i> , konstante Region der leichten Kette
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
cPARP	<i>cleaved Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i> , gespaltene Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
CPT	<i>circularly permuted TRAIL</i>
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DD	Todesdomäne, <i>death domain</i>
DED	Todeseffektor-Domäne, <i>death effector domain</i>
Der	Derivat
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i> , todesinduzierender Signalkomplex
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i> , Todesrezeptor
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EMA	European Medicines Agency, Europäische Arzneimittel-Agentur
Fab	<i>fragment antigen-binding</i> , Antigen-bindendes Fragment
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>

Fc	<i>fragment crystallizable</i> , kristallisierbares Fragment
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FcyR	Fcy-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fv	<i>fragment variable</i> , variables Fragment
GALNT14	Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferase 14
h	Stunde/Stunden
HC	<i>heavy chain</i> , schwere Kette
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i> , Inhibitor Apoptose-vermittelnder Proteine
Ig	Immunglobulin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
LC	<i>light chain</i> , leichte Kette
M	Mol
mAB	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MAC	<i>membrane attack complex</i> , membranangreifender Komplex
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
memTRAIL	membrangebundener TRAIL
min	Minuten
ml	Milliliter
MLL	<i>mixed-lineage leukemia</i>
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilisation</i> , Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran
MRD	<i>minimal residual disease</i> , Minimale Resterkrankung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Philadelphia-Chromosom
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L1/PD-L2	<i>programmed cell death ligand 1 bzw. 2</i>
PI	Propidiumjodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rhTNF	rekombinanter humaner TNF
rhTRAIL	rekombinanter humaner TRAIL

rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
R/R	rezidiert oder refraktär
s	Sekunden
s.	siehe
scFv	<i>single-chain fragment variable</i> , Einzelkettenfragment der variablen Antikörperregionen
scTRAIL	<i>single-chain TRAIL</i> , einzelkettiges TRAIL-Trimer
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SOC-Medium	<i>super optimal broth with catabolite repression Medium</i>
sTRAIL	<i>soluble TRAIL</i> , lösliches TRAIL
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tBid	<i>truncated Bid</i> , gekürztes Bid
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRA	TRAIL-Rezeptor-Agonist
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> , Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
u. a.	unter anderem
V	Volt
VEGF	<i>vaskular endothelial growth faktor</i> , vaskuloendothelialer Wachstumsfaktor
vgl.	vergleiche
VH	<i>variable heavy</i> , variable Region der schweren Kette
VL	<i>variable light</i> , variable Region der leichten Kette
Wt	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis proteins
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Leukämien

Mit einer Neuerkrankungsrate von jährlich etwa 500.000 Menschen und über 200.000 Sterbefällen sind Krebserkrankungen in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2021). Krebserkrankungen zu prävenieren, sie frühzeitig zu diagnostizieren und erfolgreich zu therapieren stellt unser Gesundheitssystem damit vor eine große Herausforderung. Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen malignen Erkrankungen variiert dabei je nach Alter und Geschlecht (Abbildung 1). Während Leukämien im Erwachsenenalter nur circa 2,5 % aller Tumorerkrankungen ausmachen, stellen sie bei den unter 18-Jährigen mit 29,7 % die häufigste maligne Erkrankung dar (Erdmann et al., 2020).

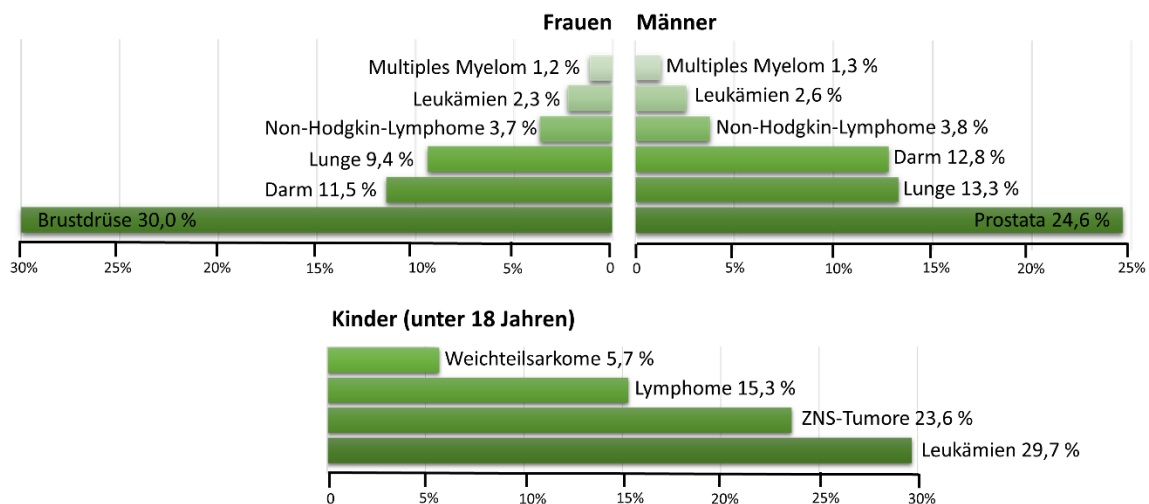


Abbildung 1: Krebs in Deutschland. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland bei Erwachsenen bis zum Jahr 2018 bzw. bei unter 18-Jährigen in den Jahren 2009 bis 2018. Abgewandelt nach Daten des Robert Koch-Instituts (2021) und des Deutschen Kinderkrebsregisters (2020).

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems, bei denen es zu einer unkontrollierten Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen im Knochenmark kommt. Je nach Ursprung der entarteten Zellen lassen sich Leukämien der lymphatischen oder myeloischen Reihe zuordnen. Außerdem lassen sich, je nach zeitlichem Verlauf der Erkrankung, akute, rasch progrediente und chronische, langsam fortschreitende Leukämien unterscheiden (Herold, 2020). So werden die Leukämien durch die Weltgesundheitsorganisation in vier große Gruppen unterteilt, wobei Prognose und Therapieoptionen variieren: die chronische lymphatische Leukämie (CLL), die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische myeloische Leukämie (CML) und die akute myeloische Leukämie (AML).

(Herold, 2020; Swerdlow et al., 2017). Die lymphatischen Leukämien lassen sich dabei zusätzlich immunphänotypisch der B- oder T-Zellreihe zuordnen (Herold, 2020).

1.1.1 B-Zell akute lymphatische Leukämie

Die Gesamtinzidenz der ALL beträgt jährlich 1,1/100.000 (Gökbuget et al., 2020). Der absolute Häufigkeitsgipfel liegt im Kindesalter zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr (< 5 Jahre: Inzidenz 5,3/100.000/Jahr). Ein zweiter Häufigkeitsgipfel ist bei Personen über 80 Jahren zu verzeichnen (2,3/100.000/Jahr) (Gökbuget et al., 2020). Die B-ALL macht bei Erwachsenen einen Anteil von ca. 75 % der ALL-Fälle aus (Gökbuget et al., 2020; Samra et al., 2020).

Die maligne entarteten B-Zell-Blasten verdrängen die physiologische Hämatopoese im Knochenmark, weshalb Patientinnen/Patienten oft durch Anämie, Blutungsneigung durch Thrombozytopenie und Infektanfälligkeit durch Leukopenie symptomatisch werden. Zudem können sich die Leukämiezellen systemisch ausbreiten und lymphatisches sowie nicht-lymphatisches Gewebe infiltrieren. Oft besteht eine Hepatosplenomegalie und vergrößerte Lymphknoten. In 20 % der Fälle leiden betroffene Kinder unter Arthralgien, was zu Gehunfähigkeit führen kann. Die Infiltration der Meningen bzw. des Liquorraumes durch maligne Zellen kann sich als Meningeosis leucaemica mit einem meningitischen Bild und neurologischen Symptomen präsentieren (Escherich & Schrappe, 2021; Gökbuget et al., 2020).

Die Diagnose ALL wird durch eine Knochenmarkszytologie bzw. -histologie in Verbindung mit dem Blutbild gesichert (Escherich & Schrappe, 2021). Die B-ALL wird anhand des Differenzierungsgrades der Leukämiezellen in weitere Subtypen eingeteilt, welche mittels durchflusszytometrischer Immunphäotypisierung unterschieden werden können. Hierbei werden definierte Zelloberflächenmarker bestimmt, darunter humanes Leukozyten-Antigen-DR, *cluster of differentiation* (CD) 10, CD19, CD20 und CD79a. Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geben Aufschluss über Ploidie, Chromosomenaberrationen, Mutationen oder Genumlagerungen (Escherich & Schrappe, 2021). Zunehmend ergänzen fortschrittliche Verfahren wie RNA-Sequenzierungen oder Genpanel-Analysen diese Diagnosemöglichkeiten (Escherich & Schrappe, 2021). Um eine Beteiligung des Zentralen Nervensystems (ZNS) auszuschließen, umfasst die Standarddiagnostik auch eine Lumbalpunktion zur Untersuchung des Liquors (Escherich & Schrappe, 2021).

1.1.1.1 Konventionelle Therapie der B-ALL

Das Therapiekonzept der ALL lässt sich in mehrere Phasen einteilen, wobei je nach Patientin/Patient und Leukämiesubtyp individuelle Anpassungen erfolgen (Escherich & Schrappe, 2021; Gökbuget et al., 2020). Die konventionelle pharmakologische Krebstherapie basiert vor allem auf dem Einsatz von Zytostatika, welche über unterschiedliche Mechanismen die Zellteilung bzw. das Zellwachstum

hemmen. Begonnen wird mit einer fünftägigen Vorphasentherapie mit Dexamethason und Cyclophosphamid. Diese soll die Anzahl maligner Zellen reduzieren und ein Tumorlyse-Syndrom vermeiden. Dann erfolgt die Induktionstherapie über sechs bis sieben Wochen mit dem Ziel der kompletten Remission (CR), was der Reduktion des Blastenanteils im Knochenmark unter die Nachweisgrenze von 5 % entspricht. Therapiert wird mit Glukokortikoiden wie Dexamethason und einer Polychemotherapie (z.B. Vincristin, Anthracycline, Asparaginase und Mercaptopurin). Je nach Subtyp kann zusätzlich bei CD20-positiver ALL der Antikörper Rituximab oder bei Philadelphia-Chromosom (Ph)-positiver ALL der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib eingesetzt werden (Hoelzer et al., 2014; Ravandi, 2019). Es schließt sich die Konsolidierungstherapie an, bei der zyklisch wechselnde hochdosierte Zytostatika-Kombinationen verabreicht werden, darunter Methotrexat, Asparaginase und Cytarabin. Schließlich wird eine Erhaltungstherapie aus einer Kombination von Methotrexat und 6-Mercaptopurin in niedrigen Dosen bis zu einer Gesamttherapiedauer von 2 bis 2,5 Jahren eingesetzt. Zur Therapie und Prophylaxe des ZNS-Befalls kann zusätzlich die intrathekale Gabe von Chemotherapeutika, systemische Hochdosis-Therapie mit ZNS-aktiven Chemotherapeutika und eine Schädelbestrahlung erfolgen (Escherich & Schrappe, 2021; Gökbuget et al., 2020).

Im Verlauf wird das Therapieansprechen und die Remissionstiefe durch Bestimmung der sogenannten Minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) überwacht. Mit Hilfe der *real-time* PCR oder Durchflusszytometrie lassen sich dabei residuale maligne Zellpopulationen (eine Leukämiezelle pro 10.000 gesunde Zellen) nachweisen (Gökbuget et al., 2020). Hierbei werden individuelle Genumlagerungen oder Tumorzell-spezifische Kombinationen von Zelloberflächenproteinen detektiert (Gökbuget, 2015; Gökbuget et al., 2020).

Als intensivste Therapieform steht die meist allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung, welche bei Patientinnen/Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko, mit den Translokationen t(9;22) oder t(4;11), oder bei Patientinnen/Patienten mit hoher persistierender MRD-Last nach Beginn der Konsolidierungstherapie indiziert ist (Escherich & Schrappe, 2021; Gökbuget et al., 2020).

Die Überlebensraten bei Kindern betragen in Abhängigkeit von den initialen Risikofaktoren bei der ALL im Durchschnitt 85 % (Escherich & Schrappe, 2021). Bei erwachsenen ALL-Patientinnen/Patienten zeigt das 5-Jahres-Überleben eine Schwankungsbreite zwischen ca. 40 % und ca. 20 % bei Patientinnen/Patienten > 60 Jahren (Gökbuget, 2015; Herold, 2020; Samra et al., 2020). Wichtige negative prognostische Faktoren sind eine hohe initiale Leukozytenzahl, die Translokationen t(9;22) und t(4;11), die späte CR, ein höheres Alter und schlechter Gesundheitszustand bei Diagnosestellung sowie die Persistenz der MRD nach Konsolidierungstherapie bzw. deren erneuter Anstieg nach vorheriger molekularer CR (Gökbuget, 2015; Gökbuget et al., 2020; Longo et al., 2015).

Die konventionelle Therapie mit Zytostatika greift in metabolische Vorgänge oder Teilungsvorgänge vorzugsweise proliferierender Zellen ein, wobei die eingesetzten Zytostatika auch auf gesunde, sich teilende Zellen einwirken (Herdegen, 2020). Diese Therapieform bringt deshalb zahlreiche Nebenwirkungen mit sich, wie Myelosuppression, Enteritis, Haarausfall und Schädigung der Gonaden. Außerdem können je nach verabreichtem Zytostatikum dauerhafte Schäden durch toxische Effekte auf einzelne Organe wie Herz, Innenohr, Nieren, Leber, Knochenmark oder Nervensystem beobachtet werden (Herdegen, 2020). Ein weiteres Risiko besteht in der Mutagenese und infolgedessen der Entwicklung von Zweitneoplasien wie der AML nach Zytostatika-Therapie (Sill et al., 2011). Auch führt die Entwicklung von Zytostatika-Resistenzen nach wie vor häufig zu Rezidiven (Fielding et al., 2007; Jędraszek et al., 2022). Eine Stammzelltransplantation hingegen birgt das Risiko schwerer Infektionen aufgrund der Immunsuppression, einer Transplantat-gegen-Empfänger-Erkrankung (*Graft-versus-Host-Disease*) oder ebenfalls von Rezidiven und geht nach wie vor mit einer hohen Mortalitätsrate einher (Gooley et al., 2010).

Um die Therapie von Neoplasien zu verbessern sind daher dringend neue Strategien notwendig. In den letzten Jahrzehnten haben zielgerichtete Therapeutika, die selektiv Tumorzellen angreifen und eine geringere systemische Toxizität aufweisen, in der Behandlung der B-ALL immer mehr an Bedeutung gewonnen (Hansel et al., 2010). Beispielsweise haben Tyrosinkinase-Inhibitoren, insbesondere Imatinib (Glivec), die Prognose der Ph-positiven Leukämien stark verbessert, indem sie gezielt tumorfördernde Signalwege inhibieren (Abou Dalle et al., 2019). Auch unterschiedliche gegen Leukämiezellen gerichtete Immuntherapien werden bereits erfolgreich in der Behandlung der B-ALL eingesetzt. Dazu zählen der CD20-Antikörper Rituximab (Hoelzer et al., 2014; Reff et al., 1994), der bispezifische Antikörper Blinatumomab (Przepiorka et al., 2015), das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (*antibody-drug conjugate*, ADC) Inotuzumab Ozogamicin (Wynne et al., 2019) und die zelluläre Immuntherapie mit *Chimeric-Antigen-Receptor* (CAR)-T-Zellen (Dagar et al., 2023).

1.2 Antikörper in der Krebstherapie

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Proteine, welche von Plasmazellen im Rahmen einer Immunantwort produziert werden. Beschrieben wurden sie bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich in seiner Theorie der Zauberkugeln (*magic bullets*), die bestimmte Mikroorganismen töten sollten, ohne dabei dem menschlichen Körper zu schaden (Ehrlich, 1906; Streibhardt & Ullrich, 2008). Heutzutage macht man sich die Eigenschaften von Antikörpern in der Therapie maligner Erkrankungen zu Nutze und zählt sie mittlerweile zu den etablierten Wirkstoffklassen (P. J. Carter & Lazar, 2018; Scott et al., 2012). Möglich wurde diese Entwicklung durch einige Schlüsselentdeckungen. 1975 entwickelten Köhler und Milstein die Hybridom-Technik, bei der Myelomzellen mit

antikörperproduzierenden Plasmazellen immunisierter Mäuse fusioniert werden (Köhler & Milstein, 1975). Dadurch entstehen immortalisierte Hybridomzellen, mit deren Hilfe sich größere Mengen monoklonaler Antikörper (*monoclonal antibodies*, mABs) einer bestimmten Spezifität herstellen lassen (Köhler & Milstein, 1975). Murine Antikörper sind im menschlichen Organismus nur eingeschränkt wirksam, da sie kaum in der Lage sind, immunologische Effektorfunktionen zu vermitteln. Auch können sie durch die Bildung von Anti-Maus-Antikörpern im Therapieverlauf neutralisiert werden (L. M. Weiner et al., 2010). Durch die Entwicklung von Techniken, die es erlauben, durch genetische Modifikation immer größere Anteile muriner Antikörperdomänen durch die entsprechenden humanen Sequenzen zu ersetzen, wurde das immunogene Potential reduziert und eine effiziente Interaktion mit dem humanen Immunsystem ermöglicht. Dies trug maßgeblich zum wachsenden klinischen Erfolg therapeutischer Antikörper bei (G. J. Weiner, 2015). Chimäre murin-humane-Antikörper bestehen aus murinen variablen Regionen und humanen konstanten Regionen (Morrison et al., 1984). Bei humanisierten Antikörpern wurden auch die Gerüstregionen der variablen Domänen gegen humane Sequenzen ausgetauscht, sodass lediglich die komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs), welche die Spezifität festlegen, murinen Ursprungs sind (Jones et al., 1986). Dagegen besitzen humane Antikörper keine murinen Anteile mehr und wirken so kaum immunogen (Lonberg et al., 1994).

1.2.1 Aufbau therapeutischer Antikörper

Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (*light chain*, LC) und zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain*, HC), die sich über Disulfidbrücken zusammenlagern (Abbildung 2). Jede Kette setzt sich aus mehreren, ca. 110 Aminosäuren langen, kompakt gefalteten Proteinabschnitten zusammen, die Ig-Domänen genannt werden. Hierbei lassen sich aminoterminal variable Domänen, die sich zwischen einzelnen Antikörpern erheblich in Ihrer Sequenz unterscheiden, und konstante Domänen unterscheiden. Die leichten Ketten bestehen aus einer N-terminalen variablen Domäne (*variable light*, VL) und einer C-terminalen konstanten Domäne (*constant light*, CL). Es kommen zwei Arten von leichten Ketten vor: jene vom Kappa- (κ) und jene vom Lambda (λ)-Typ, wobei bisher keine funktionellen Unterschiede zwischen Antikörpern mit κ - oder λ -Ketten festgestellt wurden (Murphy & Weaver, 2018). Schwere Ketten hingegen sind aus einer N-terminalen variablen (*variable heavy*, VH) und mehreren konstanten (*constant heavy*, CH) Regionen zusammengesetzt. Es lassen sich fünf Hauptgruppen schwerer Ketten unterscheiden (γ , α , μ , δ , und ϵ), die fünf Isotypen von Antikörpern bilden (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), welche sich in Struktur und Funktion unterscheiden (Murphy & Weaver, 2018).

Nach funktionellen Gesichtspunkten lassen sich Antikörper in zwei Fragmente unterteilen (Abbildung 2). Die leichten Ketten bilden gemeinsam mit den VH- und CH1-Domänen der schweren Ketten die antigenbindenden Fragmente (*fragment antigen-binding*, Fab). Deren variable Regionen (Fv, *fragment*

variable) enthalten die CDRs und sind spezifisch nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip gegen das Epitop eines Antigens gerichtet. Die CH2- und CH3-Domänen der beiden schweren Ketten bilden beim IgG-Isotyp gemeinsam das kristallisierbare Fragment (*fragment crystallisable*, Fc), über welches Effektorfunktionen wie Komplementaktivierung oder Aktivierung von Effektorzellen über deren Fc-Rezeptoren (FcR) vermittelt werden (Murphy & Weaver, 2018; Schroeder & Cavacini, 2010). Der Übergang zwischen Fab- und Fc-Teil von Antikörpern wird als Gelenk-Region (*hinge region*) bezeichnet. In diesem Bereich sind im IgG1-Antikörper die beiden schweren Ketten über zwei Disulfidbrücken zu einem Homodimer zusammengelagert (Murphy & Weaver, 2018).

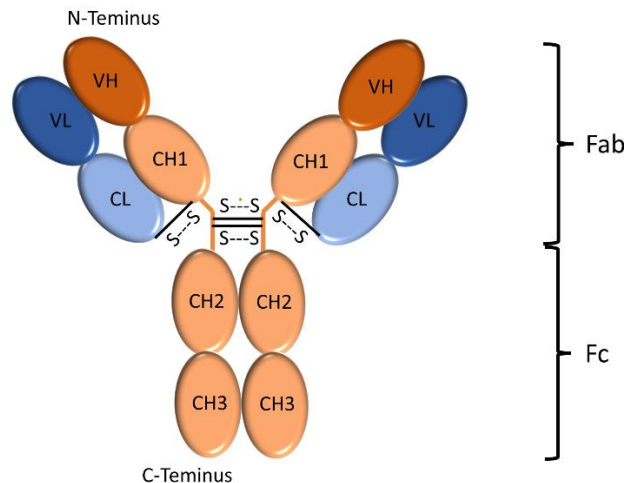


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers. Ein IgG1 besteht aus zwei identischen schweren (orange) und zwei identischen leichten Ketten (blau), die über Disulfidbrücken (S---S) miteinander verbunden sind (schwarze Striche). Die schwere Kette ist aus einer N-terminalen variablen Domäne (*variable heavy*, VH) und drei C-terminalen konstanten Domänen (*constant heavy*, CH1 bis CH3) aufgebaut, während die leichte Kette aus einer variablen Domäne (*variable light*, VL) und einer konstanten Domäne (*constant light*, CL) besteht. Ein IgG besitzt zwei antigenbindende Fragmente (*fragment antigen-binding*, Fab) und einen Fc-Teil (*fragment crystallisable*, Fc). Der Bereich zwischen Fab- und Fc-Teil wird als Gelenkregion (*hinge region*) bezeichnet. Abgewandelt nach Murphy & Weaver (2018).

IgG-Antikörper besitzen die typische Y-ähnliche Struktur und stellen den vorherrschenden Isotyp im humanen Serum dar. Auch therapeutisch werden vorrangig IgG-Antikörper verabreicht, welche die höchste Plasmaretentionszeit im Vergleich zu anderen Antikörperklassen aufweisen (Kontermann, 2009). Ein IgG besitzt drei CH-Domänen und hat eine molare Masse von ca. 150 Kilodalton (kDa) (HC 50 kDa, LC 25 kDa). Die Gelenk-Regionen der IgGs unterscheiden sich in geringem Maße, wonach man sie in Subtypen mit abweichenden Eigenschaften beim Auslösen von Effektorfunktionen einteilt (beim Menschen IgG 1, 2, 3, 4) (Murphy & Weaver, 2018). Aufgrund ihrer hohen Affinität für Fcγ-Rezeptoren (FcγR) werden therapeutisch häufig IgG1 gewählt. IgG4 können genutzt werden, wenn die Aktivierung von Effektorfunktionen nicht erwünscht ist (Hafeez et al., 2020).

1.2.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Antikörper können durch unterschiedliche Mechanismen ihre therapeutische Wirkung entfalten. Sie können über direkte oder indirekte, immunvermittelte Mechanismen an Zielzellen wirken, Stroma und Vaskularisation des Tumors beeinflussen oder immunmodulatorisch aktiv sein und die T-Zell-Aktivierung verstärken. Darüber hinaus können Antikörper als Vehikel eingesetzt werden und als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate oder Antikörper-basierte Fusionsproteine den Zelltod der Tumorzelle induzieren (Scott et al., 2012).

1.2.2.1 Direkte Wirkmechanismen

Direkte Wirkmechanismen werden allein durch die Bindung der variablen Region an das entsprechende Zielantigen erzielt. So können Antikörper auf der Zelloberfläche direkte antagonistische Effekte an Rezeptoren ausüben oder die Rezeptor-Dimerisierung blockieren und so antiproliferativ wirken. Alternativ können sie über agonistische Effekte direkt den Zelltod der Zielzelle induzieren. Auch eine Verhinderung der Rezeptor-Liganden-Interaktion durch Blockade der Rezeptor-Bindungsstelle oder Bindung des Liganden ist eine mögliche Wirkungsweise (Abbildung 3). Rituximab (Mabthera, Rituxan), ein chimärer monoklonaler CD20-Antikörper, war der erste Antikörper, welcher 1998 zur Behandlung von Krebs zugelassen wurde (Reff et al., 1994). Er führte bei Patientinnen/Patienten mit rezidiertem indolentem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) zu einer Ansprechrates von 48 % (McLaughlin et al., 1998). Die Wirkung von Rituximab beruht unter anderem (u. a.) auf direkten Wirkmechanismen, da die Kreuzvernetzung von CD20 auf der Zelloberfläche zur Apoptose von malignen B-Zellen führt (Byrd et al., 2002; Shan et al., 1998; Smith, 2003). Über antagonistische Effekte

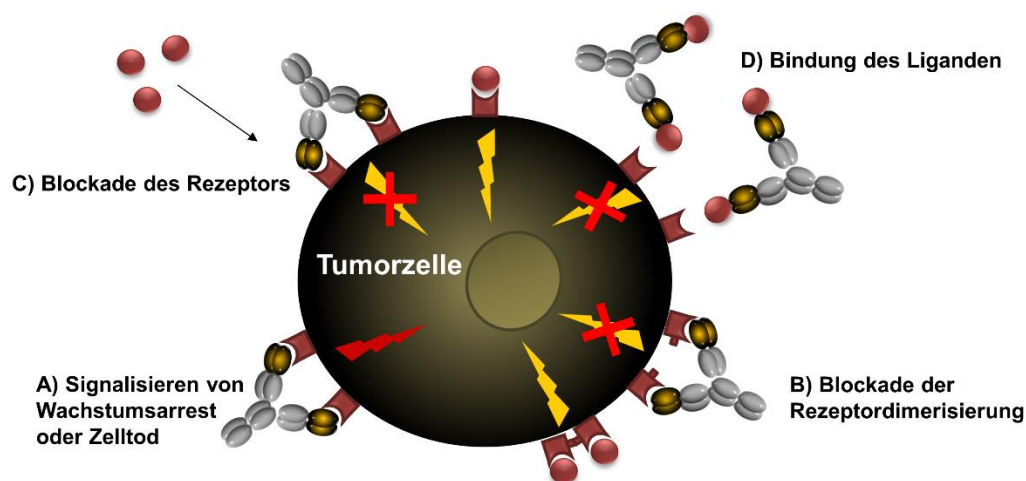


Abbildung 3: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper. A) Über agonistische Effekte an bestimmten Rezeptoren können Antikörper Zelltod oder Wachstumsarrest signalisieren ((A), roter Pfeil). Durch Blockade der Rezeptor-Dimerisierung (B) oder Störung der Rezeptor-Liganden-Interaktion durch Blockade des Rezeptors (C) oder Bindung des Liganden (D) werden proliferative Signale verhindert. Abgewandelt nach Kellner & Peipp (2013).

an einem Rezeptor wirkt beispielsweise der in Deutschland seit 2000 zur Therapie des Mamma-Karzinoms zugelassene humanisierte mAB Trastuzumab (Herceptin). Er bindet den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) und blockiert so dessen Dimerisierung. Dies verhindert die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne und damit das Wachstum HER2-abhängiger Tumoren (Hudis, 2007).

Andere mABs zielen auf bestimmte Vorgänge in der Tumorumgebung ab. So bindet beispielsweise Bevacizumab (Avastin) den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (*vaskular endothelial growth factor A*, VEGF-A) und verhindert die Aktivierung des VEGF-Rezeptors. Infolgedessen wird die Angiogenese solider Tumoren inhibiert und das Tumorstadium supprimiert (Garcia et al., 2020). Als Immun-Checkpoint-Inhibitoren blockieren mABs inhibitorische Rezeptoren der T-Zell-Aktivierung und begünstigen dadurch eine wirkungsvolle anti-tumorale Immunantwort (Bagchi et al., 2021). So bindet der humane mAB Ipilimumab (Yervoy) das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, CTLA-4) und verhindert die Interaktion mit dessen Liganden CD80 (bzw. B7-1) und CD86 (bzw. B7-2). Die Antikörper Nivolumab (Opdivo) und Pembrolizumab (Keytruda) blockieren den inhibitorischen Rezeptor PD-1 (*programmed cell death 1*). So wird die Interaktion mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 (*programmed cell death ligand 1 bzw. 2*) und somit die PD-1-vermittelte Suppression der T-Zell-Aktivierung gehemmt (Bagchi et al., 2021).

1.2.2.2 Indirekte Wirkmechanismen

Neben den direkten Wirkmechanismen können Antikörper über immunvermittelte Mechanismen wirken, die zum Tod der Zielzelle führen (Abbildung 4). Diese werden durch die Fc-Domäne des Antikörpers vermittelt.

Zu den immunvermittelten Wirkmechanismen zählt die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Nach Bindung des Komplementfaktors C1q an auf der Krebszelloberfläche gebundene Antikörper wird C1q aktiviert. Dadurch wird der klassische Weg des Komplementsystems induziert, welcher über Aktivierung der Faktoren C2 bis C9 in der Bildung des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex*, MAC) mündet. Der MAC führt dann durch Porenbildung in der Zellmembran zur Lyse der Tumorzelle (Murphy & Weaver, 2018; Rogers et al., 2014).

Bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und der antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose (*antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP) interagiert der Fc-Teil eines Tumorzell-gebundenen Antikörpers mit FcRs von Effektorzellen. Zu diesen zählen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), bestimmte $\gamma\delta$ T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Diese werden durch Kreuzvernetzung ihrer FcRs infolge der Fc-Bindung aktiviert. NK-Zellen stellen wichtige Effektoren der ADCC dar. Sie schütten

nach ihrer Aktivierung Perforin und Granzym aus, wodurch die Zielzelle lysiert wird (Iannello & Ahmad, 2005). Makrophagen hingegen können mit Antikörpern besetzte Zellen phagozytieren und bauen diese im Phagolysosom ab (L. M. Weiner et al., 2010).

Von Bedeutung für die ADCC und ADCP therapeutischer Antikörper sind die IgG-bindenden Fcγ-Rezeptoren (FcγR). Es existieren drei Arten humaner FcγRs: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16). Diese sind auf verschiedenen Immunzellen exprimiert und unterscheiden sich in ihrer Affinität zur Fc-Domäne (Nimmerjahn & Ravetch, 2008; Ravetch & Bolland, 2001). Es lassen sich mehrere aktivierende FcγR unterscheiden, welche durch das Vorliegen einer mit dem Rezeptor assoziierten, zytoplasmatischen *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Sequenz charakterisiert sind (Ravetch & Bolland, 2001). In NK-Zellen ist FcγRIIIA der vorherrschende aktivierende FcγR (Iannello & Ahmad, 2005). Für einige FcγR wurden Polymorphismen identifiziert, welche mit unterschiedlicher Affinität für die Fc-Domäne sowie mit variablen Ansprechraten auf therapeutische Antikörper in Verbindung stehen (Weng & Levy, 2003). So zeigen Patientinnen/Patienten mit follikulärem Lymphom, welche homozygot für Valin in der Position 158 von FcγRIIIA sind, im Vergleich zu Phenylalanin-homozygoten oder heterozygoten Personen, sowie Patientinnen/Patienten mit Homozygotie für Histidin in der Position 131 von FcγRIIA, verglichen mit Arginin-Homozygotie oder Heterozygotie, ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Rituximab sowie ein längeres progressionsfreies Überleben

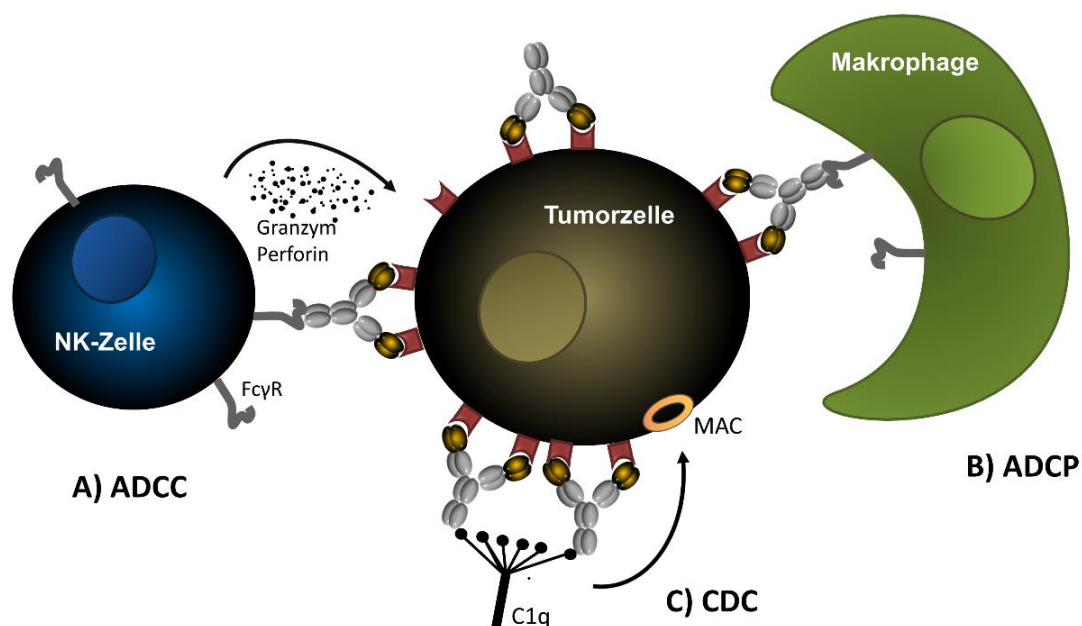


Abbildung 4: Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper. Effektorzellen binden über ihre Fcγ-Rezeptoren (FcγR) die Fc-Domäne Tumorzell-gebundener Antikörper und werden dadurch aktiviert. NK-Zellen schütten daraufhin Granzym und Perforin aus, was zur Lyse der Tumorzelle und zu antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC, (A)) führt. Makrophagen können über antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP, (B)) Tumorzellen eliminieren. Durch Kreuzvernetzung von Antikörpern auf der Tumorzelloberfläche durch den Komplementfaktor C1q wird der klassische Weg der Komplementkaskade aktiviert, bei dem es über die Bildung des membranangreifenden Komplexes (MAC) zur Lyse der Tumorzelle durch komplementabhängige Zytotoxizität (CDC, (C)) kommt. Abgewandelt nach Kellner & Peipp, 2013.

(Weng & Levy, 2003). ADCP wird über den hochaffinen FcγRI, den FcγRIIA sowie FcγRIIIB vermittelt (Iannello & Ahmad, 2005). Bei FcγRIIB handelt es sich um einen inhibitorischen FcγR, welcher durch das Vorliegen einer *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM)-Sequenz charakterisiert ist und hemmende Funktionen ausübt (Iannello & Ahmad, 2005; Nimmerjahn & Ravetch, 2008).

1.2.3 Optimierung therapeutischer Antikörper

Trotz bedeutender klinischer Erfolge mit Antikörper-basierten Therapieansätzen in der Krebstherapie profitieren nicht alle Patientinnen/Patienten von dieser Behandlungsoption (McLaughlin et al., 1998). So sind auch diese mit Resistenzentwicklungen und Rezidiven assoziiert, welche sich beispielsweise auf die ineffiziente Induktion von Effektormechanismen wie eine insuffiziente Effektorzellrekrutierung oder Tumor-Escape-Strategien zurückführen lassen (Klein et al., 2021; Rezvani & Maloney, 2011). Darüber hinaus können Nebenwirkungen wie Immunreaktionen oder mit dem spezifischen Zielantigen in Verbindung stehende Nebenwirkungen zu therapeutischen Limitationen führen (Hansel et al., 2010). Deshalb ist die weitere Optimierung der Wirksamkeit therapeutischer Antikörper Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen (P. J. Carter & Lazar, 2018).

1.2.3.1 Fc-Engineering

Durch Modifizierungen am Fc-Teil von Antikörpern, sogenanntes Fc-Engineering, wird versucht, deren Fähigkeit zur Interaktion mit dem Immunsystem zu verbessern. Hierzu kann die Affinität zu aktivierenden FcγR erhöht und so die Interaktion mit Effektorzellen erleichtert werden. Alternativ kann ihre Eigenschaft Komplementfaktoren zu binden und das Komplementsystem zu aktivieren verbessert werden (G. J. Weiner, 2015). Mögliche Ansätze hierbei sind die Veränderung der Aminosäuresequenz (Protein-Engineering) oder der Glykosylierung (Glyko-Engineering) des Fc-Teils (Kellner et al., 2014).

1.2.3.2 Neue Antikörperformate

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer Antikörperformate entwickelt und getestet, die von der klassischen Struktur eines IgG-Antikörpers abweichen. Dazu gehören u. a. Antikörperfragmente wie *single-chain fragment variable* (scFv)-Moleküle, die aus den Antigen-erkennenden variablen Domänen der leichten und schweren Antikörperketten bestehen, oder monovalente Fab-Teile (Adams & Schier, 1999; Holliger & Hudson, 2005).

Eine besonders große und vielfältige Gruppe neuartiger Moleküle bilden die bispezifischen Antikörper, deren Fv-Domänen gegen zwei verschiedene Antigene gerichtet sind, was neue Wirkmechanismen ermöglicht (Brinkmann & Kontermann, 2017; Spiess et al., 2015). Bisher wurden über 100 Formate bispezifischer Antikörper beschrieben, darunter Proteine mit IgG-Struktur, scFv- und Fab-basierte Konstrukte, sowie große komplexe Moleküle mit mehreren Antigen-bindenden Domänen (Brinkmann & Kontermann, 2017). Einige bispezifische Antikörper rekrutieren Immuneffektorzellen zu

Tumorzellen und induzieren so zellvermittelte Tumorzelllyse, indem eine Antigen-bindende Domäne gegen ein aktivierendes Zelloberflächenprotein auf einer Immunzelle gerichtet ist, während die andere Domäne an ein Zielantigen auf der Tumorzelloberfläche bindet (Kontermann & Brinkmann, 2015; Suurs et al., 2019). Seit 2015 zugelassen ist beispielsweise der aus zwei kovalent verbundenen scFv-Molekülen bestehende BiTE (*Bi-specific T-cell engager*)-Antikörper Blinatumomab (Blinicyto) (H. Kantarjian et al., 2017; Przepiorka et al., 2015). Ein scFv ist gegen CD3 auf T-Zellen gerichtet, während das andere das B-Lymphozyten-Antigen CD19 bindet. Blinatumomab führte in der Behandlung von Patientinnen/Patienten mit rezidivierender oder refraktärer (R/R) B-Vorläuferzell-ALL zu signifikant verlängertem Überleben im Vergleich zur Standard-Chemotherapie (Przepiorka et al., 2015).

Bei der Herstellung von bispezifischen Antikörpern mit IgG-Struktur entstehen durch die zufällige Zusammenlagerung von Ig-Ketten zu einem kompletten IgG-Antikörper zahlreiche unterschiedliche IgG-Konstrukte. Um vorwiegend nur einen bestimmten, gewünschten IgG zu produzieren, können Mutationen in die Proteinketten der Fc-Domäne eingefügt werden, um die korrekte Anordnung zu begünstigen (Brinkmann & Kontermann, 2017). Ein möglicher Ansatz nutzt Mutationen, welche durch den Austausch von Aminosäuren der CH3-Domänen die Ladung und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den schweren Ketten verändern (Gunasekaran et al., 2010). So entsteht nach Expression zwischen ungleichen schweren Ketten eine Anziehung, während gleiche schwere Ketten sich abstoßen, wodurch sehr effektiv die Bildung von Heterodimeren unterstützt wird.

1.2.3.3 Immunkonjugate

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von mABs ist, diese als Vehikel zu nutzen, um zytotoxische Stoffe wie Zytostatika, Radioisotope oder Toxine gezielt zu Tumorzellen zu transportieren. Zu diesen Immunkonjugaten, bei denen die Zelltod-induzierende Substanz an einen mAB konjugiert wird, zählen beispielsweise Radioimmunokonjugate und ADCs sowie Immunotoxine und -zytokine (Khongorzul et al., 2020). Diese Strategien kombinieren die Spezifität monoklonaler Antikörper mit den potenten zytotoxischen Eigenschaften von Wirkstoffen. Somit kann die Tumorselektivität erhöht und die systemische Toxizität minimiert werden (G. J. Weiner, 2015).

1.2.3.4 Antikörper-basierte Fusionsproteine

Neben der chemischen Kopplung Zelltod-induzierender Substanzen an mABs können auch rekombinante Antikörper-Fusionsproteine eingesetzt werden. Hierzu wird genetisch die DNA-Sequenz eines Zelltod-induzierenden Proteins, beispielsweise einer modifizierten Form des *Pseudomonas* Exotoxin A oder von Proteinen der Tumornekrosefaktor (*tumor necrosis factor*; TNF)-Superfamilie, an die Sequenz einer Antikörperkette oder eines Antikörperfragmentes fusioniert (de Bruyn et al., 2013). Zeitweise zur Therapie der R/R Haarzell-Leukämie zugelassen war das Fusionsprotein Moxetumomab pasudotox (Lumoxiti) aus einem CD22-Fv und einem Fragment des *Pseudomonas* Exotoxin A, welches

in einer Phase-II- Studie bei R/R pädiatrischer B-ALL allerdings nur geringe Ansprechraten erbrachte (Dhillon, 2018; N. N. Shah et al., 2020). Für Fusionsproteine mit Todesrezeptor-Liganden, insbesondere für den TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (*TNF-related apoptosis inducing ligand*; TRAIL), wurde in prä-klinischen Studien bereits eine potente Wirksamkeit gegen B-ALL-Zellen erzielt (Bremer et al., 2005; Schneider et al., 2010; Siegemund et al., 2018; Stieglmaier et al., 2008).

1.3 Zielstrukturen auf Tumorzellen für Antikörper-basierte Therapien

1.3.1 Anforderungen an ein Zielantigen

Essenziell für das sichere und effektive Wirken von Antikörpern bei der Therapie von Tumorerkrankungen ist die Identifikation geeigneter Zielstrukturen auf den malignen Zellen. Ein ideales Zielantigen sollte in großer Menge und stabil auf Tumorzellen exprimiert werden, während es auf physiologischen, gesunden Zellen nicht oder nur in geringem Maße vorkommt. Die Sekretion des Antigens sollte minimal sein, um ein Abfangen der Antikörper durch sezernierte Antigene zu minimieren (G. J. Weiner, 2015). Je nach vorrangigem Effektormechanismus variieren die erwünschten Eigenschaften eines Zielantigens. Auf der Zelloberfläche gebundene Immunotoxine oder ADCs sollten schnell und verlässlich internalisiert werden, damit die transportierten, intrazellulär zytotoxisch wirkenden Substanzen ihre Wirkung entfalten können und um Nebenwirkungen durch unspezifische Toxizität zu reduzieren (Thomas et al., 2016). Im Gegensatz dazu sollte ein Antigen-Antikörper-Komplex an der Zelloberfläche verbleiben, wenn Komplement oder Effektorzellen mit der Fc-Domäne des Antikörpers interagieren sollen, um CDC, ADCC oder ADCP herbeizuführen (Scott et al., 2012). Erfolgreich genutzte Tumor-assoziierte Zielantigene sind beispielsweise Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Weitere wichtige Zielstrukturen bei der Immuntherapie stellen zudem sogenannte Differenzierungsantigene (CD) dar. Hierbei handelt es sich meist um membrangebundene Glykoproteine mit unterschiedlichsten Funktionen wie Rezeptoreigenschaften, enzymatischer Aktivität oder interzellulärer Kommunikation, die oft Zelllinien- und Entwicklungsstadien-spezifisch exprimiert werden (P. J. Carter & Lazar, 2018).

1.3.2 Zielstrukturen auf der Oberfläche von B-Zell-Neoplasien

B-Zellen durchlaufen während ihrer Reifung von Vorläuferzellen zu Plasmazellen unterschiedliche Differenzierungsstadien, welche sich über spezifische Antigene identifizieren lassen, die häufig auch noch auf malignen B-Zellen nachweisbar sind (Abbildung 5). Einige dieser Zelloberflächenantigene wurden in bereits zugelassenen Medikamenten zur Antikörper-basierten Therapie von B-Zell-Neoplasien als Zielstrukturen genutzt, darunter CD19, CD20 und CD22 (Hafeez et al., 2018).

Für CD20 sind in Europa bereits sechs unterschiedliche Antikörper-basierte Wirkstoffe zur Therapie maligner B-Zell-Erkrankungen zugelassen (*European Medicines Agency*, 2024). Dazu zählt der chimäre Antikörper Rituximab, welcher in der Kombination mit Chemotherapie bereits vielversprechende Erfolge in der Behandlung von R/R B-ALL zeigte (Chevallier et al., 2012; Klein et al., 2021). Trotzdem profitieren nicht alle Patientinnen/Patienten von der Behandlung und Rezidive stellen nach wie vor ein großes klinisches Problem dar (Rezvani & Maloney, 2011).

Für CD22, ein Antigen, welches mit einer schnellen Internalisierungsrate assoziiert ist, zeigte das ADC Inotuzumab Ozogamicin (Besponsa) bereits gute Remissionsraten bei Patientinnen/Patienten mit einer R/R B-ALL (Wynne et al., 2019). B-Zell-Neoplasien wie die B-Vorläuferzell-ALL, die sich von wenig differenzierten Pro-B-Zellen ableiten, exprimieren teilweise noch kein CD20 oder CD22 und kommen für die Therapie mit entsprechenden Antikörper-Konstrukten nicht in Frage (Raponi et al., 2011; Scheuermann & Racila, 1995). Gerade für diese Erkrankungen werden Antikörper-basierte Therapeutika gegen früh exprimierte Oberflächenantigene wie CD19 benötigt.

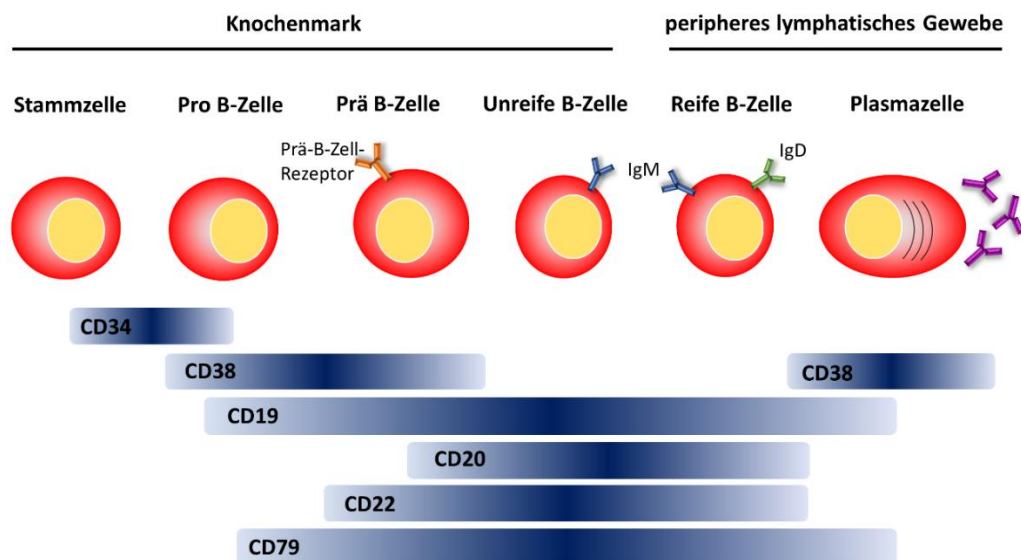


Abbildung 5: Stadien-spezifische Expression von Oberflächenantigenen während der B-Zell-Entwicklung. Während der Reifung von B-Zellen exprimieren sie Stadien-spezifische Differenzierungsantigene (durch blaue Balken dargestellt), die potenzielle Zielstrukturen Antikörper-basierter Therapeutika darstellen können. Abgewandelt nach Moyron-QuirOz et al. (2002), Rothe & Schmitz (1996) und Scheuermann & Racila (1995).

Humanes CD19, zunächst beschrieben als B4, ist ein transmembranes Glykoprotein von 95 kDa und Teil der Ig-Superfamilie (Nadler et al., 1983). Die hoch konservierte intrazelluläre Domäne enthält neun Tyrosin-Reste nahe des C-Terminus, deren Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen komplexen Kontrollmechanismen unterliegt (Ishiura et al., 2010; K. Wang et al., 2012). Auf reifen B-Zellen liegt CD19 im Ko-Rezeptor-Komplex mit CD21, CD18 und Leu13 vor (Matsumoto et al., 1993; K. Wang et al., 2012). Durch Kreuzvernetzung mit dem B-Zell-Rezeptor werden die Tyrosin-Reste von CD19 phosphoryliert, welche über *src-homology 2* Domänen mit intrazellulären Signalmolekülen

interagieren und nachgeschaltete Signalwege aktivieren können (R. H. Carter et al., 2002; Chalupny et al., 1993). Indem es sowohl die Reizschwelle des B-Zell-Rezeptors senkt als auch B-Zell-Rezeptor-unabhängige Signale moduliert, verstärkt CD19 die B-Zell-Aktivierung (R. H. Carter et al., 2002; Fujimoto et al., 1998; K. Wang et al., 2012). So spielt CD19 eine wichtige Rolle in der antigenunabhängigen Entwicklung sowie in der Ig-abhängigen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten und ist wichtig für eine optimale humorale Immunantwort (K. Wang et al., 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass CD19 mit einem *high mobility group box* Protein von 54 kDa interagiert, welches natürlicherweise vor allem membranassoziiert auf T-Zellen vorliegt (Uckun et al., 2011). Die Bindung dieses rekombinanten, löslichen CD19-Liganden bzw. CD19-spezifischer Antikörper löste in B-ALL-Zellen bzw. in gesunden B-Zellen und B-Vorläufer-Zellen Apoptose aus, was eine zusätzliche Rolle von CD19 in der Vermeidung von Autoimmunität durch negative Selektion hyperaktiver oder autoreaktiver B-Zellen vermuten lässt (Uckun et al., 2011).

CD19 ist ein vielversprechendes Antigen für die zielgerichtete Therapie von B-Zell-Neoplasien, da es bereits von Pro-B-Zellen exprimiert wird und erst ab der Differenzierung zur Plasmazelle verloren geht (Abbildung 5). Somit ist es ein verlässlicher B-Zellmarker, der in fast allen Entwicklungsstadien exprimiert wird (Murphy & Weaver, 2018; Raponi et al., 2011). Auch von B-Vorläufer-Zellen abgeleitete Neoplasien tragen in der Regel schon CD19, so sind über 95 % der B-Vorläufer-ALL CD19-positiv (Raponi et al., 2011; Topp et al., 2015). CD19 ist B-Zelllinien-spezifisch, lediglich eine Expression auf follikulären dendritischen Zellen wird diskutiert (Scheuermann & Racila, 1995). Hämatopoetische Stammzellen tragen kein CD19 auf der Oberfläche, was die Regeneration gesunder Zellpopulationen nach der Therapie mit CD19-gerichteten Therapeutika begünstigt (Hammer, 2012).

Schon eine Vielzahl CD19-basierter Therapeutika wurde entwickelt und ihre therapeutischen Effekte untersucht. Zum Beispiel verlängerten unkonjugierte murine CD19-Antikörper im Maus-Xenograft-Modell das Überleben von mit CD19-positiven Lymphomzellen transplantierten Mäusen (Yazawa et al., 2005). In ersten klinischen Studien waren unkonjugierte murine CD19-Antikörper gut verträglich, allerdings wurde nur ein vorübergehendes Ansprechen bei einzelnen Patientinnen/Patienten mit B-Zell-NHL beobachtet (Hekman et al., 1991; Vlasveld et al., 1995). Auch unterschiedliche CD19-gerichtete ADCs wurden im Mausmodell und in klinischen Studien getestet und zeigten anti-tumorale Effekte bei akzeptabler Toxizität (Grossbard et al., 1999; Rowland et al., 1993). Ein Beispiel ist Coltuximab Ravtansine (SAR3419), ein humanisierter, mit dem Maytansin-Derivat DM4 konjugierter CD19-Antikörper (Al-Katib et al., 2009; Hammer, 2012; Khongorzul et al., 2020).

Eine T-Zell-basierte Therapieoption, die klinisch u. a. zur Behandlung der R/R B-Vorläuferzell-ALL eingesetzt wird, stellen gentechnisch veränderte T-Zellen mit spezifischem chimärem Antigenrezeptor dar, sogenannte CAR-T-Zellen (Hayes, 2021). Hierbei werden autologe T-Zellen mit einem gegen CD19-

gerichteten chimären T-Zell-Rezeptor ausgestattet, wodurch sie gezielt CD19-positive Zellen eliminieren können. Die Eigenschaften eines spezifischen Antikörper-Fragments werden mit dem zytotoxischen Potenzial und der Lebensdauer von T-Zellen kombiniert. Bisher wurden vier CD19-spezifische CAR T-Zell-Produkte zur Therapie unterschiedlicher R/R B-Zell-Neoplasien von der EMA zugelassen (Dagar et al., 2023; European Medicines Agency, 2023). Für die B-ALL-Therapie werden Tisagenlecleucel (Kymriah) und Brexucabtagene autoleucel (Tecartus) eingesetzt (Dagar et al., 2023; Maude et al., 2018; B. D. Shah et al., 2021).

Auch der mittels Protein-Engineering modifizierte CD19-Antikörper Tafasitamab (MOR208, Minjuvi), welcher eine erhöhte Affinität zu FcγRs aufweist und verstärkte ADCC und ADCP induziert, wurde 2021 von der EMA in Kombination mit Lenalidomid zur Therapie des R/R diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) zugelassen (Delgado et al., 2021; Horton et al., 2008; Kellner et al., 2014). Auch für die Therapie der B-ALL wurde das Potenzial solcher Fc-optimierter CD19-Antikörper bereits in prä-klinischen Studien dargelegt (Kellner et al., 2018; Schewe et al., 2017).

1.4 Induktion von Apoptose durch Mitglieder der TNF-Superfamilie

Die TNF- bzw. TNF-Rezeptor (TNF-R)-Superfamilie ist eine große Gruppe von Liganden bzw. deren Rezeptoren, die in Signalwege für Zellproliferation, Zellüberleben und Zelldifferenzierung eingebunden sind und u. a. eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen ausüben (Locksley et al., 2001). Einige Rezeptoren der TNF-Superfamilie sind strukturell verwandte Typ I Transmembranproteine (N-Terminus extrazellulär), die durch eine Zystein-reiche extrazelluläre Domäne sowie eine zytoplasmatische Todesdomäne (*death domain*, DD) charakterisiert sind und als Todesrezeptoren (*death receptors*, DRs) bezeichnet werden. Zu diesen DRs zählen u. a. TNF-R1, CD95, TRAIL-Rezeptor 1 (TRAIL-R1 bzw. DR4) und TRAIL-R2 (bzw. DR5) (Walczak, 2013). Aktiviert werden diese DRs durch ihre entsprechenden Liganden: TNF, CD95L und TRAIL (Locksley et al., 2001; Wajant et al., 2005). Die Art der Apoptose-Induktion durch extrazelluläre Bindung eines Liganden wird als extrinsischer Signalweg bezeichnet. Dieser läuft weitgehend unabhängig vom Tumor-Suppressor-Protein p53 ab, während p53 im intrinsischen, auch mitochondrial genannten Weg, eine zentrale Rolle spielt (Lemke et al., 2014). Dies stellt, verglichen mit gängigen Chemotherapeutika, welche bei häufig vorkommenden Mutationen von p53 ihre Wirksamkeit verlieren, einen Vorteil dar, und macht DRs zu interessanten potenziellen Zielstrukturen für die Therapie maligner Neoplasien (Kretz et al., 2019).

1.4.1 Der TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)

Der *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) wurde 1995 durch seine Sequenzhomologie zu TNF und CD95L entdeckt (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). TRAIL ist ein besonders vielversprechendes Mitglied der TNF-Superfamilie, da er in der Lage ist, *in vivo* selektiv

Apoptose in Tumorzellen auszulösen, gegenüber gesundem Gewebe jedoch kaum toxisch wirkt (Ashkenazi et al., 1999). TRAIL ist ein Typ II Transmembranprotein (membrangebundener TRAIL, memTRAIL), dessen extrazellulärer C-Terminus abgespalten werden kann, wodurch löslicher TRAIL (*soluble TRAIL*, sTRAIL) entsteht (Pitti et al., 1996). Biologisch aktiv ist TRAIL als nicht-kovalentes Homotrimer, welches sich über hydrophobe Wechselwirkungen zusammenlagert (Locksley et al., 2001).

TRAIL bindet an unterschiedliche membrangebundene Rezeptoren. Dazu zählen die agonistischen DRs TRAIL-R1 und TRAIL-R2, die über eine DD verfügen und so Apoptose auslösen können (Lemke et al., 2014; Walczak et al., 1997), sowie die sogenannten Köder (*decoy*)-Rezeptoren, TRAIL-R3, TRAIL-R4 und der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (Degli-Esposti et al., 1997; Emery et al., 1998; Kretz et al., 2019; Pan et al., 1997). Diese verfügen, im Vergleich zu den agonistischen Rezeptoren, über keine funktionale DD und sind daher nicht in der Lage, die Apoptose zu induzieren. Sie konkurrieren um die TRAIL-Bindung und wirken über verschiedene Mechanismen als negative Regulatoren der Apoptose (Mérino et al., 2006).

Durch Bindung des homotrimeren TRAIL an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 werden die Rezeptoren zu Trimeren kreuzvernetzt und der extrinsische Weg der Apoptose wird eingeleitet (Abbildung 6). Die intrazellulären DDs rekrutieren das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated protein with death domain*), welches wiederum mit seiner *death effector domain* (DED) die Pro-Caspasen 8 und 10 rekrutiert. Dieser membrangebundene intrazelluläre Komplex wird *death-inducing signaling complex* (DISC) genannt (Lemke et al., 2014). Die Initiatorcaspase 8 wird am DISC gespalten und aktiviert über die Spaltung weiterer Pro-Caspasen eine Caspasen-Kaskade, was schließlich in der Apoptose der Zelle mündet.

Je nach Signalweg, den die Zellen nach DISC-Aktivierung verfolgen, lassen sich Typ-I und Typ-II-Zellen unterscheiden (Kantari & Walczak, 2011; Scaffidi et al., 1998). In Typ-I-Zellen ist die Aktivierung der Caspase 8 über den extrinsischen Weg ausreichend, um zur Apoptose der Zelle zu führen. Im Gegensatz dazu ist in Typ-II-Zellen die Aktivierung der Caspase 8 über den extrinsischen Weg ungenügend, so dass die Signalkaskade durch zusätzliche Aktivierung des intrinsischen Weges verstärkt werden muss, um zum Zelltod zu führen. Das verbindende Element zwischen den beiden Wegen der Apoptoseinduktion ist die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid (*Bcl-2-homology domain (BH3)-interacting death domain agonist*) (H. Li et al., 1998) (Abbildung 6). Bid ist ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-(*B-cell lymphoma 2*)-Familie, einer Gruppe von Proteinen der Apoptose-Regulation, die teils pro-apoptotisch (z.B. Bid, Bax (*Bcl-2-associated X protein*), Bak (*Bcl-2 antagonist or killer*)) und teils anti-apoptotisch (Bcl-2, Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*)) wirken. Bid wird zu tBid (*truncated Bid*) gespalten, welches die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak aktiviert, was in der

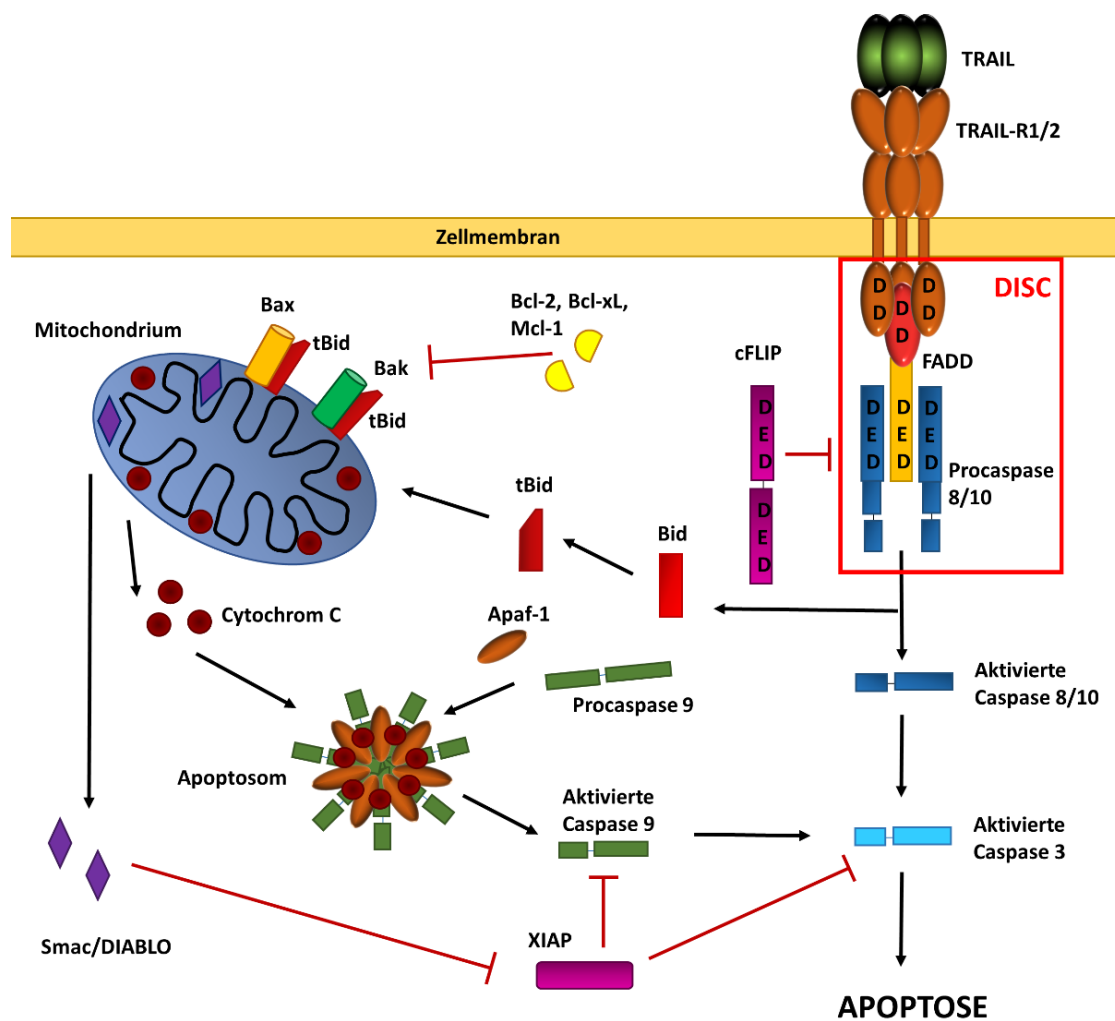


Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch TRAIL. Bindung von TRAIL an TRAIL-R1 bzw. 2 führt zu Rezeptor-Trimerisierung. Intrazellulär bildet sich der DISC (*death inducing signaling complex*). Hierfür lagert sich das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated protein with death domain*) über seine Todesdomäne (*death domain*, DD) an die intrazellulären DDs der Rezeptoren an. FADD rekrutiert über seine *death effector domain* (DED) die Pro-Caspasen 8 und 10, welche daraufhin am DISC aktiviert werden. Das Protein cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) konkurriert mit den Pro-Caspasen 8 und 10 um die Bindung an FADD und inhibiert so die pro-apoptotische Aktivität des DISC. In Typ-I-Zellen aktiviert Caspase 8 die Effektorcaspase 3, was zur Apoptose führt, während dieser Signalweg in Typ-II-Zellen insuffizient ist. Dort spaltet Caspase 8 das Protein Bid (*Bcl-2-homology domain (BH3)-interacting death domain agonist*) zu tBid (*truncated Bid*), welches dann gemeinsam mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 antagonist or killer*) der Bcl-2-Familie die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert. Dabei werden Cytochrom C und Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) bzw. DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) freigesetzt. Cytochrom C lagert sich mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und Pro-Caspase 9 zum Apoptosom zusammen. Dies aktiviert Caspase 9, welche dann Caspase 3 aktiviert und zur Apoptose führt. Inhibitorisch auf den mitochondrialen Weg wirken die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) oder Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*) der Bcl-2-Familie, indem sie Bax und Bak inhibieren. Auch das Protein XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis proteins*) hemmt Apoptose über Inhibition von Caspase 3, 7 und 9. Mitochondrialer Smac bzw. DIABLO wirken über Inhibition von XIAP pro-apoptotisch. Abgewandelt nach Lemke et al. (2014) und Walczak (2013).

Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP) resultiert (Kantari & Walczak, 2011; Westphal et al., 2013). Durch die MOMP werden pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytoplasma freigesetzt. Cytochrom C bildet gemeinsam mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und der Pro-Caspase 9 das Apoptosom, wodurch Caspase 9 und infolgedessen die Effektor-Caspasen 7 und 3 aktiviert werden, was schlussendlich zur Apoptose führt (Kretz et al., 2019; Lemke et al., 2014).

Der Apoptose-Signalweg wird durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert, die erst teilweise verstanden sind (vergleiche (vgl.) Abbildung 6). Beispielsweise wird die Aktivierung der Pro-Caspase 8 am DISC durch das Protein cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) inhibiert. cFLIP verfügt über zwei DEDs, wodurch diese mit den Pro-Caspasen um die Bindung an FADD konkurrieren. Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak unterliegen der Kontrolle anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-2, Bcl-xL oder Mcl-1. So wird die MOMP und damit der mitochondriale Weg der Apoptose streng durch eine Balance aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert (Kale et al., 2018). Apoptose-inhibierende Proteine (*inhibitor of apoptosis proteins*, IAPs) wie XIAP (*X-linked IAP*) inhibieren die Caspasen 3, 7 und 9. Aus dem Mitochondrium freigesetzter Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) bzw. DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) bindet und inaktiviert XIAP und blockiert so dessen inhibitorische Wirkung, wodurch die volle Aktivierung der Caspasen ermöglicht und die Ausführung der Apoptose gefördert wird (Kretz et al., 2019; Lemke et al., 2014).

1.4.2 TRAIL in der Krebstherapie

Erste Versuche, TRAIL-Rezeptor-Agonisten (TRAs) in der Krebstherapie zu nutzen, wurden 1999 mit der Herstellung von löslichem rekombinantem humanem TRAIL (rhTRAIL) unternommen. rhTRAIL zeigte eine anti-tumorale Wirkung in zahlreichen Krebszelllinien *in vitro* und verhinderte das Tumorwachstum *in vivo*, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Dulanermin, eine rekombinante humane sTRAIL-Variante, wurde durch zahlreiche Phase-I-Studien zwar als sicher eingestuft und zeigte in einzelnen Patientinnen/Patienten eine anti-tumorale Wirkung (Herbst et al., 2010; Soria et al., 2010; Yee et al., 2007), allerdings konnten die vielversprechenden prä-klinischen Ergebnisse in Phase-II- und Phase-III-Studien nicht bestätigt werden (Cheah et al., 2015; Soria et al., 2011, 2017). Neben rekombinanten TRAIL-Molekülen wurden in der Vergangenheit auch verschiedene agonistische Antikörper gegen TRAIL-R1 (Mapatumumab) und TRAIL-R2 (z.B. Conatumumab und Lexatumumab) entwickelt (Lemke et al., 2014). In prä-klinischen Studien konnte für die verschiedenen TRAIL-R-agonistischen Antikörper zwar eine anti-tumorale Wirksamkeit nachgewiesen werden, in randomisierten kontrollierten klinischen Studien ergab sich allerdings für

keinen der Antikörper ein signifikanter therapeutischer Vorteil gegenüber alleiniger Standardtherapie (Lemke et al., 2014).

Ein Ansatz zur Verbesserung der pharmakokinetischen und biologischen Eigenschaften von rhTRAIL ist die Herstellung von Fusionsproteinen aus sTRAIL und Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten (Bremer, Kuijlen, et al., 2004; Stieglmaier et al., 2008; H. Wang et al., 2014). So zeigte beispielsweise das Fusionsprotein Fc-TRAIL, bestehend aus einer IgG1-Fc-Domäne und TRAIL, im Maus-Xenograft-Modell eine verlängerte Plasma-HWZ sowie eine dem rhTRAIL überlegene Inhibition des Wachstums von Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (H. Wang et al., 2014). Um die Fähigkeit der Apoptoseinduktion durch TRAIL mit der Tumorspezifität monoklonaler Antikörper zu kombinieren, wurden Fusionsproteine aus gegen unterschiedliche Antigene gerichtete scFvs und TRAIL entwickelt (Bremer, Kuijlen, et al., 2004; Bremer, Samplonius, et al., 2004). Durch Bindung eines scFv-TRAIL-Fusionsproteins an seinem Antigen entsteht eine Art membranständiger TRAIL. Dieser kann entweder TRAIL-R1/2 auf derselben Zelle („Suizid“) oder einer benachbarten Antigen-positiven Tumorzelle („Brudermord“ bzw. „Fratizid“) kreuzvernetzen und darüber Apoptose induzieren (Abbildung 7). Indem TRAIL-R1/2 auf benachbarte Antigen-negative Tumorzellen aktiviert werden, können auch diese durch Fratizid eliminiert werden, was als *bystander*-Effekt bezeichnet wird (Stieglmaier et al., 2008).

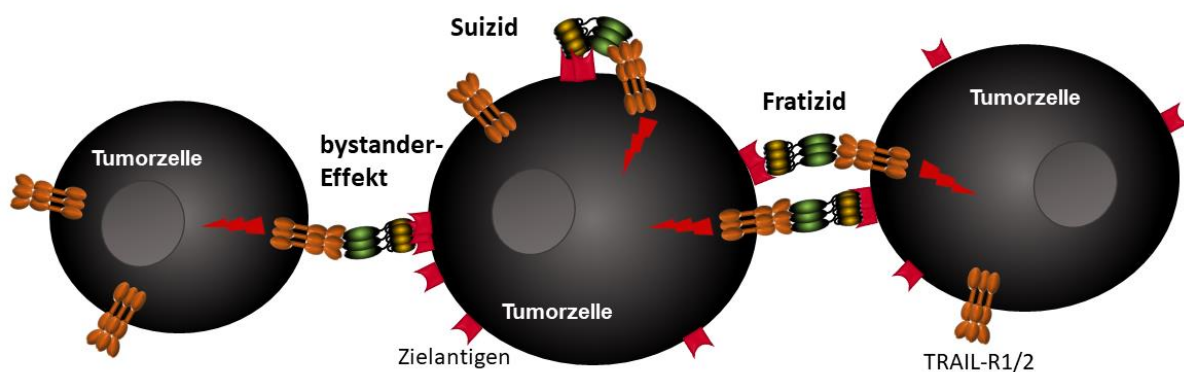


Abbildung 7: Wirkungsweise Tumorzell-gerichteter TRAIL-Fusionsproteine am Beispiel von scFv:sTRAIL. Die Fusionsproteine aus sTRAIL und Tumorzell-gerichteten scFvs binden am Zielantigen auf der Tumorzelloberfläche, wodurch TRAIL an der Zelloberfläche immobilisiert wird. So aktivieren die Fusionsproteine TRAIL-Rezeptoren auf derselben Zelle (Suizid) oder auf benachbarten Tumorzellen (Fratizid) durch reziproke Kreuzvernetzung oder auf benachbarten Antigen-negativen Tumorzellen (bystander-Effekt).

Trotz vielversprechender prä-klinischer Ergebnisse konnte bisher kein TRAIL-basiertes Therapeutikum eine Zulassung zur Therapie maligner Neoplasien erlangen. Weitere intensive Forschung ist nötig, um das therapeutische Potential von TRAIL für die Behandlung von Tumorerkrankungen nutzen zu können.

1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Antikörper-basierte Immuntherapien stellen heutzutage einen wichtigen Teil der Behandlung hämatologischer Neoplasien dar. Trotz großer klinischer Erfolge profitieren nach wie vor nicht alle Patientinnen/Patienten von dieser Behandlungsoption, da es auch hier zur Entwicklung von Resistenzen und Rezidiven kommt. Zur Steigerung der anti-tumoralen Effizienz therapeutischer Antikörper bedarf es daher weiterer Optimierungen.

Fusionsproteine aus Antikörpern, die gegen Tumorzell-assoziierte Antigene gerichtet sind, und dem Apoptoseinduktor TRAIL stellen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Die Antikörper-TRAIL-Fusionsproteine können selektiv Apoptose in Tumorzellen induzieren, indem sie nach Bindung am Zielantigen TRAIL-Rezeptoren auf derselben oder einer benachbarten Zelle kreuzvernetzen. In früheren Studien wurden meist TRAIL Fusionen mit scFv untersucht. Diese sind jedoch, im Vergleich zu Antikörpern im IgG1-Format, mit einer geringeren Plasmaretentionszeit assoziiert (Unverdorben et al., 2016). In diesem Zusammenhang stellt CD19, aufgrund seines vorteilhaften Expressionsprofils, bei der Therapie von B-Zell-Neoplasien ein attraktives Zielantigen dar.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob ein Fusionsprotein, bestehend aus einem CD19-gerichteten IgG1-Antikörper und TRAIL, einen potenziellen neuen Wirkstoff zur Therapie der B-ALL darstellen kann, indem es selektiv an CD19 auf B-ALL-Zellen bindet und über die Kreuzvernetzung von TRAIL-Rezeptoren Apoptose induzieren kann. Dafür sollte in dieser Arbeit ein heterodimeres Fusionsprotein, an dem ein einzelkettiges TRAIL-Trimer (*single chain* TRAIL, scTRAIL) nur an einer der beiden schweren Ketten eines CD19-IgG1-Antikörpers fusioniert vorliegt, hergestellt werden (CD19-scTRAIL), um Antigen-unabhängige Effekte zu vermeiden. Zunächst sollten dazu die für CD19-scTRAIL kodierenden Expressionsvektoren der schweren und leichten Antikörperketten kloniert und in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Das Fusionsprotein sollte anschließend biochemisch charakterisiert, auf seine spezifische Bindungsfähigkeit getestet und bezüglich seiner zytotoxischen Aktivität analysiert werden. Im Besonderen sollte hier die Induktion der Apoptose durch CD19-scTRAIL untersucht werden. Analog zu CD19-scTRAIL sollte ebenfalls ein entsprechendes heterodimeres Kontrollprotein aus einem HER2-Antikörper und scTRAIL (HER2-scTRAIL) hergestellt und charakterisiert werden, um die Antigenspezifität von CD19-scTRAIL zu beurteilen.

Die so gewonnenen Ergebnisse sollten Erkenntnisse über die Optimierung Tumorzell-gerichteter TRAIL-Fusionsproteine erbringen und dazu beitragen, die Limitationen von CD19-spezifischen Immuntherapien zu überwinden, um so zum Beispiel in der Therapie der CD20-negativen B-Zell-Neoplasien neue Perspektiven aufzuzeigen.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Dokumentation	HeroLab Transilluminator UVT-28 ME	HeroLAB, Wiesloch
Agarosegel-Dokumentationskammer	E.A.S.Y 440K	HeroLAB, Wiesloch
Agarosegelkammer	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Agarosegelkammer Netzteil	Consort E143	Consort, Turnhout, Belgien
Autoklav	VX150	Systec, Linden
Blot-Kammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Brutschrank	Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer	(Epics/Navios 10/3)	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
Eismaschine	AF 206	Scotsman Ice Systems, Chicago, IL, USA
Elektroporator	Micro Pulser	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gel-Gieß-Vorrichtung (SDS-PAGE)		Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glasplatten und Kämme		Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Heizblock	Block heater SBH130D	Bibby Scientific, Stone, UK
Lichtmikroskop	Axiovert 40c/Axiostarplus	Carl Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen
MiliQ Anlage	MilliQ A10	Merck, Darmstadt
Netzteil für SDS-PAGE und Western Blot	Power Pac HC Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
pH-Meter	HI 2211 pH/ORP Meter	Hanna instruments, Vöhringen
Photometer	BioPhotometer Sunrise Plate-Reader remote	Eppendorf, Hamburg Tecan, Männedorf, CH
Pipette	Eppendorf Reference Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Integra Pipetboy 2	Hirschmann, Eberstadt
Proteinchromatograph	<i>ÄKTAprime liquid chromatography system</i>	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Proteinchromatographie- säule	HiLoad 26/200 Superdex™ 200pg	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Pumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra bioscience, Switzerland
Reinluftbank	Hera safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Schüttelinkubator	Ceromat BS-T Schüttelinkubator Thermomixer comfort 1,5ml	Satorius Stedim Biotech, Göttingen Eppendorf, Hamburg
SDS-PAGE-Laufkammer	Wide Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
UV-Tisch	SYAV 3020	Syngene, Cambridge, UK
Vortexer	Bio vortex V1	Dewert Labortechnik, Rödinghausen
Waage	XB 2200C Waage Prescisa	PESA, Wetzikon, CH
Wasserbad		Memmert, Schwabach
Western Blot Dokumentationskammer	ChemiDoc XRS Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Zentrifugen	Galaxy Mini Zentrifuge Heraeus Multifuge Zentrifuge Heraeus Megafuge Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico	VWR, Darmstadt Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.2 Labormaterialien

Tabelle 2: Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller-Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz)
96 well Zellkultur-Platten	Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen, Flachboden, mit Deckel für geringe Verdunstung, Standart/ Suspension, F	Sarstedt, Nümbrecht
Bechergläser		Schott, Mainz
Dialysierschlauch	Dialysierschlauch ZelluTrans Cellulose Wandstärke 25 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Drigalskispatel	Plattierungsspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegskalpell	Disposable scalpel No. 10	Feather, Osaka, JPN
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette 0,1 cm	Bio-Rad, Hercules, USA
Erlenmeyerkolben		Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	5 ml Tube	Sarstedt, Nümbrecht
Falcons	15 ml- und 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier für Western Blot	Extra Thick Blot Filter Paper	Bio-Rad, Hercules, USA
Filtriersäulen für die Antikörperaufreinigung	Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad, Hercules, USA
Flaschen		Schott, Mainz
Gel-Gieß-Vorrichtung		Bio-Rad, Hercules, USA
Glasplatten und Kämme (SDS- Gele)		Bio-Rad, Hercules, USA

Labormaterial	Hersteller-Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz)
Gradientengele	Mini-Protean-TGX, Precast Gels, 4-14 %, 10 wells, 30 µl/well	Bio-Rad, Hercules, USA
Kanülen		Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kulturschalen		Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten Photometer	UV-transparente Einmal-Küvette ab 220 nm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt serological pipette Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße		Sarstedt, Nümbrecht
SDS-PAGE-Kammern	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Spritzen		Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter (groß) 0,22 µm	Millipore Express Plus	Merck, Darmstadt
Sterilfilter (klein) 0,2 µm	Acrodisc 13mm Syringe Filter 0,2 µm Supor Membrane	Pall, Port Washington, USA
Ultrafiltrationssäulen	Vivaspin 6 / 20 Centrifugal Concentrator	Sartorius, Göttingen
Western Blot Trägermembran	Immun-Blot PVDF membranes for Protein Blotting	Bio-Rad, Hercules, USA
Zählkammer	Neubauer Zählkammer 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T175 / T75 Standard ventilated cap	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
100 Bp-DNA Leiter	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
2x YT Agar	Carl Roth, Karlsruhe
2x YT Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose SeaKem LE	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bradford Dye Reagenz	Bio-Rad, Hercules, USA
CaptureSelect™ CH1-XL Affinity Matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chloroquin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver (MMP) Blotting Grade Buffer	Bio-Rad, Hercules, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) Omnipur	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe / Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin /Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio-Rad, Hercules, USA
Roti®-Blue Coomassie 5x	Carl Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Western Blot Detektion)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.4 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
2x HBS	50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05
Coomassie-Färbelösung	60 ml H ₂ O, 20 ml Methanol, 20 ml 5xRoti Blue
Elutionspuffer (Proteinaufreinigung)	0,1 M Glyzin, pH 3,0
FACS-Puffer (PBA)	1xPBS, 1 % BSA, 1 % Natriumazid
Ladepuffer 6x (für DNA)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1 % w/v SDS, pH 8,3
Neutralisationspuffer (Proteinaufreinigung)	1 M Tris, pH 8,0
NP40Lysepuffer	50mM Tris HCL pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 2 % (v/v) NP40
PBS	Dulbecco's PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
SDS-PAGE Ladepuffer 5x (reduzierend)	313 mM Tris, 10 % (m/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (m/v) Bromphenolblau, 0,5 M Dithiothreitol
SDS-PAGE Ladepuffer 5x (nicht-reduzierend)	313 mM Tris, 10 % (m/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (m/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS w/v

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
SDS-PAGE Sammelgel	667 µl Acrylamid/Bis, 1,000 ml Tris (0,5 M, pH 6,8), 40 µl SDS (10 %), 20 µl APS (10 %), 4 µl TEMED ad 4,024 ml Aqua. dest.
SDS-PAGE Trenngel	2,668 ml Acrylamid/Bis, 2,001 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 80 µl SDS (10 %), 60 µl APS (10 %), 6 µl TEMED ad 8,067 ml Aqua dest.
TAE Laufpuffer (50x)	2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 mM Eisessig, pH 8,0
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 100 mM Tris, pH 7,6
TBST	TBS (1x), 0,1 % v/v Tween 20
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20 % v/v Methanol, pH 8,3
Tryptanblau	Tryptan blue solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.5 Plasmide

Tabelle 5: Plasmide

Vektor	vollständige Bezeichnung (falls abweichend)	Referenz	Resistenz
pSEC-HC-HER2-VH-wt	pSEC-HC-4D5-VH-wt	Wirt et al., 2017	Ampicillin
pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1	pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1	Khodoun et al., 2021	Ampicillin
pSEC-HC-CD19-VH-wt	pSEC-HC-MOR208-VH-wt	Schewe et al., 2017	Ampicillin
pSEC-HC-CD19-scTRAIL	pSEC-HC-MOR208-VH-wt-scTRAIL	C. Kellner, M. Peipp, (unpubliziert)	Ampicillin
pMA-RQ-CH3-Der2-scTRAIL	pMA-RQ-BsrGI-CH3DD-scTRAIL-SfoI	Auftragssynthese (Eurofins Scientific, LU)	Ampicillin
pSEC-HC-CD19-Der1	pSEC-HC-MOR208-IgG1-Der1-KK	Eigene Herstellung	Ampicillin
pSEC-HC-HER2-Der1	pSEC-HC-4D5-IgG1-Der1-KK	Eigene Herstellung	Ampicillin
pSec-HC-CD19-Der2-scTRAIL	pSEC-HC-MOR208-IgG1-Der2-DD-scTRAIL	Eigene Herstellung	Ampicillin
pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL	pSEC-HC-4D5-IgG1-Der2-DD-scTRAIL	Eigene Herstellung	Ampicillin
pSEC-4D5-LC		Wirt et al., 2017	Ampicillin
pSEC-MOR208-LC		Schewe et al., 2017	Ampicillin

2.6 Enzyme

Tabelle 6: Enzyme

Enzym	Hersteller
BsrGI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
NheI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
PpuMI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
XbaI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
SfoI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
KpNI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Enzym	Hersteller
NotI	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Basel, CH
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.7 Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Hersteller
<i>APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI</i>	BioLegend, San Diego, CA, USA
<i>NucleoBond® Xtra Maxi</i>	MACHEREY-NAGEL, Düren
<i>NucleoSpin® Plasmid Quick Pure</i>	MACHEREY-NAGEL, Düren
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Cell Proliferation Kit I (MTT)</i>	Roche, Basel, CH

2.8 Oligonukleotide

Für Sequenzierreaktionen wurden folgende Oligonukleotide (Primer) verwendet

Tabelle 8: Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Orientierung
pSEC CH1	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Forward
pSEC CMV	GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG	Forward
pSEC REV	CCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG	Reverse
pSEC back 1	GCTCTCCCACTCCACGGCGATGTCGC	Reverse
pSEC back	CGTCCACGTACCAAGTTGAACTTGACCTCAGG	Reverse
pSEC CH3 for	GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	Forward
pSEC scTRAIL for	GGACTGTACTCCATATATCAAGGC	Forward
pSEC scTRAIL back	CCATATCAATGAGGTGCTCATTCG	Reverse

2.9 Bakterienstämme

Tabelle 9: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E. coli One Shot® Mach1™-T1R</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli XL1 blue</i>	Stratagene, San Diego, CA, USA
<i>E. coli One Shot® Top10™-T1R</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.10 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 10: Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
Lenti-X 293T	Subklon der 293T Zelllinie humane Nierenfibroblasten, stabil transfiziert mit SV40 large T Antigen	Clontech, A Takara Bio Company, CA, USA
CEM	Humane T-Zell ALL	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
NALM-6	Akute Prä-B-Zell Lymphatische Leukämie	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
REH	Akute Prä-B-Zell Lymphatische Leukämie	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 11: Zellkulturmedien

Medium	Für die Zelllinien	Zusammensetzung
R10+	CEM NALM-6 REH	Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco) 10 % <i>fetal calf serum</i> (FCS) (Invitrogen) 1 % Penicillin / Streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen)
D10+	Lenti-X™ 293T	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) 10 % FCS (Invitrogen) 1 % Penicillin / Streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen)

2.11 Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

Antikörper	Klonalität, Beschreibung	Hersteller
α-human kappa leichte Kette	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
α-human-IgG- Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i> , HRP)	Ziege, polyklonal, HRP-gekoppelt, A0170	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-TRAIL-Antikörper	Kaninchen, polyklonal, SAB3500424	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
α-Kaninchen-HRP	Ziege; HRP gekoppelt	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
α-Maus-HRP	Ziege; HRP gekoppelt	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
α-human IgG Fc-FITC	Ziege, polyklonal, FITC- konjugiertes F _{ab} -Fragment	Jackson Immuno Research, PA, USA
Trastuzumab Herceptin®	humanisierter, monoklonaler HER2 IgG1	Roche, Basel, CH
Rituximab MabThera®	chimärer, monoklonaler CD20 IgG1	Roche, Basel, CH
Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) Antikörper 9542	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Antikörper	Klonalität, Beschreibung	Hersteller
<i>Cleaved</i> PARP (Asp214) (D64E10) XP® Rabbit mAb 5625	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Caspase-7 (D2Q3L) Rabbit mAb 12827	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
<i>Cleaved</i> Caspase-7 (Asp198) (D6H1) <i>Rabbit</i> mAb 8438	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-alpha Tubulin Antikörper (ab18251)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK

2.12 Computerprogramme

Tabelle 13: Computerprogramme

Vector-NTI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GraphPad PRISM 4.0	GraphPad Software, San Diego, US
Mircrosoft office 2019	Microsoft, USA
KALUZA Analysis Software	Beckman Coulter, USA
FlowJo Software Version 10.7.1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mendeley cite v1.27.0	Mendeley Ltd, Elsevier, Amsterdam, Niederlande

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung transformierter Bakterien

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine einzelne Bakterienkolonie von der Agarplatte gepickt und in 2YT-Medium (Carl Roth GmbH), gemischt mit Ampicillin (Konzentration 50 µg/ml) überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 250 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) über Nacht. Es wurden 3 ml Medium genutzt, um anschließend Plasmid-DNA im kleinen Maßstab zu präparieren bzw. 500 ml Medium, um große Mengen Plasmid-DNA für Transfektionen herzustellen.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Nach Kultivierung der Plasmid-tragenden Bakterien wurde unter Verwendung des NucleoBond® Xtra Maxi Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) bzw. des NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben die amplifizierte Plasmid-DNA gewonnen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in destilliertem Wasser. Die DNA-Konzentration wurde anschließend bei 260 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt, wobei zusätzlich die Absorptionen bei 230 nm und 280 nm erfasst wurden. Die Reinheit der doppelsträngigen DNA wurde anhand der Verhältnisse der Absorption bei 260 nm zu 280 nm und 260 nm zu 230 nm beurteilt. Nur Proben mit einem Verhältnis von 260 nm zu 280 nm über 1,8 sowie einem Verhältnis von 260 nm zu 230 nm im Bereich von 1,8 bis 2,2 wurden für die folgenden Experimente verwendet.

3.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Mit Hilfe des Programmes Vector-NTI (Thermo Fisher Scientific) wurden geeignete Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen bestimmt. In 20 - 30 µl Gesamtvolumen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA mit je 1 µl Enzym (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) und den vom Hersteller empfohlenen Puffern bei 37 °C 3 h bzw. über Nacht inkubiert. Bei Verdau über Nacht wurde das Gemisch mit 50 µl Mineralöl bedeckt, um Verdunstung und damit verbundene Konzentrationsänderung zu verhindern.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden nach Zugabe des 6x Ladepuffers (*gel loading dye purple*, NEB) auf das in 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) liegende Agarosegel (1%ig w/v in 1x TAE) aufgetragen. Eine Spannung von 120 V wurde für 35 Minuten (min) bis 1 h angelegt, abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente bzw. der Plasmide. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Standard (*100 Bp-DNA ladder*, NEB) mit DNA-Fragmenten definierter Größe und Menge aufgetragen, um später die aufgetragenen Proben damit vergleichen und abschätzen zu können.

Im Anschluss wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad (2 µg/ml in 1x TAE) für 20 min gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden, was die DNA-Banden im Gel sichtbar macht. Die Banden der entsprechenden Größe wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem UV-Transilluminator (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch) fotografiert.

3.1.5 Extraktion der Plasmid-DNA aus Agarosegelen

Nachdem die DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden, wurden mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben die verdauten DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert. Die Elution erfolgte in 50 µl destilliertem Wasser. Bis zur Ligationsreaktion wurden die eluierten DNA-Proben bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.6 Abschätzgel für Plasmid-DNA

Um die Menge der aus der Gelextraktion gewonnenen DNA durch Vergleich mit dem Standard abzuschätzen und die erfolgreiche Gelextraktion zu überprüfen wurden 5 µl jeder Probe, gemischt mit 1 µl 6x Ladepuffer (*gel loading dye purple*, NEB), erneut durch ein Agarosegel aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert.

3.1.7 Ligationsreaktion

Auf Eis wurden 5 µl Akzeptorplasmid-DNA, 12 µl Insert-DNA (ca. 3-fach molarer Überschuss), 2 µl Ligase-Puffer (*10x ligation buffer*, Roche) und 1 µl Ligase (T4 DNA-Ligase, 100 u/µl, Roche) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.1.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

3.1.8.1 Transformation durch Hitzeschock-

Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA mittels Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) (*One Shot*® Mach1™-T1R bzw. *One Shot*® Top10™-T1R, Invitrogen) eingebracht. Hierzu wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, mit 4 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock durch Inkubation für 30 Sekunden (s) im Wasserbad bei 42 °C, gefolgt von einer erneuten Inkubation von 2 min auf Eis. Nach Hinzufügen von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (Invitrogen) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden mit Hilfe steriler Spatel 50 µl bzw. 250 µl der Bakteriensuspension auf 2YT-Agarplatten ausgestrichen, denen zur Selektion 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt waren. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Einzelklone gepickt und zu einer Bakterienkultur von 3 ml pro Kolonie herangezogen (vgl. 3.1.1). Mit dem *NucleoSpin*® *Plasmid Quick Pure Kit* (MACHEREY-NAGEL) wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 3.1.2).

3.1.8.2 Transformation durch Elektroporation

Zur Vervielfältigung wurden elektrokompente *E. coli* (XL1 blue, Stratagene, USA) mit dem entsprechenden Plasmid mittels Elektroporation transformiert. Hierzu wurden 0,5 µl bis 1 µl DNA zu 50 µl *E. coli*-Suspension gegeben, 2 min auf Eis inkubiert und in eine Elektroporationsküvette (*Gene Pulser* 0,1 cm, BioRad) überführt. Mit Hilfe des Elektroporators (*MicroPulser*, BioRad) wurde kurzzeitig ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Zellmembran permeabel wird und die Bakterien die Plasmid-DNA aufnehmen. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie auf 2YT-Agar-Platten mit Ampicillinzusatz (Konzentration 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ auf die ausgebildete Resistenz und damit das aufgenommene Plasmid selektiert.

3.1.9 Überprüfen der Klonierung durch Restriktionsanalyse

Um zu testen, ob die Klonierung erfolgreich war, wurden die Plasmide mit anhand der Plasmidsequenzen von Insert und Akzeptorplasmid ausgewählten Restriktionsendonukleasen verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 3.1.4). Nach dem Restriktionsprofil wurden positive Klone identifiziert.

3.1.10 Sequenzanalyse der Plasmide

Um nach erfolgreicher Klonierung die Sequenzen der gewonnenen Plasmide zu überprüfen, wurden Sanger-Sequenzierungen im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die Plasmide wurden hierzu auf eine DNA-Konzentration von 100 ng/µl eingestellt, die Primer auf eine Konzentration von 4,8 µM. Pro Sequenzier-Reaktion wurden 3 µl DNA und 1 µl Primer gemischt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden im empfohlenen Medium bei 37 °C, 6 % CO₂ und angefeuchteter Luft auf einer Zellzahl von 0,25-3 × 10⁶ Zellen pro ml gehalten und dazu dreimal wöchentlich passagiert. Adhärenz Zelllinien wurden mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml Accutase (Sigma life science) für 2 min bei 37 °C abgelöst. Anschließend wurden sie in Medium resuspendiert und 0,25-0,5 × 10⁶ Zellen pro ml in frische Zellkulturflaschen ausgesät.

Gezählt wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer 0,1 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co KG) nach Verdünnung mit Tryptanblau (*Tryptan blue solution*, Sigma). Anschließend wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl pro Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4.$$

3.2.2 Expression der Fusionsproteine in eukaryotischen-Zellen

Um die Plasmide, welche für schwere und leichte Kette der Antikörper-Fusionsproteine kodierten, in Lenti-X 293T Zellen (Clontech) einzubringen, wurde die Methode der Kalziumphosphat-Transfektion genutzt (Graham & Van Der Eb, 1973). Durch Mischung von Plasmid-DNA, Calciumchlorid und Natriumphosphat fällt Calciumphosphat aus und bindet Plasmid-DNA. Die Suspension wird auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, welche die DNA-tragenden Präzipitate endozytotisch aufnehmen und infolgedessen die Fusionsproteine exprimieren.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die adhärenenten Lenti-X 293T Zellen abgelöst, $3,0 \times 10^6$ Zellen in 10 ml D10+Medium pro Zellkultur-Platte ausgesät und für ca. 16 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, um eine Konfluenz der Zellen von ungefähr 50 % zu erreichen. Dann wurde der Überstand aller Zellkultur-Schalen abgesaugt und durch 8 ml frisches D10+ ersetzt. Pro Platte wurden 2 ml Transfektionsansatz vorbereitet. Pro Ansatz wurden 20 µg Plasmid-DNA, unterteilt in DNA für schwere und leichte Kette, 100 µl CaCl₂ (2,0 M) und 5 µl Chloroquin (25 mM in PBS, Sigma-Aldrich) gemischt und mit sterilem Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Dem 2xHBS-Puffer (1 ml pro Ansatz) wurde in 50 ml-Röhrchen durch konstantes Auspusten aus einem Pipetus Luft zugeführt und währenddessen langsam die DNA-Lösung dazu getropft. Infolgedessen trübte sich die Lösung durch Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation. Pro Platte wurden 2 ml der Suspension tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. In einer anschließenden Inkubationszeit von ca. 9 h (max. 12 h) bei 37 °C und 6 % CO₂ wurden die DNA-Calziumphosphat-Komplexe von den Zellen endozytiert. Es folgte ein weiterer Wechsel des Mediums.

Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium alle 48–72 h gewechselt und die Überstände gesammelt, abzentrifugiert (7700 rpm, 10 min, 4 °C), steril filtriert und bis zur Aufreinigung des exprimierten Proteins bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.3 Proliferationsinhibitionsversuche

Um den Effekt der exprimierten Fusionsproteine auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden MTT-Assays (Mosmann, 1983) durchgeführt. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in metabolisch aktiven Zellen zu blau-violetter Formazan reduziert, welches durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) gelöst wird und sich durch eine photometrische Messung quantifizieren lässt. Die entstandene Menge an

Formazan korreliert mit der metabolischen Aktivität und, unter bestimmten Bedingungen, mit der Zellproliferation.

Auf einer 96-well Zellkultur-Platte wurden 20.000 Zellen/Bohrung in 100 µl R10+ Medium ausgesät ($0,2 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Fusionsproteine und entsprechende Kontrollen wurden in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und die Platten für 72 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 10 µl MTT/Bohrung (*MTT labeling reagent, Cell Proliferation Kit I, Roche*) hinzugegeben und die Zellen erneut 4 h inkubiert (37 °C, 6 % CO₂), um MTT zu Formazan zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl SDS (*Solubilization solution, Cell Proliferation Kit I, Roche*) lysiert und das Formazan gelöst. Nach weiteren 16 h Inkubationszeit (37 °C, 6 % CO₂) wurden die Proben bei 550 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) im *ELISA-reader (Sunrise Plate-Reader, Tecan)* gemessen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Um die Antigenspezifität zu belegen, wurden in Blockadeexperimenten die ALL-Zellen vor Zugabe der Fusionsproteine mit CD19- oder HER2-spezifische Antikörpern in einem 125-fach molaren Überschuss 30 min vorinkubiert.

3.2.4 Herstellung von Zell-Lysaten

3×10^6 Zellen/Ansatz wurden in einer 6-well Zellkulturplatte ausgesät und für 48 h mit den entsprechenden Antikörper-Konstrukten oder PBS als Kontrolle bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit kalten PBS gewaschen und in NP40-Lysepuffer mit Proteaseinhibitorlösung (1:10) für eine Stunde (h) auf Eis lysiert. Anschließend wurden Zellreste bei 13.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Bradford Reagenz nach Herstellerangaben photometrisch bei 595 nm bestimmt. Zum Vergleich diente eine BSA-Eichkurve.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Reinigung der Fusionsproteine aus dem Zellüberstand

Die Reinigung der Antikörper-Konstrukte wurde mittels eines affinitätschromatographischen Verfahrens durchgeführt. 1 ml *CaptureSelect™ CH1-XL Affinity Matrix* (Thermo Scientific™) pro 1 l gesammeltem Zellkulturüberstand wurde bei 4 °C ca. 16 h auf einem Magnetrührer eingerührt. Die CH1-Matrix in Form winziger, an einen spezifischen CH1 Liganden gekoppelter Kügelchen bindet dabei die CH1-Domäne humaner IgG-Antikörper.

Die Matrix mit gebundenen Antikörpern wurde abzentrifugiert (2.000 rpm, 10 min, 4 °C) und dadurch ankonzentriert, bis ca. 10 ml konzentrierte Matrix blieben, welche auf eine Säule (*Poly Prep Chromatographie Column, BioRad*) geladen wurde. Nach Waschen mit 10 ml PBS (DPBS, gibco) folgte die Elution mit Elutionspuffer (0,1 M Glyzin, pH 3,0) in 4-10 Fraktionen von je 1 ml Volumen. Um das

Protein vor Denaturierung durch den sauren Elutionspuffer zu schützen, wurde in die Auffanggefäße je 200 µl Neutralisationspuffer (1 M TRIS, pH 8,0; 1/5 des Elutionsvolumens) vorgelegt. Um herauszufinden, in welchen Fraktionen sich die Konstrukte befanden, wurde zur späteren Anfertigung einer Fraktions-SDS-PAGE aus jeder Fraktion 20 µl entnommen. Anschließend wurden die Fraktionen einzeln in Dialyseschläuche (Visking, Cellulose Typ 27/32 inch, Roth) überführt und gegen 2 l 1xPBS 3-mal für je 24 h dialysiert. Dann wurden die Proteinlösungen steril filtriert (Sterilfilter 0,2 µm, Acrodisc 13mm Syringe, PALL) und bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.3.2 SDS-PAGE

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Benutzt wurden nach Standardmethoden gegossene Gele mit 10 % Acrylamid-Anteil (vgl. Tabelle 4) bzw. 4-14 % Gradienten-Gele (*Mini-Protean-TGX, Precast Gels, 4-14 %, 10 wells, 30 µl/well, BioRad*). Zur Vorbereitung wurden 1-2 µg Protein in Lösung im Verhältnis 1:5 mit nicht-reduzierendem oder reduzierendem 5x Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Reduzierender, Dithiothreitol enthaltender Ladepuffer spaltet Disulfidbrücken, wodurch Antikörperketten bei der SDS-PAGE einzeln aufgetrennt werden. Anschließend wurden die Proteinproben in die Kammern des Gels gegeben. Zum Vergleich wurde ein Standard, (*Precision Plus Protein™ Standard Dual Color, Bio-Rad*) bestehend aus Proteinen definierter molekularer Masse, mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in SDS-PAGE Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS w/v) bei 120 V für ca. 70 min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für Western-Blot-Experimente genutzt oder für 16 h in Coomassie-Färbelösung (60 ml H₂O, 20 ml Methanol, 20 ml 5xRoti Blue) gefärbt und 3-8 h in vollentsalztem Wasser entfärbt.

Um die Konzentration der exprimierten Proteine zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Volumina der Proteine (4-20 µl) und eine Konzentrationsreihe des Antikörpers Rituximab (0,5-4 µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Durch den Vergleich der bekannten Proteinmengen von Rituximab mit den auf das Gel aufgetragenen Proteinmengen der exprimierten Fusionsproteine wurde die Proteinmenge bestimmt. Anhand der bekannten Auftragsvolumina ließ sich daraus die Konzentration der exprimierten Fusionsproteine berechnen.

$$\text{Konzentration } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}]}{\text{Volumen } [\text{ml}]}$$

3.3.3 Ankonzentration der Proteine

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu erhöhen, wurden Ultrafiltrationssäulen (Vivaspin, Sartorius) nach Herstellerangaben genutzt.

3.3.4 Western-Transfer-Experimente und Immundetektion

Beim Western-Transfer-Experiment werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Spezifische Antikörper binden einzelne Epitope des zu analysierenden Proteins auf der Membran. Mittels Immunkonjugaten, beispielsweise HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper, kann das vom Primärantikörper gebundene Protein in der entsprechenden Bande nachgewiesen werden, indem das lumineszierende Produkt der von HRP katalysierten Reaktion detektiert wird.

Die wie oben beschrieben (vgl. 3.3.2) angefertigten SDS-Gele wurden in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20 % v/v Methanol, pH 8,3) gelegt. Die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde 60 s in Methanol aktiviert, dann mit H₂O gespült und anschließend ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde unter Zuhilfenahme von Transferpuffer-getränktem Filterpapier mit der *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) bei 15 V für 1 h durchgeführt. Anschließend erfolgte die Blockierung der verbliebenen freien Stellen für eine Proteinbindung auf der Membran mit Magermilchpulver und der in Tabelle 14 genannten Puffern. Die schwere Kette des IgG wurde mittels HRP-gekoppeltem Anti-humanem IgG (Ziege, polyklonal, Sigma-Aldrich) detektiert. Für die leichten Ketten wurde ein Anti-humaner Kappa leichte Kette (Maus, monoklonal, Sigma-Aldrich) Antikörper genutzt, welcher wiederum mit einem HRP-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (Ziege, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) detektiert wurde. Humanes TRAIL wurde durch den Anti-TRAIL Antikörper (Kaninchen, polyklonal, Sigma-Aldrich) gebunden, welcher dann mittels HRP-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) detektiert werden konnte. Zur Detektion der Lumineszenz wurde eine *Universal Hood II ChemiDoc XRS Western Blot* Dokumentationskammer (Bio-Rad) verwendet.

Tabelle 14: Western Blot Protokoll

	Nachweis der leichten Ketten	Nachweis der schweren Ketten	Nachweis des humanen TRAIL
Blockierung (16 h, 4 °C bzw. 1 h, Raumtemperatur)	1xTBS (Tris-gepufferte Salzlösung) + 0,1 % Tween + 5 % Magermilchpulver	1xTBS + 5 % Magermilchpulver	1xTBS + 5 % Magermilchpulver

	Nachweis der leichten Ketten	Nachweis der schweren Ketten	Nachweis des humanen TRAIL
Primärantikörper (16 h, 4 °C bzw. 1 h, Raumtemperatur)	α-humane Kappa leichte Kette, Maus (Sigma-Aldrich) 1:10.000 in Block-Puffer	α-humaner IgG-HRP (Sigma-Aldrich) 1:5000 in Block-Puffer	Anti-Trail Antikörper (Kaninchen, polyklonal, Sigma-Aldrich) 1:1.000 in Block-Puffer
Waschen: 3 x 5-10 min bei Raumtemperatur	1xTBS + 0,1 % Tween	1xTBS + 0,1 % Tween	1xTBS + 0,1 % Tween
Sekundärantikörper: (16 h, 4 °C bzw. 1 h, Raumtemperatur)	α-Maus-HRP (Ziege, HRP gekoppelt, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:5.000 in 1xTBS + 0,1 % Tween	-	α-Kaninchen-HRP (Ziege, HRP gekoppelt, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:5.000 in 1xTBS + 0,1 % Tween
Waschen: 3 x 5-10 min bei Raumtemperatur	1xTBS + 0,1 % Tween	-	1xTBS + 0,1 % Tween
Detektion	<i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</i> (thermo Scientific) nach Herstellerangaben, 1 min Inkubation		

Um zelluläre Proteine nachzuweisen wurden 25-50 µg Protein aus Zelllysaten (s. 3.2.4) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Transfer auf die PVDF-Membran wurde eine *Wet-Blot*-Kammer bei 100 V und 4 °C für 2 h verwendet. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur für 60 min in TBS mit 5 % BSA blockiert. Der entsprechende Primärantikörper (vgl. 2.11) wurde für 16 h bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert und die Membran anschließend dreimal mit TBST-Puffer (1xTBS + 0,1 % Tween) gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden Spezies-spezifische HRP-gekoppelte Antikörpern verwendet, die in 5 % BSA bei Raumtemperatur eine h inkubiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion der Proteinbanden wie oben beschrieben.

3.3.5 Proteinchromatographie

Durch Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*; SEC) können Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt und Informationen über deren Aggregation gewonnen werden (Porath & Flodin, 1959). Die Poren des porösen Gels, der stationären Phase, sind für Moleküle verschiedener Größe unterschiedlich zugänglich. Hierbei werden sehr große Moleküle ohne Verzögerung mit der mobilen Phase (1xPBS) durch die Säule transportiert, wohingegen kleine Moleküle in die Poren des Gels diffundieren und mehr Strecke in mehr Zeit zurücklegen.

Die mobile Phase wurde in Fraktionen aufgefangen und die UV-Absorption bestimmt, welche mit der Proteinkonzentration korreliert. In einem Diagramm wurde das Elutionsvolumen gegen die UV-Absorption aufgetragen. Die Fraktionen desselben Peaks wurden zusammen aufkonzentriert. So wurde das Protein gewünschter Größe von anderen getrennt. Es wurde das *ÄKTAprime liquid*

chromatography system (GE Healthcare), zusammen mit der HiLoad 26/200 Superdex™ 200pg Säule (GE Healthcare) verwendet.

3.4 Durchflussszytometrie

Im Durchflussszytometer passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Durch das dabei entstehende Streulicht können sie auf ihre Größe (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) untersucht werden. Zusätzlich lassen sich Zellen zum Beispiel durch Fluoreszenzfarbstoffe oder an mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern färben und durch das entstehende Fluoreszenzsignal bestimmte Eigenschaften analysieren.

3.4.1 Analyse der Bindung von Antikörpern und Immunkonstrukten

$0,5 \times 10^6$ Zellen pro Probe wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (10.000 rpm, 30 s, Raumtemperatur) und der Überstand abgesaugt. Durch Resuspendieren in 1 ml PBA (1×PBS, 1 % BSA, 0,05 % Natriumazid), erneutes abzentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen einmal gewaschen. Das Pellet wurde in 30 µl Lösung des primären Antikörpers, welcher an ein Antigen auf der Zelloberfläche bindet, mit einer Konzentration von 0.333 µM aufgenommen und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal wie oben beschrieben in PBA gewaschen. Das Zellpellet wurde in 30 µl Lösung des 1:20 mit PBA verdünnten, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-gekoppelten sekundären Antikörpers (α-human IgG Fc-FITC, Ziege, polyklonal, FITC-konjugiertes Fab-Fragment, Jackson Immuno Research) aufgenommen, welcher am Fc-Teil des primären Antikörpers bindet, und 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem 2-maligem waschen wurden die Zellen in 500 µl PBA aufgenommen und die Fluoreszenzintensität im Durchflussszytometer (Epics/Navios 10/3, Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) bei 520 nm Wellenlänge (Emissionsmaximum von FITC) gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einer IgG-Isotypkontrolle bzw. ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzspektren erfolgte mit der KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter).

3.4.2 Annexin V- Allophycocyanin (APC)/ Propidiumiodid (PI)-Färbung als Apoptose-Assay

Annexin V bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen von der inneren auf die äußere Zellmembran verlagert wird. Durch Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs APC an AnnexinV lassen sich so apoptotische Zellen anfärben. PI dringt durch die defekte Basalmembran in spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen ein und interkaliert dort in genomische DNA. Durch Kombination der beiden Färbetechniken lassen sich frühapoptotische Zellen als Annexin V-positive, PI-negative Zellen identifizieren.

2×10^5 Zellen wurden für 24 h mit 0,5 nM der Fusionsproteine inkubiert und anschließend mit dem AnnexinV-APC/PI Kit (*APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI*, BioLegend) nach Herstellerangaben gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in 0,5 ml kaltem PBS gewaschen und in 50 μ l Annexin-Bindepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit 2,5 μ l APC-gekoppeltem AnnexinV und 5 μ l PI-Lösung 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere 200 μ l Annexin-Bindepuffer wurde zugegeben und die Proben wurden im Durchflusszytometer bei 617 nm (Emissionsmaximum von PI) bzw. bei 660 nm (Emissionsmaximum von APC) gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde die *FlowJo Software* Version 10.7.1 verwendet.

3.5 Graphische und statistische Analysen

Die graphische und statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, USA) und Microsoft Excel 2013. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen wurden mittels zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur (Wachstumsinhibitionsversuche) bzw. mittels einfaktorieller Varianzanalyse und zweiseitigem, ungepaartem Tukey-Post-Test (Blockadeexperimente) bestimmt. Eine Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Fusionsprotein aus einem CD19-gerichteten IgG1-Antikörper und TRAIL hergestellt und biochemisch charakterisiert werden und über Bindung an CD19 auf B-ALL-Zellen TRAIL-Rs kreuzvernetzen und Zelltod induzieren. Als CD19-IgG1-Antikörper, welcher TRAIL zu malignen B-Zellen liefert, wurde ein IgG1 unter Verwendung der variablen Domänen des CD19 Antikörpers Tafasitamab (MOR208) gewählt (Horton et al., 2008; Kellner et al., 2013). Die entsprechenden kodierenden Sequenzen der leichten und schweren Kette des CD19-IgG1 wurden anhand publizierter Sequenzen über die *de novo* Synthese generiert und lagen zu Beginn der Arbeit bereits im Labor vor (Amersdorffer et al., 2012). TRAIL sollte über eine Peptid-Verbindungssequenz (*linker*) an den C-Terminus der schweren Ketten des CD19-IgG1 fusioniert werden. Da TRAIL als Homotrimer biologisch aktiv ist, wurde eine Einzelketten-Variante aus TRAIL-Untereinheiten (*single chain* TRAIL, scTRAIL) verwendet, um eine höhere Wirksamkeit zu erzielen. Zur Herstellung von scTRAIL wurden drei extrazelluläre Domänen von TRAIL (Aminosäuren 95-281) über zwei Peptid-*linker* aus vier Wiederholungen der Sequenz GGGG kovalent verknüpft (Schneider et al., 2010).

In Vorversuchen wurde ein homodimeres Fusionsprotein aus einem CD19-IgG1 und scTRAIL kloniert und exprimiert (CD19-scTRAIL₂, vgl. Abbildung 8 A), welches am C-Terminus der beiden identischen schwerer Ketten eine scTRAIL-Domäne trug. Somit verfügte das Molekül über zwei Antigen-bindende Domänen und sechs aktive TRAIL-Untereinheiten. Dieses hexavalente TRAIL-Fusionsprotein zeigte potente zytotoxische Effekte gegenüber den B-ALL-Zelllinien NALM-6 und REH, allerdings waren diese nicht abhängig von der Expression des Zielantigens auf der Tumorzelloberfläche (Daten nicht gezeigt). So führte auch die Inkubation mit einem analogen, gegen HER2 gerichteten Kontrollprotein (HER2-scTRAIL₂) in Proliferationsinhibitionsversuchen zu einer mit CD19-scTRAIL₂ vergleichbaren antiproliferativen Wirkung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die antigenunabhängigen Effekte reduziert werden könnten, indem die Anzahl der TRAIL-Domänen pro Antikörper verringert wird. Um ein CD19-scTRAIL-Fusionsprotein zu entwickeln, welches antigenspezifisch den Zelltod der Zielzellen herbeiführt, sollte nun ein heterodimeres Fusionsprotein aus einem CD19-IgG1 und scTRAIL hergestellt und untersucht werden, welches nur an einer der schweren Ketten eine scTRAIL-Domäne trug und damit drei aktive TRAIL-Untereinheiten pro Molekül aufwies (vgl. Abbildung 8 B).

Zunächst wurden für das Fusionsprotein kodierende Expressionsvektoren kloniert. Um nach Expression die Zusammenlagerung der ungleichen schweren Ketten zu einem Heterodimer zu begünstigen, wurden Mutationen der Sequenz der CH3-Domänen verwendet, welche durch Austausch von Aminosäuren die Ladung und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den schweren Ketten veränderten (Gunasekaran et al., 2010). In der schweren Kette, welche kein scTRAIL trug (Derivat1; Der1), wurden Glutaminsäure (E) an Position 356 und Asparaginsäure (D) an Position 399 gegen Lysine (K) ausgetauscht. In der scTRAIL-tragenden schweren Kette (Derivat2; Der2) wurden

zwei Lysine (K) an Position 392 und 409 durch Asparaginsäure (D) ersetzt. An das 3'-Ende der für Der2 kodierenden Sequenz wurden die für den Peptid-*linker* und scTRAIL kodierenden Sequenzen angefügt.

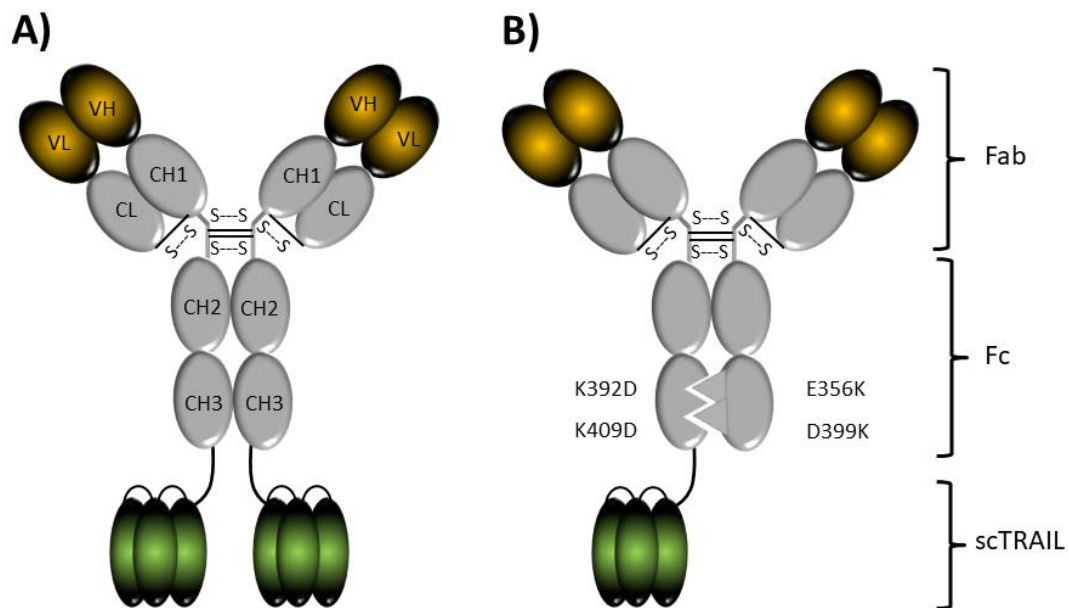


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Antikörper-scTRAIL-Fusionsproteine. (A) Homodimeres Fusionsprotein CD19-scTRAIL₂, welches scTRAIL am C-Terminus beider schwerer Ketten trägt. (B) Heterodimeres Fusionsprotein CD19-scTRAIL, bestehend aus einer schweren Kette mit zwei ausgetauschten Aminosäuren in der CH3-Domäne (K392D und K409D) und scTRAIL am C-terminalen Ende sowie einer schweren Kette ohne scTRAIL mit zwei ausgetauschten Aminosäuren (E356K und D399K) in der CH3-Domäne. VL: Variable Region der leichten Kette. CL: Konstante Region der leichten Kette. VH: Variable Region der schweren Kette. CH: Konstante Region der schweren Kette. Fab: Antigen-bindendes Fragment. Fc: Kristallisierbares Fragment. S---S: Disulfidbrücken. scTRAIL: *single chain* TRAIL.

Um in späteren Versuchen durch ein geeignetes Kontrollprotein die Antigenabhängigkeit von Effekten zu überprüfen, wurden das gegen das Oberflächenantigen HER2 gerichtet Fusionsprotein HER2-scTRAIL analog hergestellt und bei den durchgeführten Versuchen als Kontrolle vergleichend mitgeführt.

4.1 Herstellung der Expressionsvektoren für Antikörper-TRAIL-Fusionsproteine

4.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren für CD19-scTRAIL

Die kodierenden Sequenzen für die beiden schweren Kettenuntereinheiten des heterodimeren Fusionsproteins wurden separat in zwei eukaryotische Expressionsvektoren, jeweils Derivate des Vektors pSecTag2/Hygro, kloniert. In diesen steht die Expressionskassette unter Hierarchie des CMV-Promotors. Zur Herstellung des Vektors für die scTRAIL-freie schwere Ketten-Untereinheit (pSEC-CD19-

HC-Der1) wurde die DNA-Sequenz der VH-Domäne des CD19-Antikörpers in den Vektor pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 ligiert. Dieser kodierte für einen IgG1-Antikörper mit modifizierter Fc Domäne (Aminosäuresubstitutionen E356K und D399K; Abbildung 9). Dafür wurden das Akzeptorplasmid pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 sowie das Donorplasmid pSEC-HC-CD19-VH-wt, welches für die schwere Kette des CD19-Antikörpers MOR208 inklusive des Sekretionssignalpeptids kodierte, mit den Restriktionsenzymen NheI und PpuMI verdaut. Nach Reinigung wurden die verdauten Restriktions-Fragmente des Akzeptorplasmids pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 und des für die CD19-VH-Region kodierenden Inserts ligiert, wodurch der Expressionsvektor pSec-HC-CD19-Der1 entstand. In diesem war nun die ursprünglich im Akzeptorplasmid vorhandene VH-Sequenz und das Sekretionssignalpeptid gegen die entsprechenden Sequenzen des CD19 Antikörpers ausgetauscht. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde ein Kontrollverdau mit den Endonukleasen NheI und KpnI durchgeführt, wobei nur die Sequenz der VH-Domäne des CD19-Antikörpers eine KpnI-Restriktionsstelle aufwies. Bei erfolgreicher Klonierung entstanden DNA-Fragmente der Größen von ca. 5500 Basenpaaren (Bp) und 380 Bp (vgl. Abbildung 10 A). Das Vorhandensein der Sequenz der schweren Kette Der1 des heterodimeren Antikörpers konnte in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden, wenn durch Restiktionsverdau mit NheI und NotI ein ca. 1420 Bp großes Fragment entstand (vgl. Abbildung 10 B).

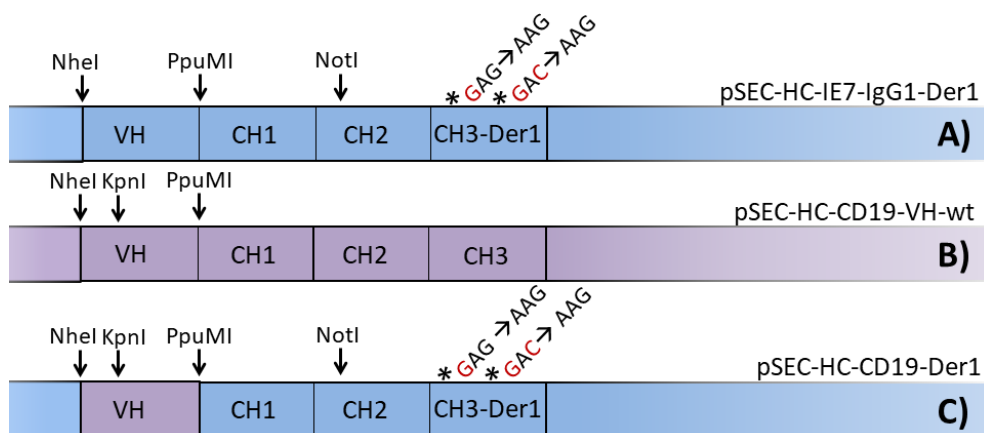


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die schwere Ketten-Untereinheit ohne scTRAIL des heterodimeren CD19-scTRAIL (pSEC-HC-CD19-Der1). A) Akzeptorplasmid pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1. B) Donorplasmid pSEC-HC-CD19-VH-wt. C) Expressionsvektor pSEC-HC-CD19-Der1. Restriktionsstellen sind durch Pfeile markiert. VH: variable Region der schweren Kette, CH: konstante Region der schweren Kette. *: Mutationen für die Aminosäuresubstitutionen E356K und D399K, beschriftet mit der Änderung der DNA-Sequenz.

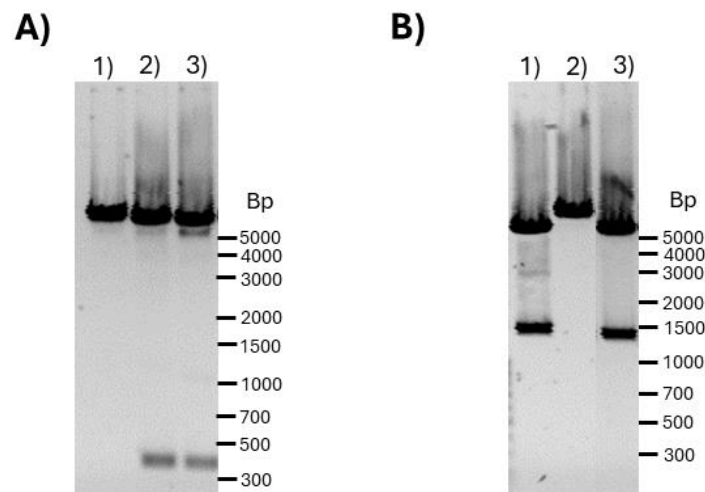


Abbildung 10: Restriktionsanalyse des klonierten, für die schwere Kette ohne scTRAIL des Fusionsproteins CD19-scTRAIL kodierenden Expressionsvektors pSEC-HC-CD19-Der1. Das Akzeptorplasmid pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 (Spur 1) sowie das Donorplasmid pSEC-HC-CD19-VH-wt (Spur 2) und der Expressionsvektor pSEC-HC-CD19-Der1 (Spur 3) wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und auf die Agarose-Gele aufgetragen. A) Analyse nach Restriktionsverdau mit KpnI und NheI. Das durch den Verdau entstandene Restriktionsmuster entsprach dem nach erfolgreicher Ligation erwarteten Muster mit einem 355 Basenpaar (Bp)-Fragment, welches die Sequenz der VH-Domäne des CD19-Antikörpers im Expressionsvektor pSEC-HC-CD19-Der1 nachwies. B) Analyse nach Restriktion mit NotI und NheI. Es zeigte sich das nach erfolgreicher Ligation erwartete Restriktionsmuster mit einem 1420 Bp-Fragment, welches die Sequenz der schweren Kette Der1 (Aminosäuresubstitutionen E356K und D399K) des heterodimeren Antikörpers im Expressionsvektor pSEC-HC-CD19-Der1 nachwies.

Zur Klonierung des Expressionsvektors der scTRAIL-tragenden schweren Ketten-Untereinheit (pSec-HC-CD19-Der2-scTRAIL) des heterodimeren Antikörpers wurde als Akzeptor-Plasmid das bereits zuvor durch Mitglieder der Arbeitsgruppe klonierte Plasmid pSec-HC-CD19-scTRAIL verwendet, welches für die native schwere Kette des CD19 Antikörpers und folgendem scTRAIL codierte (Abbildung 11). In diesem wurden nun die Modifikationen der Fc-Domäne zur Begünstigung der Heterodimerisierung eingeführt. Dazu diente ein in Auftragssynthese hergestelltes Plasmid (pMA-RQ-CH3-Der2-scTRAIL) mit der Sequenz für die Mutationen-tragende CH3-Region des Heterodimer-bildenden Antikörpers (Der 2, Aminosäuresubstitutionen K392D und K409D) sowie für einen Teil des scTRAIL als Donor des *Inserts*. Beide Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen BsrGI und SfoI verdaut. Durch Ligation des Akzeptorplasmids und des *Inserts* entstand der Expressionsvektor pSec-HC-CD19-Der2-scTRAIL. Eine Überprüfung der Klonierung durch Restriktionsverdau war nicht möglich, da sich das Donorplasmid und der klonierte Expressionsvektor lediglich in vier Basenpaaren unterschieden und

dadurch keine neuen Schnittstellen für Restriktionsenzyme entstanden. Durch Sequenzierung wurde die erfolgreiche Klonierung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

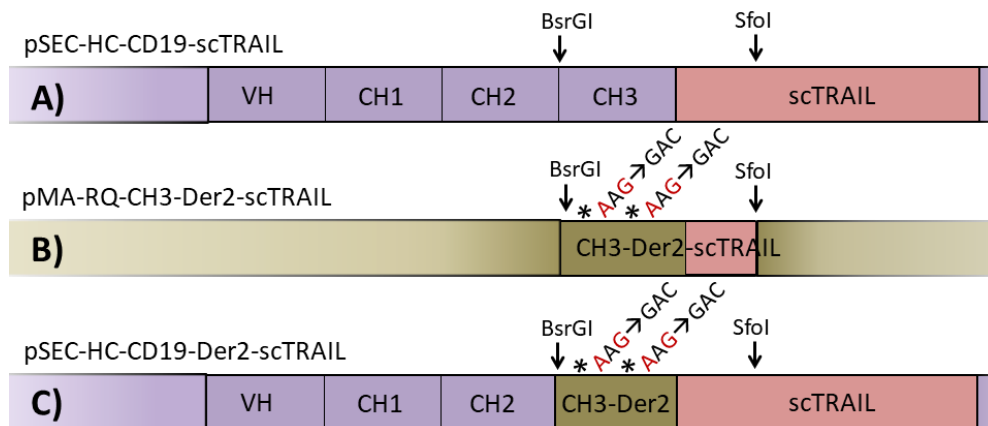


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die scTRAIL-tragende schwere Ketten-Untereinheit des heterodimeren CD19-scTRAIL (pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL).

A) Akzeptorplasmid pSEC-HC-CD19-scTRAIL. B) Donorplasmid pMA-RQ-CH3-Der2-scTRAIL. C) Expressionsvektor pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL. Restriktionsstellen sind durch Pfeile markiert. VH: variable Region der schweren Kette, CH: konstante Region der schweren Kette. *: Mutationen für die Aminosäuresubstitutionen K392D und K409D, beschriftet mit der Änderung der DNA-Sequenz.

4.1.2 Klonierung der Expressionsvektoren für HER2-scTRAIL

Der Expressionsvektor der TRAIL-freien schweren Ketten-Untereinheit des heterodimeren Antikörpers HER2-scTRAIL wurde analog zu CD19-scTRAIL kloniert. Hierzu wurde die für die VH-Domäne kodierende Sequenz des Heterodimer-bildenden Antikörpers im Akzeptorplasmid pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 ersetzt durch die Sequenz, die für den VH-Teil des HER2-Antikörpers inklusive des Sekretionssignalpeptids kodierte (Abbildung 12). Es wurden die Restriktionsendonukleasen NheI und PpuMI genutzt. Nach Ligation entstand der Expressionsvektor pSec-HC-HER2-Der1. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde ein Kontrollverdau mit den Endonukleasen NheI und XbaI durchgeführt. Nach erfolgreicher Ligation konnte die Sequenz des VH-Teils des HER2-Antikörpers im Expressionsvektor nachgewiesen werden, indem DNA-Fragmente von ca. 7200 Bp und 355 Bp entstanden (vgl. Abbildung 14 A). Analog zu pSec-HC-CD19-Der1 konnte die Sequenz der schweren Kette Der1 im Expressionsvektor pSec-HC-HER2-Der1 nachgewiesen werden, da durch Restriktionsverdau mit NheI und NotI ein ca. 1420 Bp großes Fragment entstand (vgl. Abbildung 14 B).

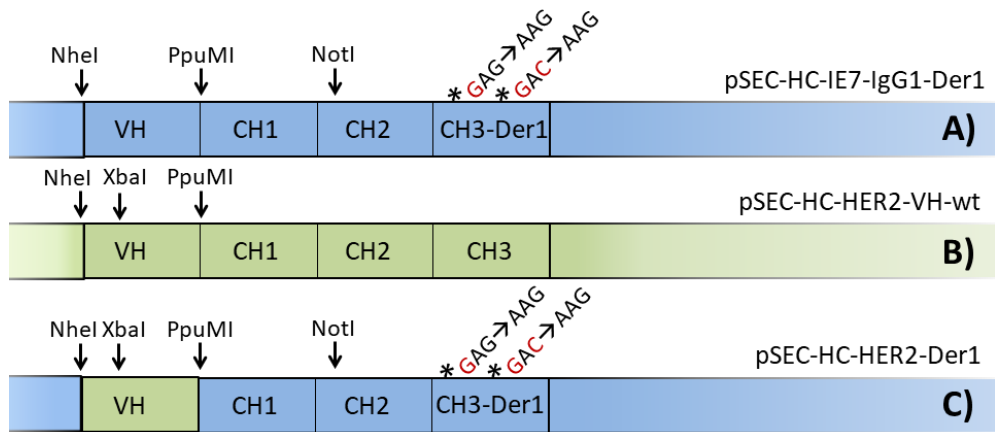


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die schwere Ketten-Untereinheit ohne scTRAIL des heterodimeren HER2-scTRAIL (pSEC-HC-HER2-Der1). A) Akzeptorplasmid pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1. B) Donorplasmid pSEC-HC-HER2-VH-wt. C) Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der1. Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch Pfeile markiert. VH: variable Region der schweren Kette, CH: konstante Region der schweren Kette. *: Mutationen für die Aminosäuresubstitutionen E356K und D399K, beschriftet mit der Änderung der DNA-Sequenz.

Zur Klonierung des Expressionsvektors der scTRAIL-tragenden schweren Ketten-Untereinheit von HER2-scTRAIL wurde die Sequenz der VH-Domäne des CD19-Antikörpers im zuvor klonierten Expressionsvektor für die schwere Kette mit scTRAIL des CD19-scTRAIL Fusionsproteins (pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL) durch die Sequenz der VH-Domäne des HER2-Antikörpers inklusive des Sekretionssignalpeptids ersetzt (Abbildung 13). Hierzu wurden beide Plasmide mit NheI und PpuMI geschnitten. Durch Ligation der entsprechenden Fragmente entstand der Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL. Durch den Kontrollverdau mit NheI und XbaI entstanden DNA-Fragmente von ca. 8370 Bp und 355 Bp (vgl. Abbildung 14 C). Dies entsprach dem erwarteten Restriktionsmuster bei erfolgreicher Ligation.

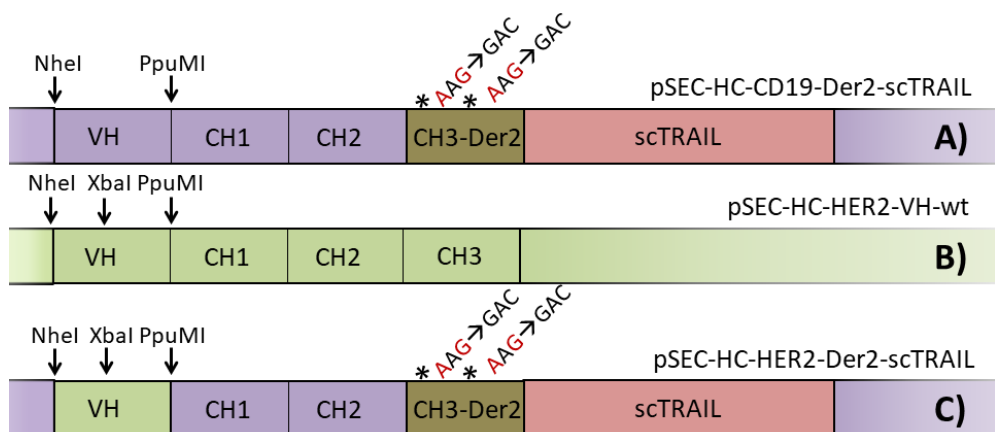


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die scTRAIL-tragende schwere Kette des heterodimeren HER2-scTRAIL (pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL). A) Akzeptorplasmid pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL. B) Donorplasmid pSEC-HC-HER2-VH-wt. C) Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL. Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch Pfeile markiert. VH: variable Region der schweren Kette, CH: konstante Region der schweren Kette. *: Mutationen für die Aminosäuresubstitutionen K392D und K409D, beschriftet mit der Änderung der DNA-Sequenz.

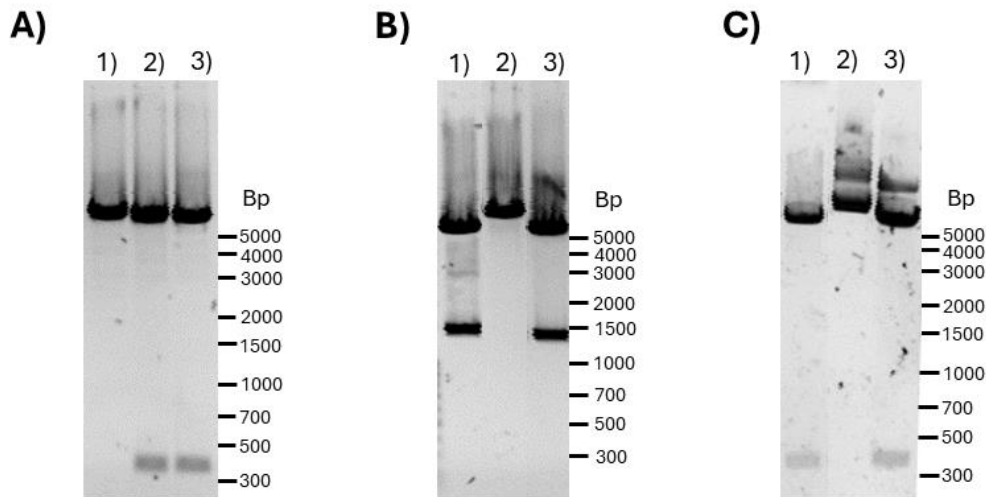


Abbildung 14: Restriktionsanalyse der klonierten, für die schweren Ketten des heterodimeren Fusionsproteins HER2-scTRAIL kodierenden Expressionsvektoren. Die Expressionsvektoren sowie die Donor- und Akzeptorplasmids wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und auf die Agarose-Gele aufgetragen. A) und B): Analyse des Akzeptorplasmids pSEC-HC-IE7-IgG1-Der1 (Spur 1), des Donorplasmids pSEC-HC-HER2-VH-wt (Spur 2) sowie des neu generierten Expressionsvektors pSEC-HC-HER2-Der1 (Spur 3), welcher für die TRAIL-freie schwere Ketten-Untereinheit von HER2-scTRAIL kodierte, durch Restriktion und anschließende Gelelektrophorese. A) Analyse nach Restriktion mit NheI und XbaI. Das durch den Verdau entstandene Restriktionsmuster entsprach dem nach erfolgreicher Ligation erwarteten Muster mit einem 355 Basenpaar (Bp)-Fragment, welches die Sequenz der VH-Domäne des HER2-Antikörpers im Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der1 nachwies. B) Analyse nach Restriktion mit NheI und NotI. Es zeigte sich das nach erfolgreicher Ligation erwartete Restriktionsmuster mit einem 1420 Bp-Fragment, welches die Sequenz der schweren Kette Der1 (Aminosäuresubstitutionen E356K und D399K) des heterodimeren Antikörpers im Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der1 nachwies. C) Analyse des Donorplasmids pSEC-HC-HER2-VH-wt (Spur 1), des Akzeptorplasmids pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL (Spur 2) sowie des neu generierten Expressionsvektors pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL (Spur 3), welcher für die scTRAIL-tragende schwere Ketten-Untereinheit von HER2-scTRAIL kodiert, durch Restriktion mit NheI und XbaI und anschließende Gelelektrophorese. Nachweis der Sequenz der VH-Domäne des HER2-Antikörpers im Expressionsvektor pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL durch das Restriktionsmuster mit einem Fragment von 355 Bp.

Vor der Expression wurden die für die verschiedenen Untereinheiten der neuen CD19- oder HER2-gerichteten Immunkonstrukte kodierenden Sequenzen in den klonierten Plasmiden mittels Sanger-Sequenzierung im Institut für Klinische Molekularbiologie Kiel bestimmt und ihre Richtigkeit nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

4.2 Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung

Die heterodimeren Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL wurden in Lenti-X 293T Zellen mittels transients Calcium-Phosphat-Transfektion exprimiert. Hierfür wurden die Lenti-X 293T Zellen mit den jeweiligen Expressionsvektoren der heterologen schweren Ketten, mit bzw. ohne scTRAIL, und der entsprechenden leichten Ketten, welche bereits im Labor vorlagen, ko-transfiziert. Entsprechend

der drei Expressionsvektoren wurden je Konstrukt drei unterschiedlicher Proteinuntereinheiten exprimiert: die scTRAIL-tragende schwere Kette des Fusionsproteins mit einer molaren Masse von ca. 112 kDa, die scTRAIL-freie schwere Kette mit einer molaren Masse von ca. 50 kDa und die entsprechende leichte Kette von ca. 25 kDa (vgl. Konstruktionsschema Abbildung 8). Dementsprechend wurden bei der Analyse der exprimierten, heterodimeren Fusionsproteine unter reduzierenden Bedingungen in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen drei Banden unterschiedlicher Größe erwartet.

Die erste Transfektion zur Herstellung des CD19-scTRAIL Proteins wurde mit gleichen Teilen Plasmid-DNA für leichte Kette, schwere Kette ohne scTRAIL und schwere Kette mit scTRAIL durchgeführt. Sie erbrachte in der SDS-PAGE (nicht gezeigt) erkennbar unausgeglichene Proteinmengen der einzelnen Untereinheiten, wobei die Menge der scTRAIL-tragenden schweren Kette im Vergleich zur schweren Kette ohne scTRAIL deutlich zu gering erschien. Um die gewünschte heterodimere Zusammenlagerung der schweren Ketten zu erleichtern, sollte eine äquimolare Konzentration der einzelnen Ketten angestrebt werden. Deshalb wurde die Transfektion mit veränderten Plasmid-Verhältnissen wiederholt, mit dem Ziel, dadurch ein günstigeres Verhältnis zwischen den einzelnen Ketten zu erreichen. Der Anteil an Plasmid-DNA des für die leichte Kette kodierenden Vektors blieb unverändert bei 33,3 % der insgesamt eingesetzten DNA-Menge. Der Anteil der schweren Kette ohne scTRAIL wurde auf 13,3 % verringert, wohingegen der Anteil der scTRAIL tragenden schweren Kette auf 53,3 % der Plasmid-DNA-Menge erhöht wurde. Die Analyse der exprimierten Proteine in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen zeigte, dass dadurch ein ausgewogeneres Verhältnis der einzelnen Untereinheiten erzielt wurde. Im Folgenden wurden lediglich die Fusionsproteine aus der zweiten, angepassten Transfektion gezeigt und verwendet.

Im Anschluss an die Expression wurden die Fusionsproteine affinitätschromatographisch unter Verwendung einer für die humane CH1-Domäne spezifischen Matrix aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Hierbei erfolgte die Elution der Proteine in mehreren Fraktionen von jeweils 1 ml Volumen. Mittels Analyse von Aliquots der einzelnen Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde gezeigt, dass CD19-scTRAIL vor allem in den Fraktionen 1 und 2 ausgewaschen wurde, HER2-scTRAIL hauptsächlich in der zweiten Fraktion (Abbildung 15).

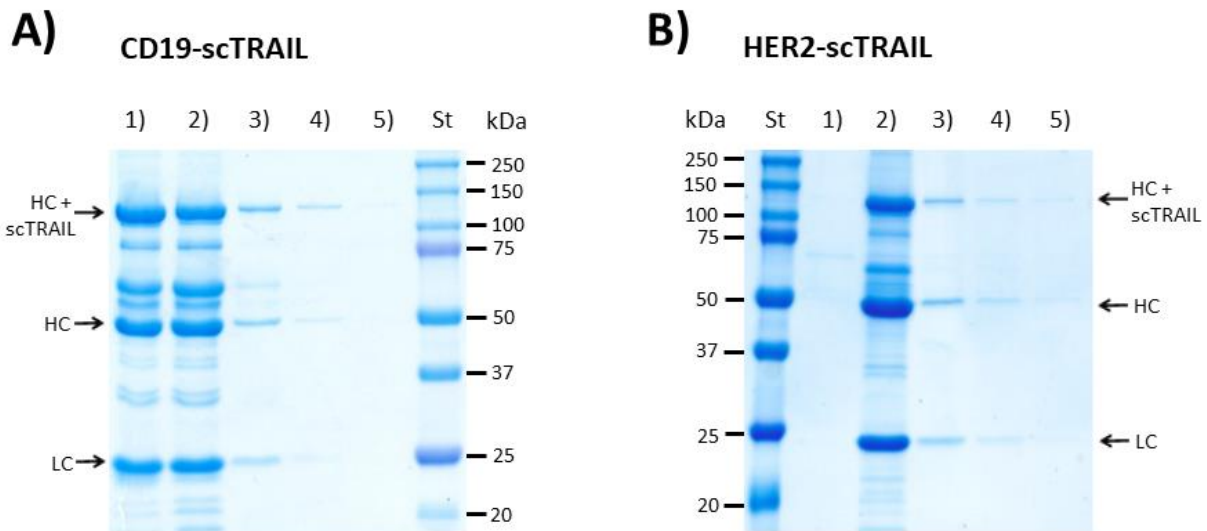


Abbildung 15: Analyse der konsekutiven Elutionsfraktionen der heterodimeren Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL durch SDS-PAGE. A) CD19-scTRAIL und B) HER2-scTRAIL. Je 20 µl der konsekutiven Elutionsfraktionen 1) bis 5) wurden unter Verwendung eines reduzierenden Ladepuffers und 10 %iger Polyacrylamid-Gele mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Untereinheiten der heterologen Antikörperkonstrukte wurden Banden mit einer elektrophoretischen Mobilität von ca. 110 kDa (CD19-HC-Der2-scTrail bzw. HER2-HC-Der2-scTRAIL), 50 kDa (CD19-HC-Der1 bzw. HER2-HC-Der1) und 25 kDa (CD19-LC bzw. HER2-LC) erwartet (mit Pfeilen markiert). St: Größenstandard. HC: schwere Kette. LC: leichte Kette.

Um die Reinigung nach Dialyse mit 1xPBS-Puffer zu überprüfen und die produzierten Proteinmengen abzuschätzen wurden weitere SDS-PAGE-Analysen durchgeführt (Abbildung 16). Bei niedriger Proteinkonzentration wurden die Proben zunächst eingengt. Zum Vergleich wurden unterschiedliche Mengen Rituximab aufgetragen, um die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen diesen gegenüber abzuschätzen.

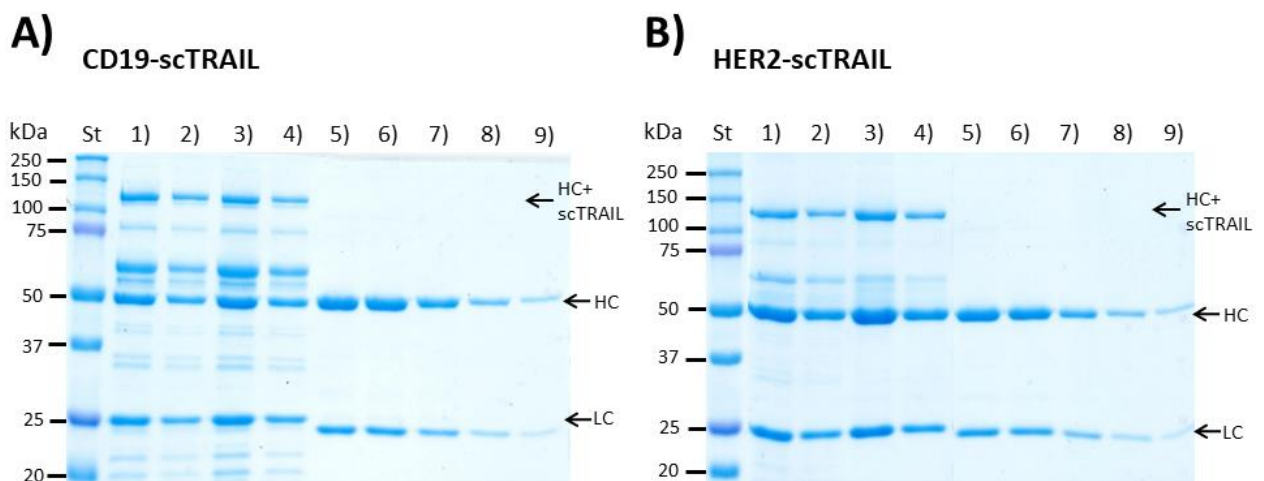
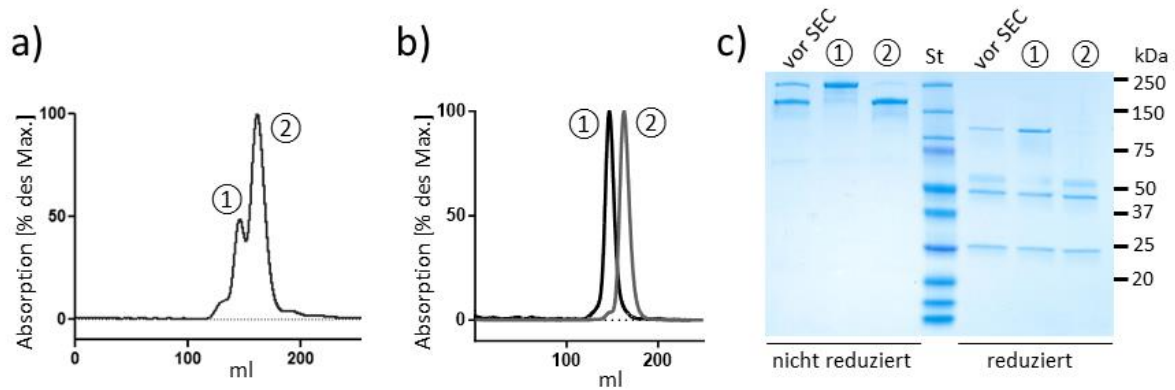


Abbildung 16: Analyse der gereinigten heterodimeren Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL durch SDS-PAGE. Die gereinigten Fusionsproteine wurden unter Verwendung eines reduzierenden Ladepuffers und 10 %iger Polyacrylamid-Gele mittels SDS-PAGE analysiert. A) 1)-4) CD19-scTRAIL: Fraktion 1 mit 12 µl (1) und 6 µl Auftragsvolumen (2) und Fraktion 2 mit 12 µl (3) und 6 µl Auftragsvolumen (4). B) 1)-4) HER2-scTRAIL: Fraktion 2, 12 µl (1) und 6 µl (2) und Fraktion 3 nach Ankonzentration, 12 µl (3) und 6 µl Auftragsvolumen (4). 5)-

9): Zum Vergleich: Rituximab-Verdünnungsreihe (4/ 3/ 2/ 1/ 0,5 µg) zur Konzentrationsbestimmung. Aus dem Vergleich der Proteinmengen wurden die Konzentrationen der Fusionsproteine bestimmt: für CD19-scTRAIL Fraktion 1 280 µg/ml und Fraktion 2 300 µg/ml und für HER2-scTRAIL Fraktion 2 320 µg/ml und Fraktion 3 nach Ankonzentration 360 µg/ml. Die Höhe der erwarteten Banden ist mit Pfeilen markiert. TRAIL-tragende schwere Kette: 112 kDa. Schwere Kette ohne scTRAIL: 50 kDa. Leichte Kette: 25kDa. St: Größenstandard. HC: schwere Kette. LC: leichte Kette.

Wie in den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen unter Verwendung eines reduzierenden Ladepuffers erkennbar (Abbildung 15, Abbildung 16), waren bei der Expression der Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL neben den erwarteten drei Proteinuntereinheiten weitere Proteine unterschiedlicher molarer Masse entstanden, die auf dem Gel als zusätzliche Banden sichtbar wurden. Bei HER2-scTRAIL waren diese zusätzlich sichtbaren Banden, verglichen mit CD19-scTRAIL, schwächer ausgeprägt. Es wurden weitere SDS-PAGE auf Gradienten-Gelen (4-14%) unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abbildung 17 c). Diese bestätigten die Vermutung, dass neben den gewünschten heterodimeren Fusionsproteinen noch weitere Proteine geringerer molarer Masse entstanden waren. Um lediglich die heterodimeren Antikörper-scTRAIL-Konstrukte mit korrekt gepaarten Untereinheiten aus dem Proteingemisch zu erhalten, wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt (Abbildung 17 a und b). Diese zeigte bei beiden heterodimeren Konstrukten CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL zwei Peaks, übereinstimmend mit der Anzahl der sichtbaren Banden in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 17 c). Bei beiden Gelfiltrationen ließ sich ein Peak bei ca. 150 ml Elutionsvolumen erkennen. Die molare Masse des entsprechenden Proteins konnte aufgrund von Restriktionen in der Auflösung der verwendeten Chromatographie-Säule nicht bestimmt werden, lag aber im Vergleich mit einem Größenstandard zwischen 152 kDa und 440 kDa. Dies entsprach dem nach der Proteinsequenz berechneten Molekulargewicht der heterodimeren Fusionsproteine von 212 kDa. Die Elutionsfraktionen, welche das Protein desselben Peaks beinhalteten, wurden gemeinsam eingeeengt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteine des zweiten Peaks mussten aus anderen Kombinationen der unterschiedlichen Ketten bestehen, was sich durch spätere Charakterisierung bestätigte. Auf dem Coomassie-gefärbten Gel (Abbildung 17 c) wurde erkennbar, dass die Proteine unterschiedlicher molekularer Masse, welche vor der Gelfiltration gemischt vorlagen und sich als mehrere Banden darstellen, durch die Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt wurden.

A) CD19-scTRAIL



B) HER2-scTRAIL

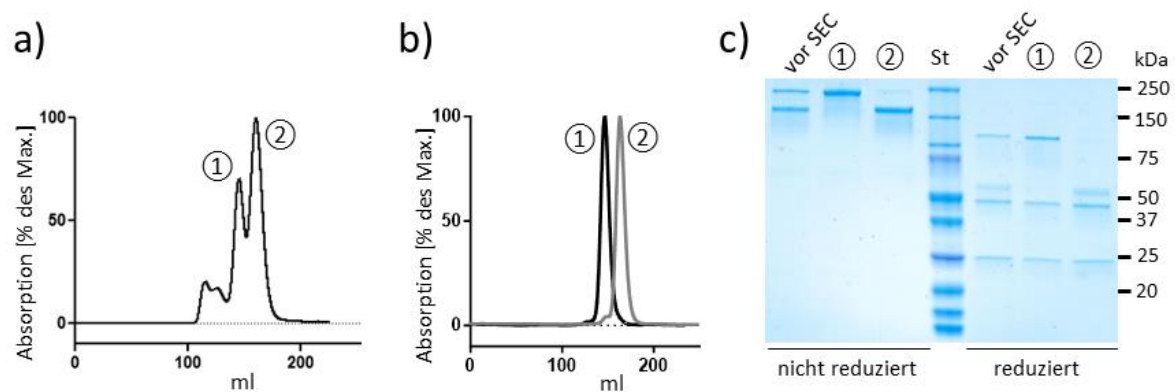


Abbildung 17: Proteinchromatographie und Coomassie-gefärbte SDS-Gele der heterodimeren Konstrukte. A) CD19-scTRAIL. B) HER2-scTRAIL. In den Diagrammen a) und b) aufgetragen ist das Elutionsvolumen der Größenausschlusschromatographie (SEC) in ml (x-Achse) und die relative Absorption in % des Maximums (y-Achse). a) primäre SEC. b) Re-Analyse der Proteinproben aus Fraktionen 1 und 2 nach SEC und Einengung. c) Coomassie-gefärbte SDS-Gele (*Mini-Protean-TGX, Precast Gels, 4-14 %*, BioRad) von je 1 µg der Proteine vor SEC sowie der Proteine aus Fraktionen 1 und 2 nach SEC unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Proteine der Fraktion 1 besaßen eine molare Masse, die der erwarteten molaren Masse der korrekt assemblierten Antikörper-scTRAIL-Konstrukte entsprach. St: Größenstandard.

Die weitere Charakterisierung der Proteine erfolgte mittels Western Blot Experimenten. Hierzu wurden SDS-PAGE Analysen unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt und die aufgetrennten Proteine auf PVDF-Trägermembranen übertragen und mit entsprechenden HRP-gekoppelten Antikörpern detektiert. Die Analyse der Fusionsproteine aus der Fraktion 1 der SEC sowie der parentalen Antikörper CD19-IgG1 bzw. HER2-IgG1 ist in Abbildung 18 dargestellt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 18 A und B) wurde bei den Proteinen der Fraktion 1 der SEC auf Höhe von ca. 212 kDa, entsprechend den korrekt assemblierten scTRAIL-Fusionsproteinen, sowohl humanes TRAIL, als auch schwere humane IgG Ketten und leichte κ -Ketten mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierbei zeigten sich bei CD19-scTRAIL noch leichte Verunreinigungen durch Proteine mit geringerer molarer Masse, die vor allem mit Antikörpern gegen

schwere humane IgG Ketten und leichte κ -Ketten detektiert wurden. Die parentalen Antikörper CD19-IgG1 und HER2-IgG1 wurden auf Höhe von ca. 150 kDa mit spezifischen Antikörpern gegen schwere humane IgG Ketten und leichte κ -Ketten detektiert, nicht jedoch mit Anti-TRAIL-Antikörpern. Unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 18 C und D) wurden die Proteine der Fraktion ① der SEC auf Höhe von ca. 112 kDa, entsprechend der scTRAIL-tragenden schweren Kette, mit spezifischen Antikörpern gegen humanes TRAIL sowie gegen schwere humane IgG-Ketten detektiert. Hierbei zeigte sich bei Detektion der schweren IgG-Kette, insbesondere bei CD19-scTRAIL, nur ein schwaches Signal. Die leichten und TRAIL-freien schweren Ketten der Fusionsproteine verhielten sich in den Western Blot Experimenten wie die Ketten der parentalen IgG1-Antikörper: Auf Höhe von ca. 50 kDa wurden die

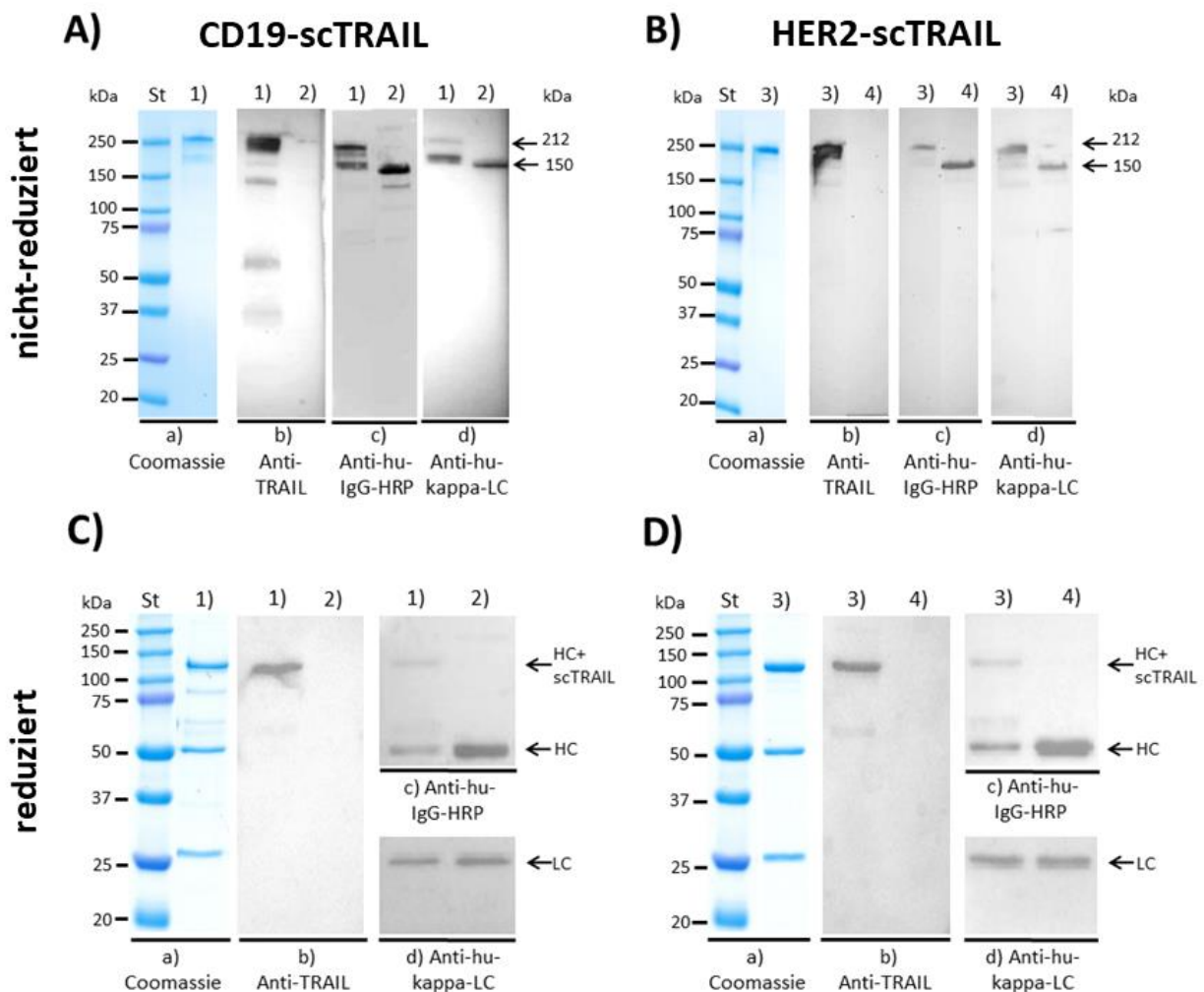


Abbildung 18: SDS-PAGE und Western Blot der Fusionsproteine nach SEC unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen. A) und C): Charakterisierung des Fusionsproteins CD19-scTRAIL (1) im Vergleich zum Antikörper CD19-IgG1 (2). B) und D): Charakterisierung des Fusionsproteins HER2-scTRAIL (3), im Vergleich zu HER2-IgG1 (4). Je 1-2 μ g der Proteine wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf 4-14 %igen Gradienten-Gelen (A und B) bzw. unter reduzierenden Bedingungen auf 10 %igen SDS-Gelen (C und D) in SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (a) oder auf eine PVDF-Membran übertragen (b bis d). Die Detektion im Western Blot erfolgte mit: b) Anti-TRAIL Antikörper (Kaninchen) und HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper (Ziege), c) HRP-gekoppelter Anti-humaner-IgG-Antikörper (Ziege), d) Anti-humaner Kappa leichte Kette Antikörper (Maus) und HRP-gekoppeltem Anti-Maus-Ig-Antikörper (Ziege). Die Höhe der erwarteten Banden ist mit Pfeilen markiert. St: Größenstandart. HC: schwere Kette. LC: leichte Kette.

humanen schweren IgG-Ketten detektiert, entsprechend der scTRAIL-freien schweren Ketten, und auf Höhe von ca. 25 kDa konnten die leichten κ -Ketten nachgewiesen werden. Somit wurde das Vorhandensein aller Komponenten der heterodimeren Fusionsproteine nachgewiesen und die Fusion von scTRAIL an die schwere Kette bestätigt. Die geringen Verunreinigungen von CD19-scTRAIL mit Proteinen geringerer molarer Masse wurde toleriert und auf eine weitere Reinigung der Proteine wurde verzichtet. Diese hier analysierten, in Fraktion ① der SEC enthaltenen Proteine wurden für die folgenden Versuche verwendet.

4.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften

Die Bindungseigenschaften der Fusionsproteine wurden auf zwei CD19-positiven prä-B-ALL-abgeleiteten Zelllinien, NALM-6 und REH, sowie auf CD19-negativen CEM T-ALL-Zellen durchflusszytometrisch getestet. Als Kontrolle wurde die Bindung der parentalen Antikörper ohne scTRAIL, CD19-IgG1 und HER2-IgG1, ebenfalls analysiert. Mit CD19-positiven NALM-6- und REH-Zellen wurde die erwartete Bindung von CD19-scTRAIL und CD19-IgG1 nachgewiesen (Abbildung 19). Auf den CD19-negativen CEM-Zellen zeigte der CD19-IgG1-Antikörper keine Bindung, während CD19-scTRAIL eine Bindung zeigte, wenn auch in deutlich geringerem Maße verglichen mit den CD19-positiven Zelllinien. HER2-IgG1 band an keiner der drei HER2-negativen Zelllinien, während HER2-scTRAIL trotz Abwesenheit des Zielantigens auf allen drei Zelllinien band. Diese CD19- bzw. HER2-unabhängige Bindung lässt sich über eine scTRAIL-vermittelte Bindung der Fusionsproteine an TRAIL-Rs auf der Zelloberfläche erklären.

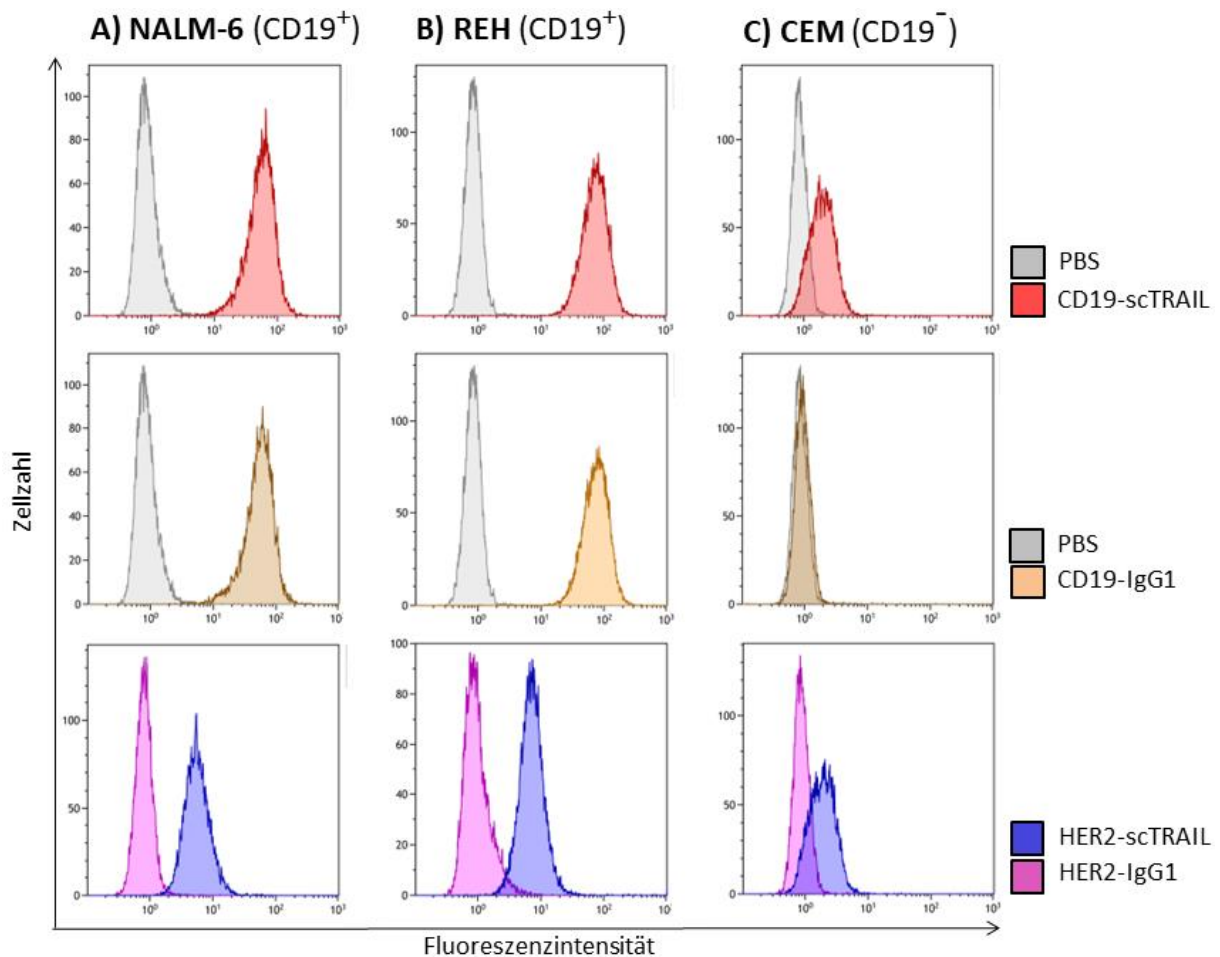


Abbildung 19: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von CD19-scTRAIL auf CD19-positiven B-ALL-Zelllinien. Die Bindung der Fusionsproteine an Zellen wurde mit CD19-positiven NALM-6 (A) und REH B-ALL-Zellen (B) sowie mit CD19-negativen CEM T-ALL-Zellen (C) getestet. Hierzu wurden die verschiedenen Zelllinien 1 h mit 0,333 μ M der unterschiedlichen scTRAIL-Fusionsproteine oder Antikörper inkubiert. Gebundene Antikörper wurden anschließend mit FITC-gekoppelten sekundären Antikörpern gegen die humane Fc-Domäne detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 Versuchen.

4.4 Wachstumsinhibition von B-ALL-Zellen durch CD19-scTRAIL

Mittels MTT-Assays wurden dosis-abhängige antiproliferative Effekte der Antikörper-scTRAIL-Fusionsproteine untersucht. Wie zur Analyse der Bindungseigenschaften wurden die CD19-positiven prä-B-ALL-abgeleiteten Zelllinien NALM-6 und REH verwendet. Als Kontrollzelllinie für eine Zielantigen-unabhängige Wachstumsinhibition wurde die T-ALL Zelllinie CEM gewählt. Für diese wurde bereits gezeigt, dass sie durch ein TRAIL-Fusionsprotein gegen CD7 eliminiert werden können (Bremer et al., 2005). Die Zellen wurden 72 h mit den entsprechenden Proteinen in den angegebenen Konzentrationen zwischen 0,008 nM und 25 nM inkubiert.

Als Ergebnis reduzierte CD19-scTRAIL das Zellwachstum der NALM-6-Zellen um bis zu 75 %, verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 20). EC₅₀-Wert lag für NALM-6-Zellen bei 0,6 nM [95 % Konfidenzintervall (CI): 0,4 nM - 1,1 nM]. Die Proliferation der REH-Zellen wurde um ca. 62 % reduziert.

Der EC₅₀-Wert lag für REH-Zellen bei 1,2 nM [95 % CI: 0,6 nM - 2,7 nM]. In dem hier getesteten Konzentrationsbereich blieb HER2-scTRAIL wirkungslos (Abbildung 20). Erst in sehr hohen Konzentrationen ab 100 nM wurde eine geringe Reduktion der Proliferation beobachtet (nicht gezeigt). Die parentalen Kontrollantikörper CD19-IgG1 und HER2-IgG1 (nicht gezeigt) hatten selbst in höchster Konzentration keinen signifikanten wachstumsinhibierenden Effekt. Die Reduktion der Proliferation lässt sich also nicht auf die alleinige Bindung von CD19-Antikörpern an CD19 auf der Zielzelloberfläche erklären. Auf CD19-negativen CEM-Zellen konnte keines der Fusionsproteine zu einer Reduktion der Proliferation führen. Dies deutet darauf hin, dass die Wachstumsinhibition durch die Fusionsproteine abhängig von den auf der Zelloberfläche exprimierten Zielantigenen ist und die Antikörper-TRAIL Fusionsproteine im hier gewählten Format antigenspezifisch wirken. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass durch CD19-scTRAIL, welches über seine Antikörperbindedomänen an CD19 auf den Zielzellen bindet und somit scTRAIL an die Oberfläche der Zielzellen bringt, bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen eine signifikante Reduktion des Zellwachstums von CD19-positiven B-ALL-Zellen bewirkt.

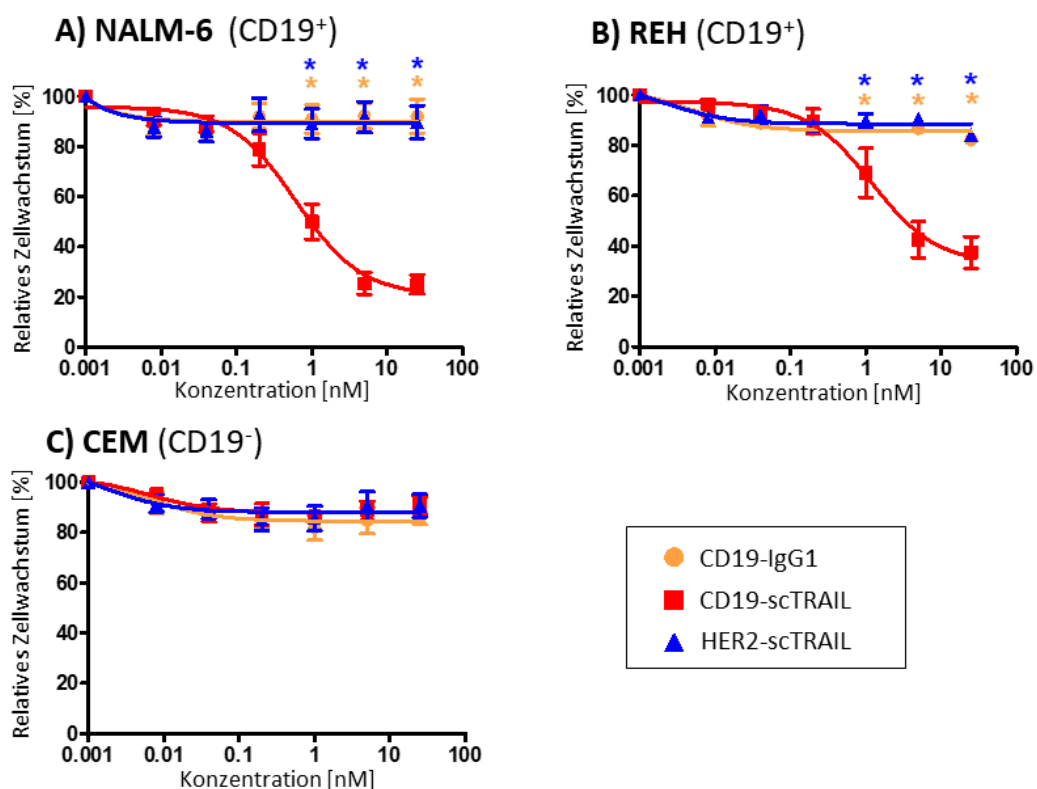


Abbildung 20: Wachstumsinhibition von B-ALL-Zellen durch CD19-scTRAIL. Dosis-abhängige wachstumsinhibierende Effekte des CD19-gerichteten Fusionsproteins CD19-scTRAIL nach 72 h Inkubation mit CD19-positiven NALM-6- (A) und REH-Zellen (B) sowie mit CD19-negativen CEM-Zellen (C). Der parentale CD19-IgG1-Antikörper und das Kontrollprotein HER2-scTRAIL wurden zum Vergleich mitgeführt. Es sind Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt *p < 0,05, Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur.

4.5 Bestimmung der Antgenspezifität der wachstumsinhibitorischen Effekte

Um die Antgenspezifität der wachstumsinhibitorischen Effekte weiter zu belegen, wurden Blockadeexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die MTT-Assays mit NALM-6-Zellen in nur einer Verdünnungsstufe mit 1,25 nM Proteinkonzentration wiederholt. Vor Zugabe der Antikörper-scTRAIL-Fusionsproteine wurde der parentale CD19-IgG1 bzw. HER2-IgG1 als Kontrolle in 125-fachem molarem Überschuss für 1 h mit den Zellen inkubiert. Aus mechanistischer Sicht bindet CD19-IgG1 die CD19-Antigene auf der Oberfläche der Zielzellen und blockiert so das Epitop der dann zugegebenen CD19-scTRAIL-Fusionen. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, führte die Vorinkubation der CD19-positiven NALM-6-Zellen mit CD19-IgG1-Antikörpern und die damit verbundene Blockade von CD19 auf der Zielzelloberfläche zu einer Aufhebung des wachstumsinhibierenden Effekts von CD19-scTRAIL. Eine vorherige Inkubation mit HER2-IgG1 hingegen konnte den wachstumsinhibierenden Effekt von CD19-scTRAIL nicht blockieren (nicht gezeigt). Es lässt sich schlussfolgern, dass CD19-scTRAIL an CD19 auf der Zielzelloberfläche binden muss, um scTRAIL-vermittelte Effekte zu zeigen und somit antigenspezifisch wirkt.

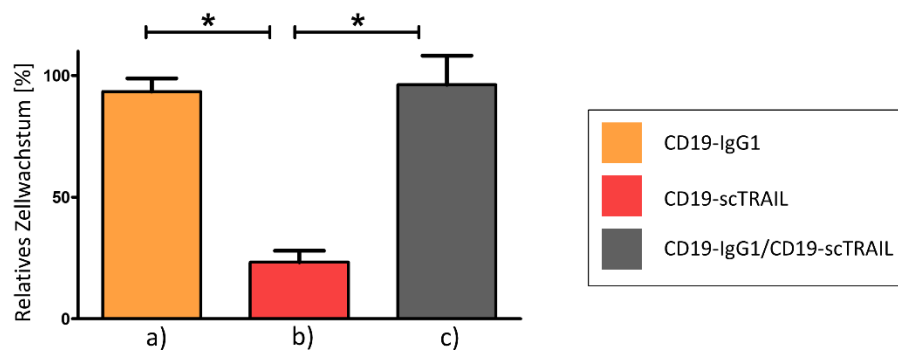


Abbildung 21: Blockade der Wachstumsinhibition im MTT-Assay. Analog zum MTT-Assay wurden NALM-6-Zellen für 72 h mit CD19-IgG1 (a) oder CD19-scTRAIL (b) behandelt oder zunächst mit einem 125-fachen molaren Überschuss des parentalen Antikörper CD19-IgG 1 h prä-inkubiert und anschließend für 72 h mit CD19-scTRAIL behandelt (c). Nach vorheriger Inkubation mit parentalem CD19-IgG1 konnte durch Inkubation mit CD19-scTRAIL kein reduziertes Zellwachstum mehr festgestellt werden. Es sind Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. * $p < 0,05$. Einfaktorielle Varianzanalyse und Tukey-Post-Test (zweiseitig, ungepaart).

4.6 Nachweis des Apoptose-Signalwegs

Die prä-B-ALL-Zellen NALM-6 und REH wurden nach 24 h Inkubation mit den Fusionsproteinen CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL mit Annexin V/APC und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Inkubation mit CD19-scTRAIL konnte bei den CD19-positiven prä-B-ALL-Zellen eine deutliche Zunahme der Annexin V-positiven, PI-negativen frühapoptotischen Zellen sowie eine Zunahme der

spätaoptotischen/nekrotischen Annexin V-positiven, PI-positiven Zellen festgestellt werden, verglichen mit PBS-behandelten Kontrollzellen. Nach Behandlung mit dem Kontrollprotein HER2-scTRAIL ähnelte die Verteilung der Zellen jener der mit PBS behandelten Kontrollzellen. Es konnte also eine CD19-abhängige Induktion der Apoptose durch CD19-scTRAIL festgestellt werden (Abbildung 22).

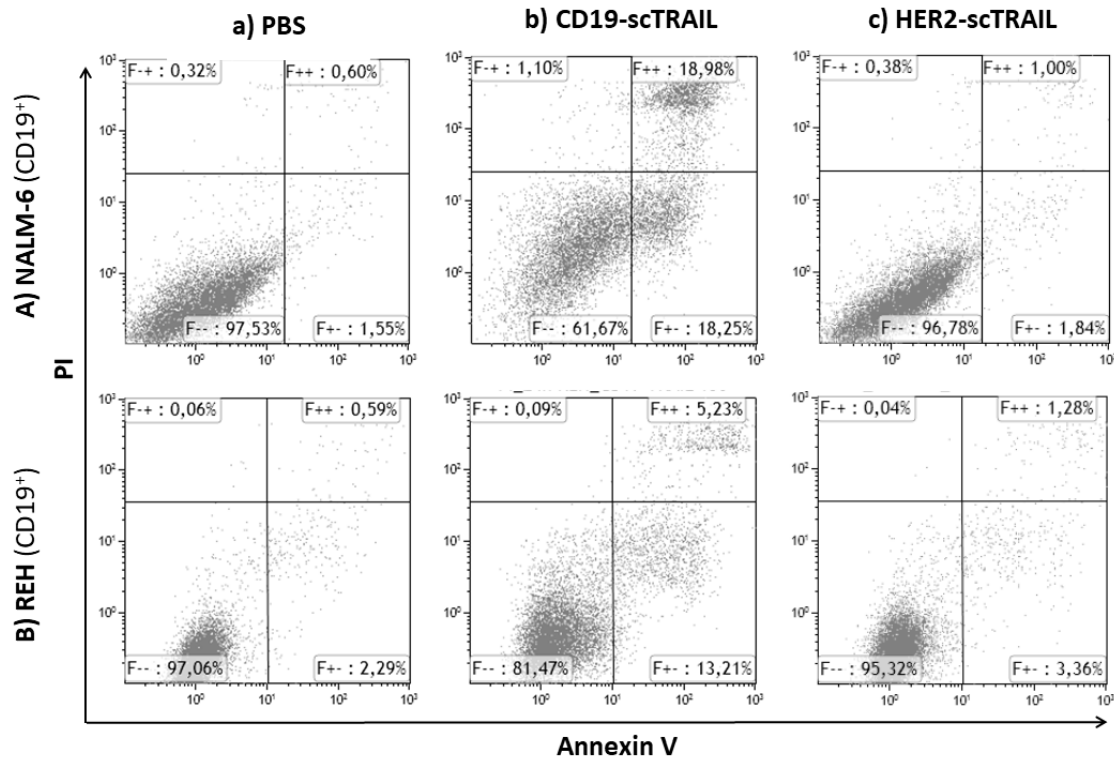


Abbildung 22: Nachweis der Apoptose-Induktion in B-ALL-Zellen durch CD19-scTRAIL. Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V/APC- und PI-gefärbten CD19-positiven NALM-6-(A) und REH-Zellen (B) nach 24-stündiger Inkubation mit PBS als Kontrolle (a), 0,5 nM CD19-scTRAIL (b) und HER2-scTRAIL (c). Frühapoptotische Zellen stellen sich als Annexin V-positiv, PI-negativ dar, spätaoptotische Zellen als Annexin V-positiv, PI-positiv im rechten oberen Quadranten. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 Versuchen.

Um Apoptose als Form des durch CD19-scTRAIL ausgelösten Zelltods weiter zu bestätigen, wurden Western Blot Experimente zur Detektion der Spaltprodukte von den Apoptose-assoziierten Proteinen Caspase 7 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) durchgeführt (Abbildung 23). CD19-positiv NALM-6- und REH-Zellen sowie CD19-negativ CEM-Zellen wurden mit CD19-scTRAIL, dem entsprechenden Kontrollprotein HER2-scTRAIL und dem parental CD19-IgG1-Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Zelllysate mittels Western Blot Experimenten analysiert. Wie erwartet konnten in den Lysaten der CD19-positiven Zellen nach Inkubation mit CD19-scTRAIL das Spaltprodukt der Caspase 7 (*cleaved Caspase 7*, cCaspase 7) detektiert werden, welche die abgelaufene, zur Apoptose der Zelle führende Caspasenkaskade nachweist. Außerdem konnte eine deutliche Zunahme von gespaltenem PARP (*cleaved PARP*, cPARP) gezeigt werden, welches bei Spaltung von PARP durch Effektorcaspasen im Rahmen der Apoptose entsteht. Dadurch konnte

Apoptose als Mechanismus des durch CD19-scTRAIL herbeigeführten Zelltods weiter bestätigt werden. Passend zu den bisherigen Ergebnissen wurden nach Behandlung mit dem Kontrollprotein HER2-scTRAIL oder mit CD19-IgG1 keine Spaltprodukte der Apoptose-assoziierten Proteine detektiert, ebenso in den CD19-negativen CEM-Zellen nach Behandlung mit den scTRAIL-Fusionsproteinen.

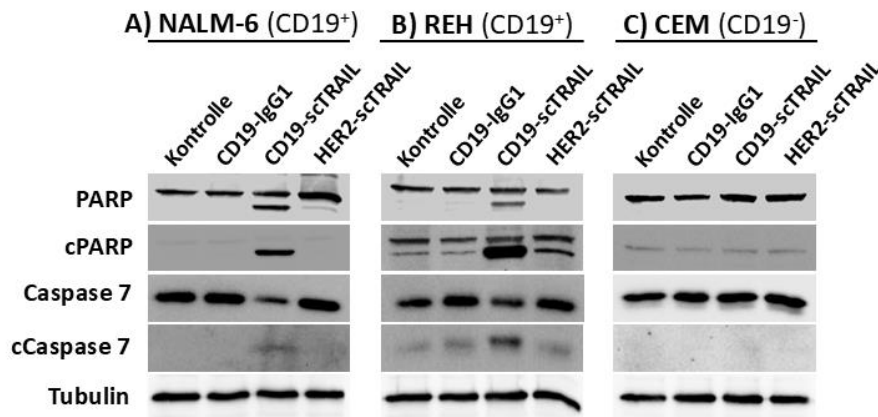


Abbildung 23: Apoptose-Nachweis mittels Detektion pro-apoptotischer Proteinspaltprodukte im Western Blot. Zelllysate aus CD19-positiven NALM-6- (A) und REH-Zellen (B) sowie CD19-negativen CEM-Zellen (C) nach Inkubation mit 0,5 nM CD19-IgG1, CD19-scTRAIL, HER2-scTRAIL bzw. Medium (Kontrolle) für 48 h wurden auf das Vorhandensein der Apoptose-assoziierten Proteine Caspase 7 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), sowie deren Spaltprodukte cCaspase 7 und cPARP analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit mit dem Ziel, CD19-positive maligne Zellen zu eliminieren, das Fusionsprotein CD19-scTRAIL hergestellt und charakterisiert. Expressionsvektoren für CD19-scTRAIL wurden kloniert und das Protein wurde erfolgreich exprimiert und gereinigt. Durchflusszytometrisch wurde eine antigenabhängige Bindung von CD19-scTRAIL auf CD19-positiven prä-B-ALL-Zelllinien nachgewiesen. Eine antigenabhängige Reduktion des Zellwachstums von CD19-positiven prä-B-ALL-Zellen wurde bereits in nanomolaren Konzentrationen von CD19-scTRAIL erreicht. In weiteren Versuchen wurde Apoptose als Mechanismus des von CD19-scTRAIL induzierten Zelltods nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen CD19 als geeignetes Zielantigen. Das hier hergestellte Fusionsprotein aus scTRAIL und einem CD19-IgG1-Antikörper könnte ein mögliches potentes Molekül zur Therapie von B-Zell-Leukämien darstellen.

5 Diskussion

Die Therapie von B-Zell-Neoplasien hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht und die Prognose für Patientinnen/Patienten deutlich verbessert. Dies beruht teilweise auf besseren Kenntnissen über potente Kombinationen von Chemotherapeutika sowie auf Fortschritten im Bereich der Stammzelltransplantation. Besonders die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe wie *small molecules*, CAR-T-Zellen oder neue mABs hat in der Therapie maligner B-Zell-Erkrankungen neue Möglichkeiten eröffnet. Vielversprechende Erfolge konnten beispielsweise mit den Antikörper-basierten Therapeutika Rituximab, Inotuzumab Ozogamicin oder Blinatumomab erzielt werden (H. Kantarjian et al., 2017; McLaughlin et al., 1998; Wynne et al., 2019). Dennoch sprechen nicht alle Patientinnen/Patienten gut auf die Therapie mit mABs an und Rezidive stellen nach wie vor ein Problem dar. Deshalb besteht weiterhin großer Bedarf nach neuen Strategien, um diese in der Regel gut verträgliche Behandlungsoption zu verbessern. Durch die Entwicklung neuartiger Antikörper-Fusionsproteine wird versucht, die therapeutischen Optionen bei B-Zell-Neoplasien zu erweitern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein hochaktives Fusionsprotein aus einem CD19-IgG1-Antikörper und scTRAIL hergestellt, um spezifisch TRAIL-Rs auf Tumorzellen zu aktivieren und darüber B-ALL Zellen zu eliminieren. Hierzu wurde scTRAIL an eine schwere Kette eines Heterodimer-bildenden CD19-IgG1-Antikörpers fusioniert. CD19-scTRAIL induzierte potent Apoptose in zwei etablierten B-Vorläuferzell-ALL-Zelllinien *in vitro*. Dieser pro-apoptotische Effekt war strikt abhängig von der Expression des Zielantigens CD19 auf der Tumorzelloberfläche. Die durchgeführten *in vitro* Versuche bestätigen die Eignung von CD19 als Zielantigen für Antikörper-TRAIL-Fusionsproteine und unterstreichen das therapeutische Potenzial CD19-gerichteter TRAIL-Fusionsproteine zur Therapie maligner B-Zell-Neoplasien. Sie legten auch die Grundlage für eine spätere Charakterisierung des Fusionsproteins *in vivo*, in dem sich das therapeutische Potenzial dieses Ansatzes bestätigte (Winterberg et al. 2021).

5.1 CD19 als Zielstruktur Antikörper-basierter Therapien

CD19 ist aufgrund seines vorteilhaften Expressionsmusters ein sehr attraktives Zielantigen zur Therapie von B-Zell-Neoplasien (Hammer, 2012; Murphy & Weaver, 2018; Raponi et al., 2011). Besonders bei der B-Vorläuferzell-ALL, deren zelluläre Herkunft in frühen B-Zell-Entwicklungsstadien wie den Pro-B-Zellen liegt, ist CD19 in über 95 % der Fälle auf der Zelloberfläche zu finden, während die Zielantigene CD20 oder CD22 teilweise noch nicht exprimiert werden (Raponi et al., 2011; Topp et al., 2015). Deshalb wurden schon diverse CD19-gerichtete Immuntherapeutika zur Therapie von B-Zell-Neoplasien in prä-klinischen Versuchen und klinischen Studien evaluiert und auch im Rahmen dieser Arbeit CD19 als attraktives Zielantigen gewählt.

In ersten Experimenten mit nativen CD19-Antikörpern vermittelten diese *in vitro* weder ADCC noch CDC, während sie im Maus-Xenograft-Modell das Tumorstadium hemmten (Pietersz et al., 1995; Zola et al., 1991). Spätere Versuche hingegen konnten effektive NK-Zell-vermittelte ADCC durch chimäre CD19-Antikörper nachweisen (Lang et al., 2004). Dies wurde in folgenden Untersuchungen weiter bestätigt (Horton et al., 2008; Kellner et al., 2013). Auch gewisse direkte Effektormechanismen wurden demonstriert, beispielsweise hemmten murine CD19-IgG1 *in vitro* das Wachstum von Lymphom- und B-ALL-Zellen, indem sie Zellzyklusarrest oder Apoptose induzierten (M. Ghetie et al., 1994; Stanciu-Herrera et al., 2008). Passend dazu konnte auch ein humaner CD19-FcKO-Antikörper, welcher keine indirekten Effektormechanismen vermittelt, im Maus-Xenograft-Modell die Tumormasse von Lymphomzellen um 26 % reduzieren, verglichen mit unbehandelten Tieren (Horton et al., 2008). Ein entsprechender CD19-IgG1 mit funktionaler Fc-Domäne hingegen reduzierte das Tumorstadium um 57 % (Horton et al., 2008). Dennoch waren die therapeutischen Effekte durch native CD19-Antikörper in prä-klinischen Experimenten sowie in ersten Versuchen mit Patientinnen/Patienten limitiert oder nicht von Dauer (Hekman et al., 1991; Horton et al., 2008; Vlasveld et al., 1995).

Das vorteilhafte Expressionsmuster von CD19 bei nur mäßiger zytotoxischer Aktivität nativer CD19-gerichteter Antikörper motivierte zahlreiche Arbeitsgruppen, optimierte CD19-gerichtete Wirkstoffe zu konstruieren, um CD19 als vielversprechendes Zielantigen nutzbar zu machen, darunter Fc-Engineering-Strategien, ADCs und bispezifische Antikörper (Hammer, 2012). So wurde auch im Rahmen dieser Arbeit ein CD19-IgG1-Antikörper durch Fusion mit scTRAIL armiert, um seine Effektivität über die von nativen CD19-Antikörpern hinaus zu steigern. Das entwickelte Fusionsprotein bietet aufgrund seiner IgG-Struktur die Möglichkeit, neben der Apoptoseinduktion über die Aktivierung von TRAIL-Rs, synergistische Wirkungen über unterschiedliche Effektormechanismen auszuüben. Generell hängen die möglichen Effektorfunktionen vom Zielantigen, Tumortyp, Tumorstadium, Ort des Tumors und von zur Verfügung stehenden Komponenten des Immunsystems ab (Kellner et al., 2014). Der als Kontrolle vergleichend mitgeführte native CD19-IgG1 zeigte in den durchgeführten *in vitro* Experimenten keine signifikanten zytotoxischen Effekte auf B-Vorläuferzell-ALL-Zellen, obwohl eine antigenabhängige Bindung durchflusszytometrisch nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20). Das steht in Einklang mit den Ergebnissen von Ghetie und Kollegen, welche durch native murine CD19-IgG1 allein *in vitro* keine wachstumsinhibitorischen Effekte auf die B-Vorläufer-ALL-Zelllinie NALM-6 feststellen konnten (M. Ghetie et al., 1994). Auch wenn diese Ergebnisse gegen das Auslösen direkter Effektormechanismen sprechen, wäre *in vivo* eine Wirkung über direkte Effektormechanismen denkbar. Des Weiteren könnten CD19-IgG1 und CD19-scTRAIL *in vivo* potenziell auch über ihre Fc-Domänen mit Komplementfaktoren oder FcγRs interagieren und indirekte Effektormechanismen wie CDC, ADCC oder ADCP vermitteln. Passend dazu zeigte D. Winterberg in

Kooperation mit der ALL-BFM-Studienzentrale (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Campus Kiel), dass auch CD19-IgG1 im Maus-Xenograft-Modell gewisse anti-tumorale Effekte vermittelte, denen CD19-scTRAIL aber signifikant überlegen war (Winterberg et al., 2021). Es gibt allerdings immer mehr Hinweise, dass Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper existieren, welche teils agonistische, teils antagonistische Effekte haben (G. J. Weiner, 2015). Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Bindung von C3b auf Rituximab-besetzten Zielzellen die Interaktion zwischen Fc und FcγR IIIA auf NK-Zellen behindert und so ADCC reduziert (S. Y. Wang et al., 2008). Demnach wäre aus mechanistischer Sicht auch eine Behinderung der indirekten Effektormechanismen durch am Fc-Teil gebundenes scTRAIL oder durch die eingefügten Mutationen zur Heterodimerisierung denkbar. Mitglieder der Projektarbeitsgruppe untersuchten in weiteren Experimenten die Fähigkeit von CD19-scTRAIL, ADCC und ADCP auszulösen. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede von CD19scTRAIL im Vergleich zu nativen CD19-IgG1 gezeigt (Winterberg, 2022). Die Fähigkeit von CD19-scTRAIL, CDC in malignen B-Zellen auszulösen, könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, wobei in vorhergehenden *in vitro* Versuchen keine CDC durch CD19-Antikörper ausgelöst wurde (Kellner et al., 2013).

Auch Fc-optimierte CD19-Antikörper wurden bereits zur Behandlung der B-ALL prä-klinisch getestet (Kellner et al., 2018; Schewe et al., 2017). Der eingangs erwähnte Protein-optimierte CD19-Antikörper Tafasitamab, dessen variable Domäne auch in CD19-scTRAIL verwendet wurde, besitzt eine erhöhte Bindungsaffinität zu FcγRs, insbesondere zu FcγRIIIA und FcγRIIA (100- bzw. 10-fach) (Horton et al., 2008). Infolgedessen war Tafasitamab *in vitro* im Vergleich zu einem analogen CD19-IgG1-Antikörper 100- bis 1000-fach effektiver, ADCC gegenüber malignen B-Zelllinien zu induzieren (gemessen an den EC₅₀-Werten), und vermittelte 10-fach verstärkte ADCP (Horton et al., 2008). Tafasitamab wurde 2021 bereits von der EMA in Kombination mit Lenalidomid zur Therapie des R/R DLBCL zugelassen (Delgado et al., 2021; Jurczak et al., 2018). Für R/R B-ALL jedoch zeigte die Monotherapie mit Tafasitamab nur eine geringe Gesamtansprechrate von 9 % mit Induktion von kurzzeitiger kompletter Remission bzw. MRD-negativer kompletter Remission (Klisovic et al., 2021). Dies legt nahe, dass die Monotherapie mit Tafasitamab für diese aggressive Erkrankung möglicherweise nicht ausreichend ist. Ein Tafasitamab-ähnlicher Protein-modifizierter CD19-Antikörper mit verbesserter FcγR-Bindung, welcher unter Verwendung der variablen Regionen von MOR208 mit der Mutation S239D/I332E in der CH2-Domäne modifiziert wurde (CD19-DE), verbesserte in einem MRD-Modell für pädiatrische B-ALL mit *mixed-lineage leukemia* (MLL)-*Rearrangement* signifikant das Überleben der xenotransplantierten Mäuse (Schewe et al., 2017). CD19-DE wurde auch im Xenograft-Modell bei höherer Leukämiebelastung mit ungünstigerem Verhältnis von Effektor- zu Tumorzellen getestet. In dieser Situation waren sowohl CD19-DE-Monotherapie als auch eine an der Induktionstherapie orientierte Polychemotherapie nur schwach wirksam, die Kombinationstherapie aus Zytostatika und CD19-DE allerdings konnte in 70 %

der xenotransplantierten Mäuse die Leukämie eradizieren und das Überleben deutlich verlängern (Kellner et al., 2018; Schewe et al., 2017). Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD19-DE in Situationen mit geringer Leukämielast klinisch besonders wirksam sein sollte, beispielsweise in Fällen von MRD-Nachweis, oder in Kombination mit einer zytoréduktiven Polychemotherapie (Kellner et al., 2018). Auch für Tafasitamab in der Therapie der B-ALL wäre eine erhöhte Wirksamkeit bei einem günstigeren Verhältnis von Effektor- zu Tumorzellen oder in Kombination mit Chemotherapie anzunehmen. Klinische Studien mit diesen Fc-optimierten CD19-Antikörpern in den beschriebenen Situationen könnten vielversprechend sein.

Auch die Kombination unterschiedlicher Strategien zur verbesserten Wirksamkeit von CD19-Antikörpern ist denkbar. Interessant wäre es, die DE-Modifikation der Fc-Domäne von Tafasitamab mit der Fusion des Antikörpers an eine TRAIL-Domäne zu kombinieren, um synergistische Effekte zu bewirken und die Effektivität des Wirkstoffes weiter zu steigern. Auch eine duale Fc-Modifikation zur Verbesserung von ADCC und CDC wäre denkbar. So wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Glyko- und Protein-Engineering-Strategien durch Afucosylierung und Einfügen der sogenannten EFTAE-Modifikation (S267E/H268F/S324T/G236A/I332E) an einer CD19-IgG1-Variante kombiniert, wodurch sowohl ADCC als auch CDC verstärkt wurden (Roßkopf et al., 2020). Ein anderer afucosylierter humanisierter CD19-Antikörper (Inebilizumab, Uplizna) mit erhöhter Affinität zum aktivierenden FcγRIIIA wurde zur Therapie unterschiedlicher B-Zell-Neoplasien erprobt. Der Antikörper ist inzwischen von der EMA zur Therapie von Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen zugelassen und sein Nutzen in der Therapie weiterer Autoimmunerkrankungen wird in klinischen Studien getestet (Cree et al., 2019; European Medicines Agency, 2023; Hammer, 2012).

Eine andere Strategie zur verbesserten Wirksamkeit von CD19-Antikörpern ist die Herstellung von ADCs. Das gegen CD22 gerichtete ADC Inotuzumab Ozogamicin (Besponsa) ist bereits zur Therapie der CD22-positiven R/R B-ALL zugelassen (Wynne et al., 2019). Coltuximab Ravtansine (SAR3419), ein mit dem Maytansin-Derivate DM4-konjugierter humanisierter CD19-Antikörper (H. M. Kantarjian et al., 2016; Trněny et al., 2018), sowie Loncastuximab tesirine (ADCT-402, Zynlonta), ein chimärer CD19-Antikörper, konjugiert mit dem synthetischen Pyrrolbenzodiazepin-Dimer SG3199 (Jain et al., 2020), zeigten in klinischen Studien mit R/R B-ALL-Patientinnen/Patienten jedoch nur mäßige Ansprechraten. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass es nach Bindung CD19-spezifischer Antikörper auf der Zelloberfläche zwar zur Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes kommt, diese jedoch, verglichen mit CD22, deutlich langsamer abläuft (Press et al., 1989; Vlasveld et al., 1995). Diese Internalisierung ist für die Wirksamkeit von ADCs allerdings entscheidend (G. J. Weiner, 2015). Das Zielantigen CD19 scheint also eher für Wirkmechanismen geeignet zu sein, bei denen der Verbleib des Antikörpers an der Zelloberfläche von Vorteil ist, wie es bei TRAIL-Fusionsproteinen der Fall ist. Dennoch zeigte das CD19-gerichtete, mit Monomethyl Auristatin F konjugierte ADC Denintuzumab

mafodotin in einer Phase-I-Studie an Patientinnen/Patienten mit B-ALL eine zusammengesetzte komplette Remissionsrate von 35 % (Fathi et al., 2015). Eine folgende Phase-II-Studie zur Wirksamkeit von Denintuzumab mafodotin in Kombination mit Chemotherapeutika, u. a. zur Therapie der lymphatischen Leukämie (NCT02592876), wurde allerdings aufgrund der Entscheidung des Geldgebers beendet (Barreca et al., 2022).

Ebenfalls zu bedenken ist, dass der Einsatz von ADCs die Gefahr der unspezifischen Toxizität mit sich bringt (G. J. Weiner, 2015). So sind die meisten für ADCs verwendeten zytotoxischen Moleküle hochpotent mit EC_{50} -Werten im subnanomolaren Bereich und induzieren Zelltod durch DNA-Schädigung oder Mitosehemmung (Hafeez et al., 2018). Bei Patientinnen/Patienten mit R/R ALL wurde in einer Phase-II-Studie unter der Behandlung mit Coltuximab Ravtansine von Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, okuläre Toxizität und schweren hämatologischen Nebenwirkungen berichtet (H. M. Kantarjian et al., 2016). Für ein gegen CD7 gerichtetes scFv-sTRAIL-Fusionsprotein zur Therapie von T-Zell-Neoplasien konnte, verglichen mit dem entsprechenden ADC aus scFvCD7 und dem *Pseudomonas* Exotoxin A, eine potentere Apoptoseinduktion sowie eine geringere unspezifische Toxizität gegenüber gesunden Leukozyten und aktivierten T-Zellen gezeigt werden (Bremer et al., 2005). Dies ist ein Hinweis dafür, dass TRAIL-Fusionsproteine wie CD19-scTRAIL eine potente und nebenwirkungsärmere Alternative zu ADCs darstellen könnten. Ein weiterer Vorteil von CD19-scTRAIL besteht darin, dass bei der Herstellung von Fusionsproteinen, im Gegensatz zu ADCs, nicht mit einem variierenden Verhältnis von Wirkstoff zu Antikörper mit möglicherweise unterschiedlicher Pharmakokinetik, Stabilität, Effektivität und Toxizität zu rechnen ist, welches sich aus der zufälligen Kopplung von mAB und Toxin ergibt (Hafeez et al., 2020). Stattdessen wird scTRAIL genetisch an den CD19-Antikörper fusioniert. Zwar wurden auch rekombinante Immunotoxine nach diesem Prinzip hergestellt, die verwendeten Protein-Toxine wirkten allerdings häufig immunogen, weshalb bei vielen Patientinnen/Patienten Anti-Arzneimittel-Antikörper gebildet wurden, welche die Wirkstoffe teilweise neutralisierten und die Halbwertszeit verringerten (V. Ghetie & Vitetta, 1994; G. J. Weiner, 2015). So wurden unter Therapie mit dem Fusionsprotein Moxetumomab pasudotox aus einem CD22-Fv und einem Fragment des *Pseudomonas* Exotoxin A in 59 % der Patientinnen/Patienten Anti-Arzneimittel-Antikörper nachgewiesen, welche bei erhöhten Titern mit einer geringeren Exposition gegenüber dem Wirkstoff assoziiert waren (Dhillon, 2018; Kreitman et al., 2018).

Nach der Expression und Aufreinigung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine zeigte sich allerdings, dass nur ein Teil der Proteine als korrekt zusammengelagerte, heterodimere Fusionsproteine vorlagen und eine Verunreinigung mit Proteinen geringerer molarer Masse bestand, wobei es sich um unvollständig translatierte oder alternativ zusammengelagerte Proteine handeln könnte (vgl. Abbildung 16). Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Gunaserkan et al., die unter Verwendung der beschriebenen, die Heterodimerisierung fördernden Modifikationen, nahezu

ausschließlich heterodimere IgG erhielten (Gunasekaran et al., 2010). Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche molare Masse der schweren Antikörperketten von 50 kDa ohne scTRAIL bzw. 112 kDa mit scTRAIL. Indem die DNA-Mengen, welche für die einzelnen Antikörperketten von CD19-scTRAIL kodierten, während der Transfektion zugunsten der scTRAIL-tragenden schweren Kette angepasst wurden, konnte ein höhere Ausbeute an intakten Fusionsproteinen erlangt werden. Die SEC ermöglichte es, die gewünschten Proteine zu isolieren (vgl. Abbildung 17). So konnten die nachfolgenden Versuche mit den nur noch leicht verunreinigten heterodimeren scTRAIL-Fusionsproteinen durchführen werden.

5.2 Therapie maligner Neoplasien mittels TRAIL-induzierter Apoptose

Verglichen mit der konventionellen Zytostatika-Therapie maligner Neoplasien, bietet die Aktivierung von DRs zur Krebstherapie entscheidende Vorteile. Viele Zytostatika aktivieren infolge von Zellschädigungen den intrinsischen Weg der Apoptose über das Tumorsuppressorprotein p53. Allerdings sind inaktivierende Mutationen im kodierenden Tumorsuppressorgen TP53 in vielen Tumoren zu finden, weshalb Zytostatika-Therapien versagen und TP53-Mutationen oft mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Kastenhuber & Lowe, 2017; Kretz et al., 2019). Auch hohe Proliferationsraten oder die Anwesenheit von Effektorzellen sind für die Wirksamkeit der DR-aktivierenden Substanzen nicht entscheidend. Motiviert durch diese Vorzüge versuchten zahlreiche Forscherinnen/Forscher, DR-aktivierende Wirkstoffe für die Krebstherapie nutzbar zu machen.

Erste Versuche mit rekombinantem humanem TNF (rhTNF) ergaben, dass rhTNF in einigen Krebszellen *in vitro* Apoptose auslöste und Tumorwachstum im Maus-Xenograft-Modell inhibierte (Carswell et al., 1975). Allerdings wurde in ersten klinischen Studien mit rhTNF schwere Toxizität durch Produktion proinflammatorischer Zytokine beobachtet und bei maximal tolerierter Dosis konnte keine ausreichende anti-tumorale Wirksamkeit erreicht werden (N. J. Roberts et al., 2011). Auch CD95L induzierte Apoptose in vielen Zelllinien *in vitro* (Walczak et al., 1999). Die Applikation von CD95-Agonisten führte allerdings in Mäusen durch fulminante Apoptose von Hepatozyten zum Tod der Tiere (Nagata et al., 1997; Ogasawara et al., 1993; Walczak et al., 1999). TRAIL unterschied sich diesbezüglich von den anderen DR-Liganden und schien selektiv Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, während gesunde Zellen verschont blieben (Ashkenazi et al., 1999). Diese Tumorselektivität macht TRAIL zu einem überaus interessanten Protein zur Therapie maligner Neoplasien.

Sowohl rhTRAIL (Dulanermin) als auch TRAIL-R-agonistische Antikörper erbrachten vielversprechende prä-klinische Ergebnisse und waren in Phase-I-Studien gut verträglich und sicher applizierbar, zeigten dann allerdings in folgenden Studien an Patientinnen/Patienten mit unterschiedlichen Neoplasien nur

minimale anti-tumorale Aktivität (Cheah et al., 2015; Lemke et al., 2014; Soria et al., 2011, 2017). Mögliche Erklärungen für die mangelhafte Wirksamkeit von Dulanermin ist die kurze Halbwertszeit im Plasma von nur 23-61 min (Herbst et al., 2010; Soria et al., 2010) und die fehlende Spezifität für DRs, sodass rhTRAIL von *decoy*-Rezeptoren abgefangen werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass lösliches rhTRAIL nur bedingt dazu in der Lage ist, TRAIL-R2 zu aktivieren, sondern dafür eine zusätzliche Kreuzvernetzung benötigt wird (Mühlenbeck et al., 2000). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TRAIL-R2 vorrangig durch memTRAIL aktiviert wird. Der Effekt von Dulanermin begrenzt sich demnach hauptsächlich auf Apoptoseinduktion über TRAIL-R1, wobei auch für TRAIL-R1 eine überlegene Aktivierung durch memTRAIL festgestellt werden konnte (Trebing et al., 2014; Wajant et al., 2001). TRAIL-R-agonistische Antikörper hingegen haben deutlich längere Halbwertszeiten im Serum (Lemke et al., 2014). Sie sind spezifisch entweder gegen TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 gerichtet und binden nicht an *decoy*-Rezeptoren, können allerdings auch nur spezifisch einen der beiden DRs aktivieren (Lemke et al., 2014). Des Weiteren verfügen sie lediglich über zwei TRAIL-R-bindende Paratope, während für die optimale Aktivierung der DRs drei Rezeptoren kreuzvernetzt werden müssen (Dhein et al., 1992). Deshalb ist eine zusätzliche Kreuzvernetzung, beispielsweise über FcγRs nötig, um potente Effekte zu erzielen (Gieffers et al., 2013; Wilson et al., 2011).

Das Fusionsprotein CD19-scTRAIL vereint vorteilhafte Eigenschaften von Dulanermin und TRAIL-R-agonistischen Antikörpern. Das hier gewählte Format des heterodimeren IgG1, fusioniert mit scTRAIL, nutzt die günstige Pharmakokinetik von IgG-Antikörpern. Versuche zur Pharmakokinetik von Fusionsproteinen aus scTRAIL und einem EGFR-IgG-Antikörper bzw. einer IgG1-Fc-Domäne mit reduzierter Bindungskapazität zu FcγRs ergaben Plasmahalbwertszeiten von $16,1 \pm 2,6$ h (Siegemund et al., 2018) bzw. 28 h (Gieffers et al., 2013), welche dem rhTRAIL um ein Vielfaches überlegen sind. Darüber hinaus wird CD19-scTRAIL durch Bindung an CD19 auf der Tumorzelloberfläche immobilisiert und verhält sich ähnlich dem membranständigen TRAIL. Dadurch ist CD19-scTRAIL in der Lage, im Gegensatz zu TRAIL-R-agonistischen Antikörpern oder rhTRAIL, potenziell sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 zu aktivieren. Dies macht CD19-scTRAIL bei B-Zell-Neoplasien mit unterschiedlicher TRAIL-R-Expression einsetzbar und könnte, bei Expression beider TRAIL-Rs, den zytotoxischen Effekt verstärken.

Die potenzielle Aktivierung der beiden Apoptose-signalisierenden TRAIL-Rs durch CD19-scTRAIL ist darüber hinaus von Bedeutung, da unterschiedliche Neoplasien präferenziell durch Aktivierung unterschiedlicher TRAIL-Rs in Apoptose gehen. Aufgrund der Erkenntnis, dass TRAIL unter physiologischen Bedingungen die höchste Affinität zu TRAIL-R2 aufweist, wurde zunächst TRAIL-R2 als vorherrschender Apoptose-induzierender Rezeptor angenommen (Truneh et al., 2000). Für einige Zelllinien konnte diese Präferenz für TRAIL-R2 nachgewiesen werden (Kelley et al., 2005), während für andere Zelllinien, beispielsweise CLL- und Mantelzell-Lymphomzellen, eine Präferenz der

Apoptoseinduktion durch TRAIL-R1 beschrieben wurde (Lemke et al., 2010; MacFarlane, Inoue, et al., 2005; MacFarlane, Kohlhaas, et al., 2005). Es scheint also von Bedeutung, bei der Wahl von TRAIL-basierten Therapeutika die TRAIL-Rezeptor-Präferenz der Tumorzellen zu berücksichtigen. CD19-scTRAIL kann theoretisch unabhängig von TRAIL-R-Präferenzen Apoptose in Tumorzellen auszulösen, was eine vielseitige Anwendbarkeit in der Behandlung maligner Erkrankungen vermuten lässt.

Die ungenügende Effektivität der TRAIL-basierten Wirkstoffe in ersten klinischen Studien versuchten unterschiedliche Arbeitsgruppen, durch Entwicklung hochaktiver TRAs zu überwinden. Ein Ziel hierbei war es, TRAIL-Rs verstärkt und unabhängig von zusätzlicher FcγR-vermittelter Kreuzvernetzung zu aktivieren. Da TRAIL als Homotrimer biologisch aktiv ist, wurden Versuche unternommen, die trimere Struktur von TRAIL zu stabilisieren, beispielsweise durch Leucin-Zipper, wodurch man sich stärkere zytotoxische Effekte erhoffte (Ganten et al., 2006; Walczak et al., 1999). Leucin-Zipper-TRAIL war gut wirksam und, entgegen anfänglicher Befürchtungen nach Berichten von fulminanter Hepatotoxizität durch lösliche TRAIL-Varianten mit FLAG (Aminosäuren DYKDDDDK)- oder Polyhistidin-tag, auch *in vivo* sicher applizierbar (Kretz et al., 2019; Rozanov et al., 2015). In Versuchen mit TRAIL-R2-agonistischen Nanobodies (variable Domänen von Schwere-Ketten-Antikörpern, die natürlicherweise von Kamelen produziert werden (Van Audenhove & Gettemans, 2016)), wurde gezeigt, dass *in vitro* eine Korrelation zwischen einer höheren Valenz von TRAIL-R2-Agonisten und der Potenz des TRAIL-R2-vermittelten Zelltods besteht (Huet et al., 2014). So waren tetra- bzw. pentamere TRAIL-R2-agonistische Nanobodies, welche über vier bzw. fünf humanisierte hochaffine schwere-Ketten-Domänen verfügten und vier bzw. fünf TRAIL-Rs kreuzvernetzen konnten, potenter als die trivalente Variante bzw. als konventionelle TRAIL-R-agonistische Antikörper (Huet et al., 2014). *In vivo* hingegen war das pentamere Konstrukt dem tetrameren nicht überlegen. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung des Signalweges möglicherweise eine Sättigung erreicht, ab der sich der zytotoxische Effekt durch erhöhte Valenz von TRAs nicht weiter steigern lässt (Huet et al., 2014). Stattdessen ergaben sich Hinweise auf unerwünschte Toxizität polyvalenter Konstrukte. So zeigte der tetravalente Nanobody TAS266 in ersten klinischen Studien unerwartete hepatotoxische Effekte (Papadopoulos et al., 2015). In einigen der Patientinnen/Patienten konnten TAS266-bindende Antikörper nachgewiesen werden, welche zu zusätzlicher Kreuzvernetzung von TRAIL-Rs geführt haben könnten (Papadopoulos et al., 2015). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei der Konstruktion von TRAs bzw. TRAIL-Fusionsproteinen ein Kompromiss gefunden werden muss zwischen ausreichender klinischer Wirksamkeit, beispielsweise durch erhöhte Valenz und Multimer-Bildung, und potenzieller Toxizität durch überschießende Kreuzvernetzung von TRAIL-Rs, beispielsweise auf Hepatozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die optimierte Einzelketten-Variante scTRAIL verwendet. scTRAIL besteht aus drei extrazellulären Domänen von TRAIL, welche über zwei Peptid-linker kovalent verknüpft sind, sodass keine Trimerisierung der Fusionsproteine für deren Wirksamkeit nötig ist (Schneider et al., 2010). Eine

Bildung von Aggregaten der Fusionsproteine mit möglicher zusätzlicher Kreuzvernetzung von TRAIL-Rs, welche zu erhöhter Toxizität gegenüber gesunden Zellen führen könnte (Lawrence et al., 2001), wurde vor Beginn der *in vitro* Experimente durch die SEC ausgeschlossen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die *in vitro* gezeigten zytotoxischen Effekte allein durch die trivalenten Fusionsproteine erzielt wurden. Bei der *in vivo* Applikation wäre zu Bedenken, dass theoretisch eine zusätzliche Kreuzvernetzung über FcRs oder Komplement denkbar wäre, welche die zytotoxischen Effekte verstärken oder zu unspezifischer Toxizität führen könnte.

5.3 CD19-gerichtete TRAIL-Fusionsproteine zur Therapie von B-Zell-Neoplasien

Die Kombination von TRAIL-basierten Wirkstoffen mit Tumor-Targeting-Strategien durch Fusion mit Tumorzell-spezifischen Antikörper-Konstrukten konnte die Aktivität TRAIL-basierter Therapeutika verbessern und ergab erhöhte Wirksamkeit bei niedrigeren EC₅₀-Werten (Seifert et al., 2014; Siegemund et al., 2012). Beispielsweise konnte durch Fusion von scTRAIL an ein gegen EGFR gerichtetes scFv eine dem nicht-zielgerichteten scTRAIL mehr als 10-fach überlegene zytotoxische Aktivität *in vitro* und ebenfalls überlegene anti-tumorale Wirksamkeit *in vivo* erzielt werden (Seifert et al., 2014). Des Weiteren erhoffte man sich herausragende Tumorselektivität und minimale unerwünschte Effekte auf gesundes Gewebe.

Ein Fusionsprotein aus einem gegen CD19 gerichteten scFv und sTRAIL (scFvCD19:sTRAIL) induzierte effizient Apoptose in CD19-positiven B-ALL- und CLL-Zellen, während CD19-positive B-Zellen gesunder Spenderinnen/Spender unbeschadet blieben (Stieglmaier et al., 2008). Auch Apoptoseinduktion in CD19-negativen *bystander*-Zellen wurde gezeigt. Außerdem wurde das Anwachsen von B-ALL-Zellen im Maus-Xenograft-Modell verhindert und die Überlebenszeit der Mäuse signifikant verlängert. Die vielversprechenden anti-tumoralen Effekte von scFvCD19:sTRAIL sollten durch Konstruktion von CD19-scTRAIL noch weiter verbessert werden. Zum einen sollten durch die IgG-Struktur bessere pharmakokinetische Eigenschaften erzielt werden, zumal in vorhergehenden Versuchen mit TRAIL-Fusionsproteinen eine verlängerte Halbwertszeit in Zusammenhang mit einer höheren Wirksamkeit gebracht werden konnte (R. Li et al., 2016; Müller et al., 2010; Unverdorben et al., 2016). Zum anderen sollte unter Verwendung von scTRAIL die Valenz der TRAIL-R-Bindestellen pro Molekül erhöht werden und dadurch die Fähigkeit, TRAIL-Rs zu aktivieren, verbessert werden, um potent Apoptose zu induzieren, ohne dass die Fusionsproteine Trimere bilden müssen.

Das Fusionsprotein CD19-scTRAIL zeigte *in vitro* eine potente pro-apoptotische Aktivität, welche abhängig von der CD19-Expression auf den Tumorzellen war. Nanomolare Konzentrationen (EC₅₀-Werte: 0,6 nM (NALM-6) bzw. 1,2 nM (REH)) reichten aus, um das Zellwachstum in den beiden CD19-

positiven Prä-B-ALL-Zelllinien NALM-6 und REH zu reduzieren. Durch den Nachweis von Spaltprodukten Apoptose-assoziiierter Proteine mittels Western Blot sowie AnnexinV-positiver, PI-negativer, frühapoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie konnte Apoptose als Mechanismus des durch CD19-scTRAIL herbeigeführten Zelltods bestätigt werden. Allerdings zeigte sich eine unterschiedliche Aktivität von CD19-scTRAIL gegenüber NALM-6 und REH-Zellen. Das Zellwachstum der NALM-6-Zellen wurde auf 25 % reduziert, jenes der REH-Zellen auf 38 %, verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 20). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied bietet das Expressionsmuster der TRAIL-Rs auf der Zelloberfläche. D. Winterberg (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH, Kiel) zeigte, dass TRAIL-R1 auf den genutzten Zelllinien nur spärlich bzw. gar nicht vorhanden ist (Winterberg et al., 2021). TRAIL-R2 ist auf allen verwendeten Zelllinien exprimiert, allerdings 4,5-fach stärker auf NALM-6 als auf REH-Zellen (Winterberg et al., 2021). Es ist also eine primär TRAIL-R2-vermittelte Wirkung auf die prä-B-ALL-Zelllinien anzunehmen und die größere Reduktion des Zellwachstums der NALM-6-Zellen bei niedrigeren EC₅₀-Werten ist passend zu deren höherer TRAIL-R2-Expression. Das Zellwachstum CD19-negativer CEM-Zellen wurde trotz TRAIL-R2-Expression nicht durch CD19-scTRAIL beeinflusst. Auch das analoge, gegen HER2 gerichtete Kontrollprotein HER2-scTRAIL hatte keinen pro-apoptotischen Effekt in HER2-negativen ALL-Zelllinien. Außerdem konnte die Wirkung von CD19-scTRAIL auf B-ALL-Zellen komplett aufgehoben werden, indem durch vorherige Inkubation mit dem parental CD19-Antikörper CD19 auf der Tumorzelloberfläche blockiert wurde (s. Abbildung 21). Diese Ergebnisse bestätigen die strenge Abhängigkeit der pro-apoptotischen Wirkung von CD19-scTRAIL von der Bindung am Zielantigen CD19. Bisherige Erkenntnisse, dass TRAIL-R2 vorrangig durch membrangebundenes TRAIL aktiviert wird (Wajant et al., 2001), werden bestätigt, indem man die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit einbezieht. Beide scTRAIL-tragenden Fusionsproteine, CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL, zeigten eine geringe, vermutlich TRAIL-R-vermittelte Bindung auf der Tumorzelloberfläche, unabhängig von der Zielantigen-Expression (vgl. Abbildung 19). Trotzdem blieb der pro-apoptotische Effekt von CD19-scTRAIL beschränkt auf die CD19-exprimierenden B-ALL-Zelllinien und HER2-scTRAIL zeigte keinerlei anti-tumorale Wirkung. Dies unterstreicht nochmals, dass das Zielantigen CD19 und TRAIL-Rs auf den B-ALL-Zellen kreuzvernetzt werden müssen, um die Tumorzellen zu eliminieren. Diese Ergebnisse legen dar, dass CD19-scTRAIL spezifisch Apoptose in CD19-positive Zellen induziert und lassen eine gute Verträglichkeit vermuten, da CD19-negative, TRAIL-R-positive Zellen verschont werden. Interessant wären weitere *in vitro* Experimente mit TRAIL-R1-tragenden CD19-positiven Tumorzellen, um die Antigenspezifität der pro-apoptotischen Effekte unter Aktivierung von TRAIL-R1, welcher auch durch sTRAIL aktiviert werden kann (Mühlenbeck et al., 2000), zu überprüfen.

Ein weiteres, nicht Antikörper-basiertes CD19-gerichtetes Fusionsprotein aus dem CD19-Liganden und sTRAIL (CD19L-sTRAIL) wurde von Uckun et al. beschrieben (Uckun et al., 2015). CD19L-sTRAIL

signalisierte spezifisch Apoptose in Zellen der B-Vorläuferzell-ALL durch simultane Aktivierung der CD19- und TRAIL-R-vermittelten Apoptose-Signalwege (Uckun et al., 2011, 2015). Die zytotoxischen Effekte von CD19L-sTRAIL sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften waren hierbei dem sTRAIL deutlich überlegen (Uckun et al., 2015). Auch im Maus-Xenograft-Modell rezidivierter und Chemotherapie-resistenter B-Vorläufer-ALL eliminierte CD19L-sTRAIL effektiv Tumorzellen (Uckun et al., 2015).

5.4 Die Balance zwischen Antigen-spezifität und potenter Apoptose-Induktion von Antikörper-TRAIL-Fusionsproteinen

Während die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, veröffentlichten Siegemund et al. eine Arbeit, in der sie unterschiedliche Formate von Fusionsproteinen aus EGFR-IgG und scTRAIL untersuchten, welche in ihrer Struktur dem im Rahmen dieser Dissertation getesteten CD19-scTRAIL ähneln (Siegemund et al., 2018). scTRAIL war entweder an die HC (HC-scTRAIL) oder an die LC (LC-scTRAIL) des EGFR-IgG fusioniert, was sechs aktive TRAIL-Untereinheiten pro Konstrukt ergab, oder an leichte und schwere Kette, wodurch sich 12 DR-Bindestellen pro Konstrukt ergaben. Die hexavalenten EGFR-gerichteten Konstrukte zeigten im Vergleich zu hexavalentem nicht-zielgerichtetem Fc-scTRAIL *in vitro* fünf- bis 22-fach niedrigere EC₅₀-Werte und damit eine antigenspezifische höhere Bioaktivität gegen EGFR-positive Kolon-Karzinomzellen. Diese höhere Wirksamkeit ließ sich aufheben, indem die Fab-vermittelte Bindung durch EGFR-Blockade verhindert wurde, was die Antigen-spezifität der Effekte bestätigte.

In Vorversuchen dieser Arbeit wurden ebenfalls hexavalente homodimere IgG1-scTRAIL-Fusionsproteine hergestellt, welche an beiden schweren Ketten eine scTRAIL-Domäne trugen, und deren Effekte auf maligne B-Zellen getestet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den von Siegemund et al. publizierten Ergebnissen, zeigten die hexavalenten homodimeren Fusionsproteine keine strikt antigenabhängigen Effekte (Siegemund et al., 2018). Stattdessen wurde auch durch ein hexavalentes, gegen HER2-gerichtetes Kontrollprotein in HER2-negativen B-ALL-Zelllinien das Zellwachstum inhibiert. Ebenso wurden antigenunabhängige wachstumsinhibierende Effekte eines homodimeren hexavalenten Fusionsproteins gegen *B-cell maturation antigen* (BCMA), ein Zielantigen des Multiplen Myeloms, auf diversen BCMA-negativen Krebszelllinien beobachtet. Wir nahmen an, dass Antigen-unabhängige Effekte reduziert werden könnten, indem die Anzahl der TRAIL-Domänen pro Antikörper erniedrigt wird. Dies brachte uns zur Entwicklung der neuartigen heterodimeren trivalenten Variante aus einem CD19-IgG1, welcher scTRAIL nur an einer schweren Kette trägt. Dieses heterodimere trivalente Konstrukt zeigte dann die gewünschte Antigen-abhängige Aktivierung von TRAIL-Rs, welche sich durch Blockade der Antigene auf der Zelloberfläche verhindern ließ (vgl. Abbildung 21).

Möglicherweise lassen sich die beschriebenen Unterschiede, ab welcher Anzahl von aktiven TRAIL-Untereinheiten pro Fusionsprotein es zu einer Antigen-unabhängigen Apoptoseinduktion kommt, auf eine variable TRAIL-Sensibilität der verschiedenen Zelllinien zurückführen. So zeigte auch das dodecavalente Konstrukt von Siegemund et al. zwar eine zwei- bis fünffach erhöhte Bioaktivität, welche allerdings nicht antigenspezifisch zu sein schien, da sich der Effekt durch Blockade von EGFR auf der Oberfläche der Kolon-Karzinomzellen nicht aufheben ließ (Siegemund et al., 2018).

Weitere *in vivo* Versuche von Siegemund et al. ergaben, dass das nicht-zielgerichtete Fusionsprotein Fc-scTRAIL, entgegen der *in vitro* Ergebnisse, *in vivo* eine mit dem zielgerichteten Molekül HC-scTRAIL, vergleichbare Wirkung zeigte (Siegemund et al., 2018). Die Tumor-Spezifität dieser Fusionsproteine schien also im Maus-Xenograft-Modell nicht von entscheidender Bedeutung für deren Wirksamkeit zu sein. Diese Beobachtung wurde auch durch Versuche von Hutt et al. mit unterschiedlichen scFv-Fc-scTRAIL-Konstrukten gegen Antigene solider Tumoren bestätigt (Hutt et al., 2017, 2018). Allerdings wurde erkannt, dass der Fc-Teil von scTRAIL-Fusionsproteinen wichtig für ihre Wirksamkeit *in vivo* zu sein scheint. Die Fc-enthaltenden Konstrukte waren denen ohne Fc-Teil, unabhängig von tumorspezifischen oder nicht-zielgerichteten Varianten, in ihren anti-tumoralen Effekten überlegen (Hutt et al., 2017). Diese stärkeren Anti-Tumor-Effekte *in vivo* lassen sich teilweise durch die erhöhte Halbwertszeit der Fc-enthaltenden Konstrukte erklären, da über Bindung von Fc an den neonatalen FcR die Konstrukte länger im Körper persistieren (Kontermann, 2009). Eventuell könnte auch eine Fc-vermittelte Kreuzvernetzung Einfluss auf die Wirksamkeit haben, wobei im Xenograft-Modell mit immundefizienten Mäusen nur bedingt murine FcRs oder Komplement mit den humanen Fc-Domänen interagieren (Golay & Introna, 2012). Das nicht-zielgerichtete Fusionsprotein ABBV-621 (Eftozanermin), bestehend aus einer IgG1-Fc Domäne und scTRAIL, wodurch sich nach Dimerisierung der Fc-Domänen insgesamt sechs DR-Bindestellen pro Molekül ergeben, wurde bereits in klinischen Phase-I-Studien an Patientinnen/Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren untersucht (LoRusso et al., 2022; Phillips et al., 2021). Eftozanermin erwies sich als gut verträglich und zeigte als Monotherapie anti-tumorale Effekte in individuellen Patientinnen/Patienten (LoRusso et al., 2022). Auch ein vergleichbares, hexavalentes, nicht-zielgerichtetes Fusionsprotein aus scTRAIL und einer modifizierten IgG1-Fc-Domäne mit reduzierter FcγR-Bindung (APG-350) zeigte in prä-klinischen Studien gute Verträglichkeit und potente anti-tumorale Effekte auf unterschiedliche solide Tumorzelllinien (Gieffers et al., 2013; Legler et al., 2018).

In Fortführung dieses Forschungsprojekts wurde CD19-scTRAIL auf therapeutische Effekte im Xenograft-Modell der B-ALL in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Denis Schewe (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH, Kiel) analysiert. CD19-scTRAIL verlängerte signifikant das Überleben der mit REH- oder NALM-6-Zellen transplantierten Mäuse und war dem parentalen CD19-IgG1 überlegen (Winterberg et al., 2021). Auch im Xenograft-Modell mit Leukämiezellen, welche

Patientinnen/Patienten entnommen wurden (*patient-derived xenograft*, PDX), konnte das Leben aller Mäuse signifikant verlängert werden (Winterberg et al., 2021). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass CD19-scTRAIL *in vivo* effektiv B-Vorläuferzell-ALL-Zellen eliminiert. In Anbetracht der oben erörterten Ergebnisse von Hutt und Siegemund und Kolleginnen/Kollegen, welche *in vivo* keinen Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Tumorzell-gerichteten und nicht Tumorzell-gerichteten hexavalenten scTRAIL-Fc-Fusionsproteinen feststellen konnten, wäre es interessant, auch das Kontrollprotein HER2-scTRAIL *in vivo* zu testen und herauszufinden, ob auch dieses trivalente Fusionsprotein, entgegen der *in vitro* Ergebnisse, im Maus-Xenograft-Modell eine mit CD19-scTRAIL vergleichbare Wirkung erzielt.

5.5 CD19-scTRAIL als Alternative zur T-Zell-Aktivierung über CD19-gerichtete Wirkstoffe

Bereits sehr erfolgreich zur Therapie von B-Zell-Neoplasien eingesetzt werden unterschiedliche CD19-gerichtete Wirkstoffe, die über Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen wirken. Der BiTe-Antikörper Blinatumomab, welcher gegen CD3 und CD19 gerichtet ist, führte in Patientinnen/Patienten mit B-ALL zu Ansprechraten von 36-44 % (DeAngelo et al., 2020). Die CD19-gerichtete zelluläre Immuntherapie mit CAR-T-Zellen brachte Ansprechraten zwischen 52 % und 83 % in der Therapie unterschiedlicher B-Zell-Neoplasien wie der B-ALL, dem DLCL und der CLL (DeAngelo et al., 2020), mit kompletter Remission in 40-60 % der aggressiven NHL und 60-80 % der B-ALL (Sermer & Brentjens, 2019). Diese potente Wirksamkeit geht allerdings mit einer hohen Toxizität durch T-Zell-Aktivierung einher. So kam es in 10-50 % der Patientinnen/Patienten unter CAR-T-Zell-Therapie zu starken Nebenwirkungen wie Neurotoxizität bzw. dem CAR-T-Zell vermittelten Enzephalopathie-Syndrom oder einem schweren Zytokin-Freisetzungssyndrom (Sermer & Brentjens, 2019). Auch für Blinatumomab wurden bei über 99 % der Patientinnen/Patienten behandlungsbedingte Nebenwirkungen beobachtet, wobei es sich bei 78 % der Patientinnen/Patienten dabei um schwere Nebenwirkungen (Grad ≥ 3) handelte (Przepiorka et al., 2015). Solch hohe Toxizität wäre unter Therapie mit CD19-scTRAIL nicht zu erwarten, da keine T-Zellen aktiviert werden. TRAIL-basierte Therapeutika induzieren Apoptose durch DR-Aktivierung und zeigen in bisherigen klinischen Studien eine generell sehr gute Verträglichkeit (Cheah et al., 2015; Herbst et al., 2010; Soria et al., 2010; Yee et al., 2007). Ob sich eine ähnliche Effektivität erreichen lässt, evtl. durch Proteine mit neuartiger Struktur oder durch Kombinationstherapien, bleibt allerdings noch offen. Ein weiterer Nebeneffekt der CAR T-Zell-Therapie ist die starke Depletion gesunder CD19-positiver B-Zellen und damit verbundener Hypogammaglobulinämie mit erhöhter Infektanfälligkeit, da die CAR-T-Zellen im Körper persistieren und nicht zwischen malignen und gesunden CD19-positiven Zellen unterscheiden (Schuster et al., 2017). Auch hier könnten TRAIL-

Fusionsproteine vorteilhaft sein. Für das Fusionsprotein CD19scFv-sTRAIL konnte gezeigt werden, dass es mononukleäre Zellen gesunder Spenderinnen/Spender verschonte, während es in malignen CD19-positiven B-Zellen Apoptose induzierte (Stieglmaier et al., 2008). So scheint TRAIL auch im Format von Fusionsproteinen weiterhin präferentiell in Tumorzellen Apoptose zu induzieren und könnte für Patientinnen/Patienten mit einem geringeren Risiko für Hypogammaglobulinämie verbunden sein.

Im Gegensatz zu lange persistierenden CAR-T-Zellen, zeichnet sich Blinatumomab bei einer molekularen Masse von 54 kDa durch eine sehr kurze Halbwertszeit von durchschnittlich 2,1 h aus (Przepiorka et al., 2015). Aufgrund dieser Pharmakokinetik muss Blinatumomab als Dauerinfusion über mehrere Wochen verabreicht werden, was die Applikation aufwändig gestaltet und sich negativ auf den Komfort und die Compliance von Patientinnen/Patienten auswirkt (Przepiorka et al., 2015). Zudem ist die Therapie mit Blinatumomab infolgedessen sehr kostenintensiv. Ebenso die CAR-T-Zell-Therapie, welche nur in spezialisierten Zentren durchgeführt wird und logistisch aufwändig ist. Basierend auf einem IgG1-Antikörper sollte CD19-scTRAIL wesentlich vorteilhaftere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, weshalb von einer unkomplizierteren Applikation auszugehen ist.

5.6 CD19-scTRAIL gegen die Tumor-Escape-Strategie des Antigen-Verlustes

Ein möglicher Weg maligner B-Zellen, sich dem Wirkmechanismus therapeutischer Antikörper zu entziehen, besteht im Verlust der Expression des Zielantigens. Diese Tumor-Escape-Strategie wurde schon bald nach der Zulassung von Rituximab für NHL-Zellen nach Rituximab-Therapie beschrieben (Kennedy et al., 2002; Maeshima et al., 2009), wobei eine CD19-Expression auch in diesen Fällen gezeigt werden konnte. Deshalb könnte CD19 im Falle CD20-negativer Rezidive ein alternatives Zielantigen darstellen (Gerber et al., 2009; Hammer, 2012). Nach der Zulassung von Blinatumomab und der CAR-T-Zell-Therapien wurde nach Therapie mit diesen CD19-gerichteten Wirkstoffen bzw. Zellprodukten auch der Verlust von CD19 auf der Tumorzelloberfläche beobachtet. So kam es in 22 % der Patientinnen/Patienten mit R/R B-ALL nach Therapie mit Blinatumomab im Rahmen einer Phase-I/II-Studie zu CD19-negativen Rezidiven (Mejstříková et al., 2017). Nach CAR-T-Zell-Therapie von R/R B-ALL kam es in 60-70 % der Fälle zu Rezidiven, wobei sich davon 10-20 % CD19-negativ präsentierten (Xu et al., 2019). Bisher wurden unterschiedliche Mechanismen beschrieben, welche zum CD19-negativen Rezidiv führen (Mejstříková et al., 2017; Xu et al., 2019). Zum einen ist ein Verlust des CD19-Epitops durch Deletionen oder Mutationen innerhalb des Gens der extrazellulären Domäne von CD19 oder durch alternatives Spleißen der CD19-mRNA möglich (Sotillo et al., 2015). Zum anderen kann ein Verlust von CD81, welches eine zentrale Rolle bei der Reifung und dem intrazellulären Transport von CD19 spielt, zu Varianten mit komplettem Verlust von CD19 auf der Zelloberfläche führen (Braig et al.,

2017). Außerdem ist ein Linienwechsel von B-Vorläuferzellen zu Zellen der myeloischen Reihe beschrieben worden (Gardner et al., 2016). Des Weiteren besteht die Theorie, dass einige CD19-negative Zellklone bereits vor der Therapie existieren und durch den Selektionsdruck im Rahmen der CD19-gerichteten Therapie zum dominanten Tumorzelltyp werden (Grupp et al., 2013). Der Einsatz von tumorzellgerichteten scTRAIL-Fusionsproteinen könnte eine Option darstellen, um CD19-negative Rezidive vorzubeugen: Unterschiedliche scFv-TRAIL-Fusionsproteine sind in der Lage, auch benachbarte Antigen-negative Tumorzellen über den sogenannten *bystander*-Effekt zu töten (s. Abbildung 7) (Bremer, Samplonius, et al., 2004; de Bruyn et al., 2013; Stieglmaier et al., 2008). Dies ist auch für die in dieser Arbeit konstruierten Fusionsproteine anzunehmen und könnte in weiteren Experimenten überprüft werden. So könnte auch in CD19-negativen Zellklonen Apoptose induziert und ihre Vermehrung bis hin zum Rezidiv verhindert werden. Um Therapieoptionen für CD19-negative Rezidive zu erlangen, sind Immuntherapien gegen neue Leukämie- und Lymphom-assoziierte Antigene bzw. bei Rezidiven mit verändertem CD19 gegen neue CD19-Epitope denkbare Optionen. Auch Therapieansätze, welche von vornherein auf zwei unterschiedliche B-Zell-Neoplasie-assoziierte Antigene abzielen, wodurch Tumor-Escape über den Antigen-Verlust erschwert wird, oder welche über unterschiedliche Wirkmechanismen synergistisch wirken, könnten die Rezidivrate senken (Kellner et al., 2018; Mejstříková et al., 2017).

5.7 Überwindung potenzieller TRAIL-Resistenzmechanismen

Die Resistenz gegen Zelltod-induzierende Signale ist eines der Hauptmerkmale maligner Zellen (Hanahan & Weinberg, 2011). So könnte auch eine vorbestehende oder erworbene Resistenz maligner B-Zellen gegen die Apoptoseinduktion durch TRAIL die therapeutischen Erfolge schmälern. In unterschiedlichen Studien wurde beobachtet, dass Tumorzellen bzw. Malignom-erkrankte Patientinnen/Patienten sehr unterschiedlich auf TRAIL-basierte Therapeutika reagierten und einzelne Patientinnen/Patienten sogar auf die Monotherapie mit TRAIL gut ansprachen (Dimberg et al., 2013; Herbst et al., 2010; Lemke et al., 2014; Leng et al., 2016; Winterberg et al., 2021). Es besteht großes Interesse an der Identifikation geeigneter Biomarker, welche die TRAIL-Sensitivität voraussagen lassen und damit Schlüsse darüber erlauben, welche Patientinnen/Patienten von einer eventuellen Therapie profitieren könnten.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass NALM-6- und REH-Zellen unterschiedlich sensibel gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose waren. Ein möglicher Grund für variables Ansprechen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose liegt auf der TRAIL-Rezeptorebene. Für einige Tumoren wurde eine transkriptionelle Herunterregulierung von DRs beschrieben (Elrod & Sun, 2008). So zeigte, wie bereits erwähnt, die partiell resistente Zelllinie REH im Vergleich zu NALM-6 eine signifikant niedrigere

Expression von TRAIL-R2 (Winterberg, 2022). Im Gegensatz dazu wurde TRAIL-R2 nur in einer von 14 PDX-Proben, welche im Maus-Xenograft-Modell mit CD19-scTRAIL behandelt wurden, nachgewiesen, während TRAIL-R1 auf allen Proben in unterschiedlicher Stärke exprimiert wurde (Winterberg, 2022). Zudem konnte keine Korrelation zwischen der TRAIL-R-Expression und dem Ansprechen auf die Therapie mit CD19-scTRAIL festgestellt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten, die auch keine Verbindung zwischen der Reaktion auf TRAIL-basierte Wirkstoffe und der Expression von TRAIL-Rezeptoren auf B-ALL-Zellen feststellen konnten (Clodi et al., 2000; Wuchter et al., 2001). Auch die Expression von *decoy*-Rezeptoren, welche aufgrund einer fehlenden funktionalen DD keinen Zelltod induzieren, kann die Wirkung von TRAs beeinflussen, indem sie mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 um die Bindung der TRAs konkurrieren (Degli-Esposti et al., 1997; Mérimo et al., 2006). Für den *decoy*-Rezeptor TRAIL-R4 wurde darüber hinaus gezeigt, dass dieser mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 interagiert und die Trimerisierung der DRs mit folgender Formierung des DISC stört (Neumann et al., 2014). Um einen potenziellen Einfluss der *decoy*-Rezeptoren auf die unterschiedliche Sensibilität von REH- und NALM-6-Zellen gegenüber CD19-scTRAIL zu ergründen, wäre deren Quantifizierung auf der Zelloberfläche der verwendeten Zelllinien interessant. Neben der TRAIL-R-Expression können auch posttranslationale Modifikationen der TRAIL-Rs, wie O-Glykosylierung, die TRAIL-Responsivität beeinflussen. So korrelierte die Expression der Peptidyl-O-Glykosyltransferase GALNT14 (Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferase 14) in Zellen solider Tumoren mit der Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Wagner et al., 2007). Somit könnte die GALNT14-Expression als möglicher prädiktiver Biomarker für die Therapie mit TRAIL-basierten Wirkstoffen dienen. Ein immunhistochemischer Test zur Bestimmung der GALNT14-Expression in Tumorzellen wurde bereits entwickelt (Stern et al., 2010).

Ein essenzieller Schritt des extrinsischen Apoptose-Signalweges ist die intrazelluläre Formierung des DISC mit konsekutiver Aktivierung der Pro-Caspasen 8 und 10 (vgl. Abbildung 6). So wurde in soliden Tumoren der Verlust der Caspase-8-Expression in Zusammenhang mit Resistenzen gegen TRAIL-induzierte Apoptose gebracht (Grotzer et al., 2000; Zhang et al., 2005). Inhibiert wird die Aktivierung der Pro-Caspase 8 am DISC auch durch das anti-apoptotische Protein cFLIP (Lemke et al., 2014). In diversen Tumorzelllinien, u. a. des Multiplen Myeloms und der T-ALL, wurde ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von cFLIP und der Resistenz gegenüber TRAIL-induziertem Zelltod nachgewiesen (Y. Wu et al., 2017; Zang et al., 2014). Durch Rocaglamide, sekundäre Pflanzenstoffe mit anti-tumoraler Wirkung (Li-Weber, 2015), wurde cFLIP herunterreguliert und die anti-tumorale Wirkung von zirkulär permutiertem TRAIL (*circularly permuted TRAIL*, CPT) auf Zelllinien des Multiplen Myeloms und der T-ALL *in vitro* und *in vivo* signifikant verbessert (Y. Wu et al., 2017). Es wäre interessant, die Expression von cFLIP auch in NALM-6- und REH-Zellen zu untersuchen. Möglicherweise könnte man durch zusätzliche Behandlung mit Rocaglamiden die zytotoxische Aktivität von CD19-

scTRAIL noch zusätzlich verbessern oder zuvor resistente Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren.

Wie eingangs erwähnt (Absatz 1.4.1) unterscheiden sich Zellen außerdem bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber extrinsischen Apoptose-Signalen (Kantari & Walczak, 2011; Scaffidi et al., 1998). In Typ-II-Zellen bedarf es einer Verstärkung der Zelltodsignale über den mitochondrialen Weg, um über den extrinsischen Weg Apoptose zu induzieren (Kantari & Walczak, 2011). Inzwischen wurde nach Behandlung mit CD19-scTRAIL in den Zelllysaten der NALM-6- und REH-Zellen ein Spaltprodukt der Caspase 9 nachgewiesen, was auf die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs hinweist (Winterberg et al., 2021). Der mitochondriale Weg wird durch das Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert (Kale et al., 2018). In unterschiedlichen Tumorzellen wird das Protoonkogen Bcl-2 überexprimiert, welches die Ausschüttung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium sowie die Aktivierung der Caspase 7 hemmt und damit den mitochondrialen Apoptose-Signalweg inhibiert und Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose vermittelt (Fulda et al., 2002; Sun et al., 2001). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die niedrigere Sensibilität der REH-Zellen für CD19-scTRAIL auf höhere Expressionslevel von Bcl-2 zurückzuführen sein könnte, wodurch die Apoptoseinduktion gehemmt wird (Lemke et al., 2014). Dies wäre von besonderer Bedeutung, falls es sich bei REH-Zellen um Typ-II-Zellen handeln sollte. Tatsächlich wiesen REH-Zellen eine höhere Bcl-2-Expression als Nalm-6-Zellen auf (Winterberg, 2022).

Die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie bieten den therapeutischen Angriffspunkt für Venetoclax (ABT-199, Venclyxto), einen Bcl-2-selektiven Inhibitor, oder Navitoclax (ABT-263), einen Bcl-2- und Bcl-XL-Inhibitor (Souers et al., 2013). Venetoclax ist von der EMA bereits zur Therapie der CLL und der AML zugelassen und erzielte als Monotherapie oder in Kombination mit CD20-Antikörpern in Patientinnen/Patienten mit CLL eine hohe Rate an dauerhaften Komplettremissionen (A. W. Roberts et al., 2019; Seymour et al., 2018). Auch im Maus-Xenograft-Modell einer pädiatrischen ALL mit MLL-*Rearrangement* zeigte Venetoclax-Monotherapie ein Ansprechen in 50 % der PDX-Proben (Khaw et al., 2016). Die Kombinationstherapie aus TRAIL-basierten pro-apoptotischen Wirkstoffen und Inhibitoren der Bcl-2-Familie aktiviert gleichzeitig den extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalweg und kann synergistische anti-tumorale Effekte erzielen. Zum Beispiel verstärkten Venetoclax und Navitoclax die zytotoxische Aktivität des TRAIL-R-agonistischen Fusionsproteins Eftozanermin gegen AML- und DLBCL-Zelllinien und sensitivierten zuvor TRAIL-resistente Glioblastom-Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose (Lincoln et al., 2018; Tahir et al., 2017). In einer Phase-I-Studie an Patientinnen/Patienten mit R/R AML zeigte Eftozanermin allein kein Ansprechen, während die Kombinationstherapie aus Eftozanermin und Venetoclax zu einer Gesamtansprechrate von 30 % führte (Tahir et al., 2023). In Einklang mit diesen Ergebnissen wurden bei gleichzeitiger Behandlung der Bcl-2-exprimierenden REH-Zellen mit CD19-scTRAIL und Venetoclax *in vitro* synergistischen Effekte

beobachtet und eine verbesserte therapeutische Effizienz im B-ALL-Xenograft-Modell erzielt (Winterberg et al., 2021). Daher könnte die Kombinationsbehandlung aus CD19-scTRAIL und Venetoclax vielversprechend für die Therapie der B-ALL sein, da B-ALL-Zellen mit Bcl-2-Überexpression durch Venetoclax für die TRAIL-vermittelte Apoptose re-sensitiviert werden. Weitere synergistische Therapeutika könnten Smac-Mimetika sein, welche hemmend auf IAPs wirken und ebenfalls den intrinsischen Weg der Apoptose begünstigen (Fulda, 2017). Auch die Kombination von TRAs mit Chemotherapeutika zeigte in prä-klinischen Versuchen vielversprechende Ergebnisse, konnte allerdings in klinischen Studien kaum validiert werden (Kretz et al., 2019; Newsom-Davis et al., 2009; Wuchter et al., 2001).

5.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das neuartige heterodimere Fusionsprotein CD19-scTRAIL *in vitro* effektiv Apoptose in B-ALL-Zellen induziert. In Fortführung des Forschungsprojekts wurde das hohe zytotoxische Potenzial von CD19-scTRAIL gegenüber B-Vorläuferzell-ALL-Zellen inzwischen auch im Maus-Xenograft-Modell bestätigt (Winterberg et al., 2021). Neben der B-ALL tragen auch andere B-Zell-Neoplasien wie B-NHL und sogar eine Untergruppe der AML CD19 auf der Zelloberfläche (Olejniczak et al., 2006; Scheuermann & Racila, 1995). Nachdem auch für diese B-Zell-Neoplasien in prä-klinischen Studien bereits TRAIL-induzierte Apoptose gezeigt werden konnte (Daniel et al., 2007; MacFarlane, Inoue, et al., 2005; MacFarlane, Kohlhaas, et al., 2005; ten Cate et al., 2009), wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob das zielgerichteten Fusionsproteins CD19-scTRAIL auch in weiteren CD19-positiven Tumorzellen antigenspezifisch Apoptose induziert. Außerdem wäre es interessant, das entwickelte Format eines heterodimeren Antikörper-scTRAIL-Fusionsproteins auf andere Zielantigene zu übertragen. So wurden TRAIL-basierte Fusionsproteine gegen CD7 auf T-ALL-Zellen (Bremer et al., 2005), gegen CD33 auf AML-Zellen (ten Cate et al., 2009), gegen CD38 auf Zellen des Multiplen Myeloms oder Lymphomzellen (De Luca et al., 2018) sowie gegen CD20 auf B-NHL-Zellen (Yan et al., 2013) bereits prä-klinisch erprobt. Eventuell könnte das entwickelte Fusionsprotein auch in diesen hämatologischen Neoplasien potente Effekte erzielen. Auch die Übertragung auf Zielantigene solider Tumoren wie EGFR oder HER2 wäre interessant.

In Mäusen erwies sich CD19-scTRAIL als gut verträglich (Winterberg et al., 2021). Allerdings besitzen Mäuse nur einen Apoptose-induzierenden TRAIL-R mit gewisser Sequenz-homologie zu den humanen DRs (Kretz et al., 2019; G. Wu et al., 1999), welcher kaum mit humanem TRAIL interagiert (Bossen et al., 2006). Vor einer möglichen klinischen Applikation von CD19-scTRAIL müsste demnach zunächst die Sicherheit in einem Modell mit nicht-humanen Primaten erprobt werden, um mögliche Toxizität im menschlichen Organismus vorauszusagen.

Um in Zukunft TRAIL-basierte Therapeutika klinisch wirksam zu machen, könnte eine mögliche Herangehensweise sein, das individuelle Expressionsprofil von Markern der TRAIL-Responsivität von Tumorzellen mit den eingesetzten Wirkstoffen abzustimmen (Dimberg et al., 2013). So könnte zunächst das Expressionsprofil von GALNT14, TRAIL-Rs, oder TRAIL-Resistenz-assoziiierter Proteine wie Bcl-2 getestet werden. Im Falle einer Kombinationstherapie könnte dann anhand des individuellen Expressionsprofils unter Kenntnis der Wirkmechanismen unterschiedlicher Tumor-Therapeutika, ein passendes Kombinationsmedikament gewählt werden. Beispielsweise könnte bei Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 die Therapie mit einem entsprechenden Inhibitor wie Venetoclax vorteilhaft sein.

Zuletzt scheint erwähnenswert, dass TRAIL neben dem Auslösen von Apoptose auch mit nicht-apoptotischen Signalwegen wie Autophagie, Nekroptose oder pro-inflammatorischer Signale in Verbindung gebracht wird (De Miguel et al., 2016; Kretz et al., 2019). Die möglichen ausgelösten Signalwege sind abhängig vom Zelltyp, scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen und werden komplex reguliert (Kretz et al., 2019). Für pro-inflammatorische Signalwege, beispielsweise über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) oder MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen, konnte gezeigt werden, dass diese Malignität erhöhen können, indem sie Proliferation, Migration, Invasion oder Metastasierung fördern (De Miguel et al., 2016; Falschlehner et al., 2007; Trauzold et al., 2006). Auch erhöhtes Vorkommen von TRAIL-R2 im Nucleus solider Tumorzellen förderte Proliferation und korrelierte mit einer schlechten Prognose (Haselmann et al., 2014). Deshalb ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen weiter zu verstehen, welche nicht-apoptotische Signalwege fördern, um dem klinischen Einsatz TRAIL-basierter pro-apoptotischer Krebstherapien näherzukommen.

Kürzlich wurde von einer klinischen Phase III Studie berichtet, in welcher CPT (Aponermin) in Kombination mit Thalidomid und Dexamethason bei Patientinnen/Patienten mit R/R Multiplem Myelom zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens, des progressionsfreien Überlebens und der Gesamtansprechrate führte (Xia et al., 2023). Dies ist nach bisherigem Kenntnisstand die erste Phase-III-Studie mit einem TRAIL-basierten Wirkstoff, welche, verglichen mit einer entsprechenden Kombinationstherapie mit Placebo, einen signifikanten therapeutischen Vorteil in der Therapie einer B-Zell-Neoplasie zeigte und kann als wichtiger Schritt zu einer möglichen Zulassung des ersten TRAIL-basierten Wirkstoffes gewertet werden.

6 Quellenverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

- Abou Dalle, I., Jabbour, E., Short, N. J., & Ravandi, F. (2019). Treatment of philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/S11864-019-0603-Z>
- Adams, G. P., & Schier, R. (1999). Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *Journal of Immunological Methods*, 231(1–2), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00161-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00161-1)
- Al-Katib, A. M., Aboukameel, A., Mohammad, R., Bissery, M. C., & Zuany-Amorim, C. (2009). Superior antitumor activity of SAR3419 to rituximab in xenograft models for non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(12), 4038–4045. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2808>
- Amersdorffer, J., Steidl, S., Winderlich, M., Krohn, S., & Rojkaer, L. (2012). *Combination therapy with an anti-CD19 antibody and a purine analog: US patent 20140227277*.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z., & Schwall, R. H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Journal of Clinical Investigation*, 104(2), 155. <https://doi.org/10.1172/JCI6926>
- Bagchi, S., Yuan, R., & Engleman, E. G. (2021). Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 16, 223–249. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-042020-042741>
- Barreca, M., Lang, N., Tarantelli, C., Spriano, F., Barraja, P., & Bertoni, F. (2022). Antibody-drug conjugates for lymphoma patients: preclinical and clinical evidences. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, 3(6), 763. <https://doi.org/10.37349/ETAT.2022.00112>
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., & Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964–13971. <https://doi.org/10.1074/JBC.M601553200>
- Braig, F., Brandt, A., Goebeler, M., Tony, H. P., Kurze, A. K., Nollau, P., Bumm, T., Böttcher, S., Bargou, R. C., & Binder, M. (2017). Resistance to anti-CD19/CD3 BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking. *Blood*, 129(1), 100–104. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-05-718395>
- Bremer, E., Kuijlen, J., Samplonius, D., Walczak, H., de Leij, L., & Helfrich, W. (2004). Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2. *International Journal of Cancer*, 109(2), 281–290. <https://doi.org/10.1002/IJC.11702>
- Bremer, E., Samplonius, D. F., Peipp, M., Van Genne, L., Kroesen, B. J., Fey, G. H., Gramatzki, M., De Leij, L. F. M. H., & Helfrich, W. (2005). 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 Research*, 65(8), 3380–3388. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2756>
- Bremer, E., Samplonius, D., Kroesen, B. J., Van Genne, L., De Leij, L., & Helfrich, W. (2004). Exceptionally Potent Anti-Tumor Bystander Activity of an scFv:sTRAIL Fusion Protein with Specificity for EGP2 Toward Target Antigen-Negative Tumor Cells. *Neoplasia (New York)*, 6(5), 636. <https://doi.org/10.1593/NEO.04229>
- Brinkmann, U., & Kontermann, R. E. (2017). The making of bispecific antibodies. *MAbs*, 9(2), 182. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
- Byrd, J. C., Kitada, S., Flinn, I. W., Aron, J. L., Pearson, M., Lucas, D., & Reed, J. C. (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*, 99(3), 1038–1043. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.3.1038>
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), 3666–3670. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.9.3666>
- Carter, P. J., & Lazar, G. A. (2018). Next generation antibody drugs: Pursuit of the “high-hanging fruit.” *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(3), 197–223. <https://doi.org/10.1038/NRD.2017.227>
- Carter, R. H., Wang, Y., & Brooks, S. (2002). Role of CD19 signal transduction in B cell biology. *Immunologic Research*, 26(1–3), 45–54. <https://doi.org/10.1385/ir:26:1-3:045>
- Chalupny, N. J., Kanner, S. B., Schieven, G. L., Wee, S., Gilliland, L. K., Aruffo, A., & Ledbetter, J. A. (1993). Tyrosine phosphorylation of CD19 in pre-B and mature B cells. *The EMBO Journal*, 12(7), 2691. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB05930.X>
- Cheah, C. Y., Belada, D., Fanale, M. A., Janikova, A., Czucman, M. S., Flinn, I. W., Kapp, A. V., Ashkenazi, A., Kelley, S., Bray, G. L., Holden, S., & Seymour, J. F. (2015). Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study. *The Lancet Haematology*, 2(4), e166–e174. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00026-5)
- Chevallier, P., Pigneux, A., Robillard, N., Ayari, S., Guillaume, T., Delaunay, J., Eveillard, M., Dumas, P. Y., Lippert, E., Mohty, M., & Leguay, T. (2012). Rituximab for the treatment of adult relapsed/refractory CD20 positive B-ALL patients: A pilot series. *Leukemia Research*, 36(3), 311–315. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2011.11.010>
- Clodi, K., Wimmer, D., Li, Y., Goodwin, R., Jaeger, U., Mann, G., Gadner, H., & Younes, A. (2000). 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. *British Journal of Haematology*, 111(2), 580–586. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2000.02404.X>
- Cree, B. A. C., Bennett, J. L., Kim, H. J., Weinshenker, B. G., Pittock, S. J., Wingerchuk, D. M., Fujihara, K., Paul, F., Cutter, G. R., Marignier, R., Green, A. J., Aktas, O., Hartung, H. P., Lublin, F. D., Drappa, J., Barron, G., Madani, S., Ratchford, J. N., She, D., ... Katz, E. (2019). Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOMentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet (London, England)*, 394(10206), 1352–1363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31817-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31817-3)

- Dagar, G., Gupta, A., Masoodi, T., Nisar, S., Merhi, M., Hashem, S., Chauhan, R., Dagar, M., Mirza, S., Bagga, P., Kumar, R., Akil, A. S. A. S., Macha, M. A., Haris, M., Uddin, S., Singh, M., & Bhat, A. A. (2023). Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments. *Journal of Translational Medicine* 2023 21:1, 21(1), 1–36. <https://doi.org/10.1186/S12967-023-04292-3>
- Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D. A., Totpal, K., Balter, I., Lee, W. P., Gogineni, A., Cole, M. J., Yee, S. F., Ross, S., & Ashkenazi, A. (2007). Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Blood*, 110(12), 4037–4046. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-02-076075>
- de Bruyn, M., Bremer, E., & Helfrich, W. (2013). Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer. *Cancer Letters*, 332(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2010.11.006>
- De Luca, R., Kachel, P., Kropivsek, K., Snijder, B., Manz, M. G., & Neri, D. (2018). A novel dual-cytokine-antibody fusion protein for the treatment of CD38-positive malignancies. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 31(5), 173–179. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZY015>
- De Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H., & Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death and Differentiation*, 23(5), 733–747. <https://doi.org/10.1038/CDD.2015.174>
- DeAngelo, D. J., Jabbour, E., & Advani, A. (2020). Recent advances in managing acute lymphoblastic leukemia. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 40(40), 330–342. https://doi.org/10.1200/EDBK_280175
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7(6), 813–820. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80399-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80399-4)
- Delgado, J., Papadouli, I., Sarac, S. B., Moreau, A., Hovgaard, D., Gisselbrecht, C., Enzmann, H., & Pignatti, F. (2021). The european medicines agency review of tafasitamab in combination with lenalidomide for the treatment of adult patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *HemaSphere*, 5(12), e666. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000666>
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Möller, P., & Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *The Journal of Immunology*, 149(10).
- Dhillon, S. (2018). Moxetumomab pasudotox: first global approval. *Drugs*, 78(16), 1763–1767. <https://doi.org/10.1007/S40265-018-1000-9>
- Dimberg, L. Y., Anderson, C. K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., & Ford, H. L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*, 32(11), 1341–1350. <https://doi.org/10.1038/ONC.2012.164>
- Dorothee Winterberg (2022). *Optimierung von CD19-Antikörpern zur Steigerung der therapeutischen Effizienz bei der B-Vorläufer akuten lymphatischen Leukämie (BCP-ALL)*. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Kiel.
- Ehrlich, P. (1906). *Collected Studies on Immunity* (1st ed.). J. Wiley & sons.

- Elrod, H. A., & Sun, S. Y. (2008). Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biology and Therapy*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.4161/CBT.7.2.5335>
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., & Young, P. R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14363–14367. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14363>
- Erdmann, F., Kaatsch, P., Grabow, D., & Spix, C. (2020). *German childhood cancer registry-annual report 2019*. www.kinderkrebsregister.de
- Escherich, G., & Schrappe, M. (2021). Leitlinie Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) im Kindesalter. In *AWMF online*. <https://www.awmf.org/service/awmf-aktuell/akute-lymphoblastische-leukaemie-all-im-kindesalter>
- European Medicines Agency. (2024). <https://www.ema.europa.eu/en>
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B., & Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7–8), 1462–1475. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2007.02.007>
- Fathi, A. T., Borate, U., DeAngelo, D. J., O'Brien, M. M., Trippett, T., Shah, B. D., Hale, G. A., Foran, J. M., Silverman, L. B., Tibes, R., Cramer, S., Pauly, M., Kim, S., Kostic, A., Huang, X., Pan, Y., & Chen, R. (2015). A phase 1 study of denintuzumab mafodotin (SGN-CD19A) in adults with relapsed or refractory B-lineage acute leukemia (B-ALL) and highly aggressive lymphoma. *Blood*, 126(23), 1328–1328. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V126.23.1328.1328>
- Fielding, A. K., Richards, S. M., Chopra, R., Lazarus, H. M., Litzow, M. R., Buck, G., Durrant, I. J., Luger, S. M., Marks, D. I., Franklin, I. M., McMillan, A. K., Tallman, M. S., Rowe, J. M., & Goldstone, A. H. (2007). Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*, 109(3), 944–950. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-05-018192>
- Fujimoto, M., Poe, J. C., Inaoki, M., & Tedder, T. F. (1998). CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Seminars in Immunology*, 10(4), 267–277. <https://doi.org/10.1006/SMIM.1998.9999>
- Fulda, S. (2017). Smac mimetics to therapeutically target IAP proteins in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 330, 157–169. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2016.09.004>
- Fulda, S., Meyer, E., & Debatin, K. M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21(15), 2283–2294. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205258>
- Ganten, T. M., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Büchler, P., Haas, T. L., Schader, M. B., Untergasser, A., Stremmel, W., & Walczak, H. (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(8), 2640–2646. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2635>
- Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., & Chinot, O. L. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*, 86. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2020.102017>
- Gardner, R., Wu, D., Cherian, S., Fang, M., Hanafi, L. A., Finney, O., Smithers, H., Jensen, M. C., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2016). Acquisition of a CD19-negative myeloid

- phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 127(20), 2406–2410. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-08-665547>
- Gerber, H. P., Kung-Sutherland, M., Stone, I., Morris-Tilden, C., Miyamoto, J., McCormick, R., Alley, S. C., Okeley, N., Hayes, B., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., McDonagh, C. F., Carter, P. J., Benjamin, D., & Grewal, I. S. (2009). Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. *Blood*, 113(18), 4352–4361. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-09-179143>
- Ghetie, M., Picker, L., Richardson, J., Tucker, K., Uhr, J., & Vitetta, E. (1994). Anti-CD19 inhibits the growth of human B-cell tumor lines in vitro and of daudi cells in SCID mice by inducing cell cycle arrest. *Blood*, 83(5), 1329–1336. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V83.5.1329.1329>
- Ghetie, V., & Vitetta, E. (1994). Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, 63(3), 209–234. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90025-6)
- Gieffers, C., Kluge, M., Merz, C., Sykora, J., Thiemann, M., Schaal, R., Fischer, C., Branschädel, M., Abhari, B. A., Hohenberger, P., Fulda, S., Fricke, H., & Hill, O. (2013). APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(12), 2735–2747. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0323>
- Gökbuget, N. (2015). Aktuelle Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Internist*, 56(4), 344–353. <https://doi.org/10.1007/s00108-014-3595-6>
- Gökbuget, N., Baldus, C., Brüggemann, M., Hauswirth, A. W., Schanz, U., Stelljes, M., & Topp, M. (2020). *Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL)*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all>
- Golay, J., & Introna, M. (2012). Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2012.02.011>
- Gooley, T. A., Chien, J. W., Pergam, S. A., Hingorani, S., Sorrow, M. L., Boeckh, M., Martin, P. J., Sandmaier, B. M., Marr, K. A., Appelbaum, F. R., Storb, R., & McDonald, G. B. (2010). Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 363(22), 2091–2101. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1004383>
- Graham, F. L., & Van Der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54(2), 536–539. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90163-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90163-3)
- Grossbard, M. L., Multani, P. S., Freedman, A. S., O'Day, S., Gribben, J. G., Rhuda, C., Neuberg, D., & Nadler, L. M. (1999). A Phase II study of adjuvant therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, Vol 5, 2392-2398.
- Grotzer, M. A., Eggert, A., Zuzak, T. J., Janss, A. J., Marwaha, S., Wiewrodt, B. R., Ikegaki, N., Brodeur, G. M., & Phillips, P. C. (2000). Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene*, 19(40), 4604–4610. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203816>
- Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L., & June, C. H. (2013). Chimeric antigen

- receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 368(16), 1509–1518. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1215134>
- Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S. Bin, Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I. N., Wittekind, M., & Yan, W. (2010). Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19637. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.117382>
- Hafeez, U., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2018). Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 41, pp. 114–121). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.010>
- Hafeez, U., Parakh, S., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2020). Antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Molecules*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25204764>
- Hammer, O. (2012). CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. *MAbs*, 4(5), 571. <https://doi.org/10.4161/MABS.21338>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & T George, A. J. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Publishing Group*, 9. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
- Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häslar, R., Pickl, A., Fritsche, H., Annewanter, F., Engler, C., Fleig, B., Bernt, A., Röder, C., Schmidt, H., Gelhaus, C., Hauser, C., Egberts, J. H., Heneweer, C., ... Trauzold, A. (2014). Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology*, 146(1), 278–290. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.10.009>
- Hayes, C. (2021). Cellular immunotherapies for cancer. *Irish Journal of Medical Science*, 190(1), 41. <https://doi.org/10.1007/S11845-020-02264-W>
- Hekman, A., Honselaar, A., Vuist, W. M. J., Sein, J. J., Rodenhuis, S., ten Bokkel Huinink, W. W., Somers, R., Rümke, P., & Melief, C. J. M. (1991). Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 32(6), 364–372. <https://doi.org/10.1007/BF01741331>
- 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., Ashkenazi, A., Jubb, A. M., & Mendelson, D. S. (2010). Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(17), 2839–2846. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.1991>
- Herdegen, T. (2020). Kurzlehrbuch Pharmakologie. In *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* (4. Auflage, Issue 08/09). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b-006-163246>
- Herold, G. (2020). *Innere Medizin 2020*. Gerd Herold, Köln. <https://doi.org/doi.org/10.1515/9783110688481>
- Hoelzer, D., Walewski, J., Döhner, H., Viardot, A., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Serve, H., Dührsen, U., Hüttmann, A., Thiel, E., Dengler, J., Kneba, M., Schaich, M., Schmidt-Wolf, I. G. H., Beck, J., Hertenstein, B., Reichle, A., Domanska-Czyz, K., Fietkau, R., ... Gökbuget, N. (2014). Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy:

- report of a large prospective multicenter trial. *Blood*, 124(26), 3870.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-03-563627>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/NBT1142>
- 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., Desjarlais, J. R., & Zhukovsky, E. A. (2008). Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Research*, 68(19), 8049–8057. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2268>
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA043186>
- Huet, H. A., Growney, J. D., Johnson, J. A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G., Royo, A., Jensen, M., Dombrecht, B., Meerschaert, K. R. A., Kolkman, J. A., Cromie, K. D., Mosher, R., Gao, H., Schuller, A., Isaacs, R., ... Ettenberg, S. A. (2014). Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *MAbs*, 6(6), 1560–1570. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975099>
- Hutt, M., Marquardt, L., Seifert, O., Siegemund, M., Müller, I., Kulms, D., Pfizenmaier, K., & Kontermann, R. E. (2017). Superior properties of Fc-comprising scTRAIL fusion proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(12), 2792–2802. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-0551>
- Hutt, M., Marquardt, L., Seifert, O., Siegemund, M., Müller, I., Kulms, D., Pfizenmaier, K., & Kontermann, R. E. (2018). Targeting scFv-Fc-scTRAIL fusion proteins to tumor cells. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 13). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24379>
- Iannello, A., & Ahmad, A. (2005). Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005 24:4, 24(4), 487–499. <https://doi.org/10.1007/S10555-005-6192-2>
- Jain, N., Stock, W., Zeidan, A., Atallah, E., McCloskey, J., Heffner, L., Tomlinson, B., Bhatnagar, B., Feingold, J., Ungar, D., Chao, G., Zhang, X., Qin, Y., Havenith, K., Kantarjian, H., & Wieduwilt, M. J. (2020). Loncastuximab tesirine, an anti-CD19 antibody-drug conjugate, in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances*, 4(3), 449. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2019000767>
- Jędraszek, K., Malczewska, M., Parysek-Wójcik, K., & Lejman, M. (2022). Resistance mechanisms in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 23. <https://doi.org/10.3390/IJMS23063067>
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522A0>
- Jurczak, W., Zinzani, P. L., Gaidano, G., Goy, A., Provencio, M., Nagy, Z., Robak, T., Maddocks, K., Buske, C., Ambarkhane, S., Winderlich, M., Dirnberger-Hertweck, M., Korolkiewicz, R., & Blum, K. A. (2018). Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(5), 1266–1272. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDY056>
- Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 65. <https://doi.org/10.1038/CDD.2017.186>

- Kantari, C., & Walczak, H. (2011). Caspase-8 and Bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4), 558–563. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2011.01.026>
- Kantarjian, H. M., Lioure, B., Kim, S. K., Atallah, E., Leguay, T., Kelly, K., Marolleau, J. P., Escoffre-Barbe, M., Thomas, X. G., Cortes, J., Jabbour, E., O'Brien, S., Bories, P., Oprea, C., Hatteville, L., & Dombret, H. (2016). A phase 2 study of coltuximab ravtansine (SAR3419) monotherapy in patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 16(3), 139. <https://doi.org/10.1016/J.CLML.2015.12.004>
- Kantarjian, H., Stein, A., Gökbüget, N., Fielding, A. K., Schuh, A. C., Ribera, J.-M., Wei, A., Dombret, H., Foà, R., Bassan, R., Arslan, Ö., Sanz, M. A., Bergeron, J., Demirkan, F., Lech-Maranda, E., Rambaldi, A., Thomas, X., Horst, H.-A., Brüggemann, M., ... Topp, M. S. (2017). Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 376(9), 836–847. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1609783>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in context. *Cell*, 170(6), 1062. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.028>
- Kelley, R. F., Totpal, K., Lindstrom, S. H., Mathieu, M., Billeci, K., DeForge, L., Pai, R., Hymowitz, S. G., & Ashkenazi, A. (2005). Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 2205–2212. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410660200>
- Kellner, C., Derer, S., Valerius, T., & Peipp, M. (2014). Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods*, 65(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.036>
- Kellner, C., & Peipp, M. (2013). Engineered antibody derivatives in preclinical and clinical development. *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*, 9781461471073, 251–284. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7107-3_10
- Kellner, C., Peipp, M., Gramatzki, M., Schrappe, M., & Schewe, D. M. (2018). Perspectives of Fc engineered antibodies in CD19 targeting immunotherapies in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncoimmunology*, 7(8), 1448331. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1448331>
- Kellner, C., Zhukovsky, E. A., Pötzke, A., Brüggemann, M., Schrauder, A., Schrappe, M., Kneba, M., Repp, R., Humpe, A., Gramatzki, M., & Peipp, M. (2013). The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. In *Leukemia* (Vol. 27, Issue 7, pp. 1595–1598). <https://doi.org/10.1038/leu.2012.373>
- Kennedy, G. A., Tey, S. K., Cobcroft, R., Marlton, P., Cull, G., Grimmett, K., Thomson, D., & Gill, D. (2002). Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *British Journal of Haematology*, 119(2), 412–416. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2002.03843.X>
- 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., Smith, M. A., Carol, H., Roberts, A. W., Huang, D. C. S., & Lock, R. B. (2016). Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia. *Blood*, 128(10), 1382. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-03-707414>
- Khodoun, M. V., Morris, S. C., Shao, W. H., Potter, C., Angerman, E., Kiselev, A., Yarawsky, A. E., Herr, A. B., Klausz, K., Otte, A., Peipp, M., & Finkelman, F. D. (2021). Suppression of IgE-mediated

- anaphylaxis and food allergy with monovalent anti-Fc ϵ R1 α monoclonal antibodies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(5), 1838. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.10.045>
- Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U., & Zhang, J. (2020). Antibody-drug conjugates: a comprehensive review. *Molecular Cancer Research*, 18(1), 3–19. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-19-0582>
- Klein, C., Jamois, C., & Nielsen, T. (2021). Anti-CD20 treatment for B-cell malignancies: current status and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 21(2), 161–181. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1822318>
- Klisovic, R. B., Leung, W. H., Brugger, W., Dirnberger-Hertweck, M., Winderlich, M., Ambarkhane, S. V., & Jabbour, E. J. (2021). 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*, 127(22), 4190–4197. <https://doi.org/10.1002/CNCR.33796>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 256:5517, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kontermann, R. E. (2009). Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*, 23(2), 93–109. <https://doi.org/10.2165/00063030-200923020-00003>
- Kontermann, R. E., & Brinkmann, U. (2015). Bispecific antibodies. *Drug Discovery Today*, 20(7), 838–847. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2015.02.008>
- Kreitman, R. J., Dearden, C., Zinzani, P. L., Delgado, J., Karlin, L., Robak, T., Gladstone, D. E., le Coutre, P., Dietrich, S., Gotic, M., Larratt, L., Offner, F., Schiller, G., Swords, R., Bacon, L., Bocchia, M., Bouabdallah, K., Breems, D. A., Cortelezzi, A., ... Giles, F. (2018). Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leukemia* 2018 32:8, 32(8), 1768–1777. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0210-1>
- Kretz, A. L., Trauzold, A., Hillenbrand, A., Knippschild, U., Henne-Bruns, D., von Karstedt, S., & Lemke, J. (2019). Trailblazing strategies for cancer treatment. *Cancers*, 11(4), 1–30. <https://doi.org/10.3390/cancers11040456>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734.
- Lang, P., Barbin, K., Feuchtinger, T., Greil, J., Peipp, M., Zunino, S. J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Niethammer, D., & Fey, G. H. (2004). Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood*, 103(10), 3982–3985. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-05-1735>
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., Hooley, J., Sherwood, S., Pai, R., Leung, S., Khan, L., Gliniak, B., Bussiere, J., Smith, C. A., Strom, S. S., ... Ashkenazi, A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine*, 7(4), 383–384. <https://doi.org/10.1038/86397>
- Legler, K., Hauser, C., Egberts, J. H., Willms, A., Heneweer, C., Boretius, S., Röcken, C., Glüer, C. C., Becker, T., Kluge, M., Hill, O., Gieffers, C., Fricke, H., Kalthoff, H., Lemke, J., & Trauzold, A. (2018). The novel TRAIL-receptor agonist APG350 exerts superior therapeutic activity in pancreatic cancer cells. *Cell Death & Disease*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/S41419-018-0478-0>

- Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Röder, C., Schütze, S., Wajant, H., Kalthoff, H., & Trauzold, A. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 88(7), 729–740. <https://doi.org/10.1007/S00109-010-0619-0>
- Lemke, J., Von Karstedt, S., Zinngrebe, J., & Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1350–1364. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.81>
- Leng, Y., Qiu, L., Hou, J., Zhao, Y., Zhang, X., Yang, S., Xi, H., Huang, Z., Pan, L., & Chen, W. (2016). Phase II open-label study of recombinant circularly permuted TRAIL as a single-agent treatment for relapsed or refractory multiple myeloma. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 86. <https://doi.org/10.1186/S40880-016-0140-0>
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1)
- Li, R., Yang, H., Jia, D., Nie, Q., Cai, H., Fan, Q., Wan, L., Li, L., & Lu, X. (2016). Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 228, 96–106. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.03.004>
- Lincoln, F. A., Imig, D., Boccellato, C., Juric, V., Noonan, J., Kontermann, R. E., Allgöwer, F., Murphy, B. M., & Rehm, M. (2018). Sensitization of glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by IAP- and Bcl-2 antagonism. *Cell Death & Disease* 2018 9:11, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1160-2>
- Li-Weber, M. (2015). Molecular mechanisms and anti-cancer aspects of the medicinal phytochemicals rocaglamides (=flavaglines). *International Journal of Cancer*, 137(8), 1791–1799. <https://doi.org/10.1002/IJC.29013>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstein, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C. C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G., Munoz-O'Regan, D., O'Donnell, S. L., Lapachet, E. S. G., Bengoechea, T., Fishwild, D. M., Carmack, C. E., Kay, R. M., & Huszar, D. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368(6474), 856–859. <https://doi.org/10.1038/368856A0>
- Longo, D. L., Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *NEJM*. <https://doi.org/10.1056/nejmra1400972>
- LoRusso, P., Ratain, M. J., Doi, T., Rasco, D. W., de Jonge, M. J. A., Moreno, V., Carneiro, B. A., Devriese, L. A., Petrich, A., Modi, D., Morgan-Lappe, S., Nuthalapati, S., Motwani, M., Dunbar, M., Glasgow, J., Medeiros, B. C., & Calvo, E. (2022). Eftozanermin alfa (ABBV-621) monotherapy in patients with previously treated solid tumors: findings of a phase 1, first-in-human study. *Investigational New Drugs*, 40(4), 762. <https://doi.org/10.1007/S10637-022-01247-1>
- MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S. L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D. B. J., Dyer, M. J. S., & Cohen, G. M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death and Differentiation*, 12(7), 773–782. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401649>

- MacFarlane, M., Kohlhaas, S. L., Sutcliffe, M. J., Dyer, M. J. S., & Cohen, G. M. (2005). TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Research*, 65(24), 11265–11270. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2801>
- Maeshima, A. M., Taniguchi, H., Nomoto, J., Maruyama, D., Kim, S. W., Watanabe, T., Kobayashi, Y., Tobinai, K., & Matsuno, Y. (2009). Histological and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy. *Cancer Science*, 100(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2008.01005.X>
- Matsumoto, A. K., Martin, D. R., Carter, R. H., Klickstein, L. B., Ahearn, J. M., & Fearon, D. T. (1993). Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(4), 1407. <https://doi.org/10.1084/JEM.178.4.1407>
- 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., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(5), 439. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1709866>
- McLaughlin, P., Grillo-López, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., & Dallaire, B. K. (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16(8), 2825–2833. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.8.2825>
- Mejstříková, E., Hrusak, O., Borowitz, M. J., Whitlock, J. A., Brethon, B., Trippett, T. M., Zugmaier, G., Gore, L., von Stackelberg, A., & Locatelli, F. (2017). CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer Journal*, 7(12). <https://doi.org/10.1038/S41408-017-0023-X>
- Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., & Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7046–7055. <https://doi.org/10.1128/mcb.00520-06>
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), 6851–6855. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.21.6851>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mühlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J. L., Schwenzer, R., Hauser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J., & Wajant, H. (2000). 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 32208–32213. <https://doi.org/10.1074/JBC.M000482200>
- Müller, N., Schneider, B., Pfizenmaier, K., & Wajant, H. (2010). Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4), 793–799. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.04.134>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9. Auflage). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>

- Nadler, L. M., Anderson, K. C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J. F., & Schlossman, S. F. (1983). B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 131(1).
- Nagata, S., Nakamura, N., Yatomi, T., Suda, T., & Tanaka, M. (1997). Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *Journal of Immunology*, 158(5), 2303–2309.
- Neumann, S., Hasenauer, J., Pollak, N., & Scheurich, P. (2014). Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16576. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.559468>
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., & Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 14(4), 607–623. <https://doi.org/10.1007/S10495-009-0321-2>
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 8(1), 34–47. <https://doi.org/10.1038/NRI2206>
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., & Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993 364:6440, 364(6440), 806–809. <https://doi.org/10.1038/364806a0>
- Olejniczak, S. H., Stewart, C. C., Donohue, K., & Czuczman, M. S. (2006). A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunological Investigations*, 35(1), 93–114. <https://doi.org/10.1080/08820130500496878>
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G. I., Gentz, R., & Dixit, V. M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277(5327), 815–818. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5327.815>
- Papadopoulos, K. P., Isaacs, R., Bilic, S., Kentsch, K., Huet, H. A., Hofmann, M., Rasco, D., Kundamal, N., Tang, Z., Cooksey, J., & Mahipal, A. (2015). Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2015 75:5, 75(5), 887–895. <https://doi.org/10.1007/S00280-015-2712-0>
- Phillips, D. C., Buchanan, F. G., Cheng, D., Solomon, L. R., Xiao, Y., Xue, J., Tahir, S. K., Smith, M. L., Zhang, H., Widomski, D., Abraham, V. C., Xu, N., Liu, Z., Zhou, L., DiGiammarino, E., Lu, X., Rudra-Ganguly, N., Trela, B., & Morgan-Lappe, S. E. (2021). Hexavalent TRAIL Fusion Protein Eftozanermin Alfa Optimally Clusters Apoptosis-Inducing TRAIL Receptors to Induce On-Target Antitumor Activity in Solid Tumors. *Cancer Research*, 81(12), 3402–3414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2178>
- Pietersz, G. A., Wenjun, L., Sutton, V. R., Burgess, J., McKenzie, I. F. C., Zola, H., & Trapani, J. A. (1995). In vitro and in vivo antitumor activity of a chimeric anti-CD19 antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 41(1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/BF01788960>
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., & Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 12687–12690. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.22.12687>
- Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature* , 183(4676), 1657–1659. <https://doi.org/10.1038/1831657a0>

- Press, O. W., Farr, A. G., Borroz, K. I., Anderson, S. K., & Martin, P. J. (1989). Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res*, 1989 Sep 1;49(17):4906-12.
- Przepiorka, D., Ko, C. W., Deisseroth, A., Yancey, C. L., Candau-Chacon, R., Chiu, H. J., Gehrke, B. J., Gomez-Broughton, C., Kane, R. C., Kirshner, S., Mehrotra, N., Ricks, T. K., Schmiel, D., Song, P., Zhao, P., Zhou, Q., Farrell, A. T., & Pazdur, R. (2015). FDA approval: blinatumomab. *Clinical Cancer Research*, 21(18), 4035–4039. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0612>
- Raponi, S., Stefania De Propriis, M., Intoppa, S., Laura Milani, M., Vitale, A., Elia, L., Perbellini, O., Pizzolo, G., Foà, R., & Guarini, A. (2011). Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leukemia and Lymphoma*, 52(6), 1098–1107. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.559668>
- Ravandi, F. (2019). How i treat philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 133(2), 130–136. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-08-832105>
- Ravetch, J. V., & Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annual Review of Immunology*, 19, 275–290. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.19.1.275>
- Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., & Anderson, D. R. (1994). Depletion of B Cells In Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. *Blood*, 83(2), 435–445. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V83.2.435.435>
- Rezvani, A. R., & Maloney, D. G. (2011). Rituximab Resistance. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 24(2), 203. <https://doi.org/10.1016/J.BEHA.2011.02.009>
- Robert Koch-Institut, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018* (13. Ausgabe).
- Roberts, A. W., Ma, S., Kipps, T. J., Coutre, S. E., Davids, M. S., Eichhorst, B., Hallek, M., Byrd, J. C., Humphrey, K., Zhou, L., Chyla, B., Nielsen, J., Potluri, J., Kim, S. Y., Verdugo, M., Stilgenbauer, S., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2019). Efficacy of venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia is influenced by disease and response variables. *Blood*, 134(2), 111–122. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2018882555>
- Roberts, N. J., Zhou, S., Diaz, L. A., Holdhoff, M., Roberts, N. J., Zhou, S., Diaz, L. A., & Holdhoff, M. (2011). Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget*, 2(10), 739–751. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.344>
- Rogers, L. M., Veeramani, S., & Weiner, G. J. (2014). Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunologic Research*, 59(1–3), 203–210. <https://doi.org/10.1007/S12026-014-8542-Z>
- Roßkopf, S., Eichholz, K. M., Winterberg, D., Diemer, K. J., Lutz, S., Münnich, I. A., Klausz, K., Rösner, T., Valerius, T., Schewe, D. M., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M., & Kellner, C. (2020). Enhancing CDC and ADCC of CD19 antibodies by combining Fc protein-engineering with Fc glyco-engineering. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 9(4), 63. <https://doi.org/10.3390/ANTIB9040063>
- Rowland, A. J., Pietersz, G. A., & McKenzie, I. F. C. (1993). Preclinical investigation of the antitumour effects of anti-CD19-idarubicin immunoconjugates. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 37(3), 195–202. <https://doi.org/10.1007/BF01525435>

- Rozanov, D., Spellman, P., Savinov, A., & Strongin, A. Y. (2015). A humanized leucine zipper-TRAIL hybrid induces apoptosis of tumors both in vitro and in vivo. *PloS One*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0122980>
- Samra, B., Jabbour, E., Ravandi, F., Kantarjian, H., & Short, N. J. (2020). Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and future directions. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00905-2>
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17(6), 1675–1687. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.6.1675>
- Scheuermann, R. H., & Racila, E. (1995). CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leukemia and Lymphoma*, 18(5–6), 385–397. <https://doi.org/10.3109/10428199509059636>
- Schewe, D. M., Alsadeq, A., Sattler, C., Lenk, L., Vogiatzi, F., Cario, G., Vieth, S., Valerius, T., Roskopf, S., Meyersieck, F., Alten, J., Schrappe, M., Gramatzki, M., Peipp, M., & Kellner, C. (2017). An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood*, 130(13), 1543–1552. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-01-764316>
- Schneider, B., Münkler, S., Krippner-Heidenreich, A., Grunwald, I., Wels, W. S., Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Gerspach, J. (2010). Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins. *Cell Death and Disease*, 1(8). <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.45>
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 0 2), S41. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2009.09.046>
- Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, Ö., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., & June, C. H. (2017). Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 377(26), 2545. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1708566>
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278–287. <https://doi.org/10.1038/nrc3236>
- Seifert, O., Plappert, A., Fellermeier, S., Siegemund, M., Pfizenmaier, K., & Kontermann, R. E. (2014). Tetravalent antibody-scTRAIL fusion proteins with improved properties. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1), 101–111. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0396>
- Sermer, D., & Brentjens, R. (2019). CAR T-cell therapy: full speed ahead. *Hematological Oncology*, 37(S1), 95–100. <https://doi.org/10.1002/HON.2591>
- Seymour, J. F., Kipps, T. J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D’Rozario, J., Assouline, S., Owen, C., Gerecitano, J., Robak, T., De la Serna, J., Jaeger, U., Cartron, G., Montillo, M., Humerickhouse, R., Punnoose, E. A., Li, Y., Boyer, M., Humphrey, K., Mobasher, M., & Kater, A. P. (2018). Venetoclax-rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(12), 1107–1120. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1713976>
- Shah, B. D., Ghobadi, A., Oluwole, O. O., Logan, A. C., Boissel, N., Cassaday, R. D., Leguay, T., Bishop, M. R., Topp, M. S., Tzachanis, D., O’Dwyer, K. M., Arellano, M. L., Lin, Y., Baer, M. R., Schiller, G. J., Park, J. H., Subklewe, M., Abedi, M., Minnema, M. C., ... Houot, R. (2021). KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-

- arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet (London, England)*, 398(10299), 491–502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01222-8)
- Shah, N. N., Bhojwani, D., August, K., Baruchel, A., Bertrand, Y., Boklan, J., Dalla-Pozza, L., Dennis, R., Hijiya, N., Locatelli, F., Martin, P. L., Mechinaud, F., Moppett, J., Rheingold, S. R., Schmitt, C., Trippett, T. M., Liang, M., Balic, K., Li, X., ... Wayne, A. S. (2020). Results from an international phase 2 study of the anti-CD22 immunotoxin moxetumomab pasudotox in relapsed or refractory childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 67(5). <https://doi.org/10.1002/PBC.28112>
- Shan, D., Ledbetter, J. A., & Press, O. W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*, 91(5), 1644–1652. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V91.5.1644>
- Siegemund, M., Pollak, N., Seifert, O., Wahl, K., Hanak, K., Vogel, A., Nussler, A. K., Göttisch, D., Munkel, S., Bantel, H., Kontermann, R. E., & Pfizenmaier, K. (2012). Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. *Cell Death & Disease*, 3(4), e295. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2012.29>
- Siegemund, M., Schneider, F., Hutt, M., Seifert, O., Müller, I., Kulms, D., Pfizenmaier, K., & Kontermann, R. E. (2018). IgG-single-chain TRAIL fusion proteins for tumour therapy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24450-8>
- Sill, H., Olipitz, W., Zebisch, A., Schulz, E., & Wölfler, A. (2011). Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British Journal of Pharmacology*, 162(4), 792. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2010.01100.X>
- Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22(47), 7359–7368. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1206939>
- Soria, J. C., Márk, Z., Zatloukal, P., Szyma, B., Albert, I., Juhász, E., Pujol, J. L., Kozielski, J., Baker, N., Smethurst, D., Hei, Y. J., Ashkenazi, A., Stern, H., Amler, L., Pan, Y., & Blackhall, F. (2011). Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4442–4451. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2623>
- Soria, J. C., Márk, Z., Zatloukal, P., Szyma, B., Albert, I., Juhász, E., Pujol, J. L., Kozielski, J., Baker, N., Smethurst, D., Hei, Y. J., Ashkenazi, A., Stern, H., Amler, L., Pan, Y., & Blackhall, F. (2017). Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Investigational New Drugs*, 36(2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/S10637-017-0536-Y>
- Soria, J. C., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C. P., Reese, D., Wiezorek, J., & Blackhall, F. (2010). Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), 1527–1533. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.4847>
- Sotillo, E., Barrett, D. M., Black, K. L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., Sussman, R., Lanauze, C., Ruella, M., Gazzara, M. R., Martinez, N. M., Harrington, C. T., Chung, E. Y., Perazzelli, J., Hofmann, T. J., Maude, S. L., Raman, P., Barrera, A., Gill, S., ... Thomas-Tikhonenko, A. (2015). Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discovery*, 5(12), 1282–1295. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1020>

- 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., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine* 2013 19:2, 19(2), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Spiess, C., Zhai, Q., & Carter, P. J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular Immunology*, 67(2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2015.01.003>
- Stanciu-Herrera, C., Morgan, C., & Herrera, L. (2008). Anti-CD19 and anti-CD22 monoclonal antibodies increase the effectiveness of chemotherapy in pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Research*, 32(4), 625. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2007.07.002>
- Stern, H. M., Padilla, M., Wagner, K., Amler, L., & Ashkenazi, A. (2010). Development of immunohistochemistry assays to assess GALNT14 and FUT3/6 in clinical trials of dulanermin and drozitumab. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(5), 1587–1596. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3108>
- Stiegelmaier, J., Bremer, E., Kellner, C., Liebig, T. M., Ten Cate, B., Peipp, M., Schulze-Koops, H., Pfeiffer, M., Bühring, H. J., Greil, J., Oduncu, F., Emmerich, B., Fey, G. H., & Helfrich, W. (2008). Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(2), 233–246. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0370-8>
- Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 2008 8:6, 8(6), 473–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>
- Sun, S. Y., Yue, P., Zhou, J. Y., Wang, Y., Choi Kim, H. R., Lotan, R., & Wu, G. S. (2001). Overexpression of Bcl2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 788–797. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4218>
- Suurs, F. v., Lub-de Hooge, M. N., de Vries, E. G. E., & de Groot, D. J. A. (2019). A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, 201, 103–119. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.04.006>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., Arber, D., Hasserjian, R., Le Beau, M., Orazi, A., & Siebert, R. (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Revised 4th Edition, Issue 19).
- Tahir, S. K., Calvo, E., Carneiro, B. A., Yuda, J., Shreenivas, A., Jongen-Lavrencic, M., Gort, E., Ishizawa, K., Morillo, D., Biesdorf, C., Smith, M., Cheng, D., Motwani, M., Sharon, D., Uziel, T., Modi, D. A., Buchanan, F. G., Morgan-Lappe, S., Medeiros, B. C., & Phillips, D. C. (2023). Activity of eftozanermin alfa plus venetoclax in preclinical models and patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 141(17), 2114–2126. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017333>
- 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. (2017). 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*, 130(Supplement 1), 2812–2812. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-136155>
- ten Cate, B., Bremer, E., de Bruyn, M., Bijma, T., Samplonius, D., Schwemmlin, M., Huls, G., Fey, G., & Helfrich, W. (2009). A novel AML-selective TRAIL fusion protein that is superior to

- Gemtuzumab Ozogamicin in terms of in vitro selectivity, activity and stability. *Leukemia*, 23(8), 1389–1397. <https://doi.org/10.1038/LEU.2009.34>
- Thomas, A., Teicher, B. A., & Hassan, R. (2016). Antibody–drug conjugates for cancer therapy. *The Lancet. Oncology*, 17(6), e254. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30030-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30030-4)
- Topp, M. S., Gökbuget, N., Stein, A. S., Zugmaier, G., O’Brien, S., Bargou, R. C., Dombret, H., Fielding, A. K., Heffner, L., Larson, R. A., Neumann, S., Foà, R., Litzow, M., Ribera, J. M., Rambaldi, A., Schiller, G., Brüggemann, M., Horst, H. A., Holland, C., ... Kantarjian, H. M. (2015). Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: A multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 16(1), 57–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71170-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71170-2)
- Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Röder, C., Kalthoff, H., & Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25(56), 7434–7439. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1209719>
- Trebing, J., El-Mesery, M., Schäfer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., Silence, K., & Wajant, H. (2014). CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death & Disease*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.555>
- Trněný, M., Verhoef, G., Dyer, M. J. S., Yehuda, D. ben, Patti, C., Canales, M., Lopez, A., Awan, F. T., Montgomery, P. G., Janikova, A., Barbui, A. M., Sulek, K., Terol, M. J., Radford, J., Guidetti, A., di Nicola, M., Siraudin, L., Hatteville, L., Schwab, S., ... Gianni, A. M. (2018). A phase II multicenter study of the anti-CD19 antibody drug conjugate coltuximab ravtansine (SAR3419) in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma previously treated with rituximab-based immunotherapy. *Haematologica*, 103(8), 1351–1358. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2017.168401>
- 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., Alnemri, E. S., Williams, W. V., & Doyle, M. L. (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors: DR5 is the highest affinity receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23319–23325. <https://doi.org/10.1074/JBC.M910438199>
- Uckun, F. M., Myers, D. E., Qazi, S., Ozer, Z., Rose, R., D’Cruz, O. J., & Ma, H. (2015). Recombinant human CD19L-sTRAIL effectively targets B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 1006–1018. <https://doi.org/10.1172/JCI76610>
- Uckun, F. M., Sun, L., Qazi, S., Ma, H., & Ozer, Z. (2011). Recombinant human CD19-ligand protein as a potent anti-leukaemic agent. *British Journal of Haematology*, 153(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2011.08583.X>
- Unverdorben, F., Richter, F., Hutt, M., Seifert, O., Malinge, P., Fischer, N., & Kontermann, R. E. (2016). Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *MAbs*, 8(1), 120. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1113360>
- Van Audenhove, I., & Gettemans, J. (2016). Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. *EBioMedicine*, 8, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2016.04.028>
- Vlasveld, L. T., Hekman, A., Vyth-Dreese, F. A., Melief, C. J. M., Sein, J. J., Voordouw, A. C., Delleman, T. A. M., & Rankin, E. M. (1995). Treatment of low-grade non-Hodgkin’s lymphoma with continuous infusion of low-dose recombinant interleukin-2 in combination with the B-cell-specific monoclonal antibody CLB-CD19. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 40(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/BF01517234>

- Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., Lee, D., Von Goetz, M., Yee, S. F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S. G., Amler, L., & Ashkenazi, A. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine* 2007 13:9, 13(9), 1070–1077. <https://doi.org/10.1038/nm1627>
- Wajant, H., Gerspach, J., & Pfizenmaier, K. (2005). Tumor therapeutics by design: Targeting and activation of death receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(1), 55–76. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2004.12.001>
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wüest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schönherr, U., Peters, N., Scheurich, P., & Pfizenmaier, K. (2001). 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 20:30, 20(30), 4101–4106. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204558>
- Walczak, H. (2013). Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008698>
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., & Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal*, 16(17), 5386. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.17.5386>
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. A. C. L., & Lynch, D. H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine*, 5(2), 157–163. <https://doi.org/10.1038/5517>
- Wang, H., Davis, J. S., & Wu, X. (2014). Immunoglobulin Fc domain fusion to TRAIL significantly prolongs its plasma half-life and enhances its antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3), 643–650. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0645>
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology* 2012 1:1, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>
- Wang, S. Y., Racila, E., Taylor, R. P., & Weiner, G. J. (2008). NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*, 111(3), 1456–1463. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-02-074716>
- Weiner, G. J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews. Cancer*, 15(6), 361. <https://doi.org/10.1038/NRC3930>
- Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/NRI2744>
- Weng, W. K., & Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(21), 3940–3947. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.05.013>
- Westphal, D., Kluck, R. M., & Dewson, G. (2013). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2014 21:2, 21(2), 196–205. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.139>

- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C.-P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. F., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., & Goodwin" ', R. G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, 673–662.
- Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J. M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G., & Ashkenazi, A. (2011). An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell*, 19(1), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.012>
- 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. (2021). Engineering of CD19 antibodies: A CD19-trail fusion construct specifically induces apoptosis in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) cells in vivo. *Journal of Clinical Medicine*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/jcm10122634>
- Wirt, T., Roskopf, S., Rösner, T., Eichholz, K. M., Kahrs, A., Lutz, S., Kretschmer, A., Valerius, T., Klausz, K., Otte, A., Gramatzki, M., Peipp, M., & Kellner, C. (2017). An Fc double-engineered CD20 antibody with enhanced ability to trigger complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 44(5), 292–300. <https://doi.org/10.1159/000479978>
- Wu, G., Burns, T., Zhan, Y., Alnemri, E., & El-Deiry, W. (1999). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Research*, 59(12):2770-5.
- Wu, Y., Giaisi, M., Köhler, R., Chen, W. M., Krammer, P. H., & Li-Weber, M. (2017). Rocaglamide breaks TRAIL-resistance in human multiple myeloma and acute T-cell leukemia in vivo in a mouse xenograft model. *Cancer Letters*, 389, 70–77. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.12.010>
- Wuchter, C., Krappmann, D., Cai, Z., Ruppert, V., Scheidereit, C., Dörken, B., Ludwig, W. D., & Karawajew, L. (2001). 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*, 15(6), 921–928. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2402131>
- Wynne, J., Wright, D., & Stock, W. (2019). Inotuzumab: from preclinical development to success in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances*, 3(1), 96–104. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2018026211>
- Xia, Z., Leng, Y., Fang, B., Liang, Y., Li, W., Fu, C., Yang, L., Ke, X., Jiang, H., Weng, J., Liu, L., Zhao, Y., Zhang, X., Huang, Z., Liu, A., Shi, Q., Gao, Y., Chen, X., Pan, L., ... Chen, W. (2023). Aponermin or placebo in combination with thalidomide and dexamethasone in the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma (CPT-MM301): a randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *BMC Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-023-11489-8>
- Xu, X., Sun, Q., Liang, X., Chen, Z., Zhang, X., Zhou, X., Li, M., Tu, H., Liu, Y., Tu, S., & Li, Y. (2019). Mechanisms of relapse after CD19 CAR T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia and its prevention and treatment strategies. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02664>
- Yan, C., Li, S., Li, Z., Peng, H., Yuan, X., Jiang, L., Zhang, Y., Fan, D., Hu, X., Yang, M., & Xiong, D. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cells as vehicles of CD20-specific TRAIL fusion protein delivery: a double-target therapy against non-Hodgkin's lymphoma. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 142–151. <https://doi.org/10.1021/MP300261E>

- Yazawa, N., Hamaguchi, Y., Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2005). Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15178. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0505539102>
- Yee, L., Fanale, M., Dimick, K., Calvert, S., Robins, C., Ing, J., Ling, J., Novotny, W., Ashkenazi, A., & III, H. B. (2007). A phase IB safety and pharmacokinetic (PK) study of recombinant human Apo2L/TRAIL in combination with rituximab in patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18_suppl), 8078–8078. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.25.18_SUPPL.8078
- Zang, F., Wei, X., Leng, X., Yu, M., & Sun, B. (2014). C-FLIP(L) contributes to TRAIL resistance in HER2-positive breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 267–273. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.05.106>
- Zhang, L., Zhu, H., Teraishi, F., Davis, J. J., Guo, W., Fan, Z., & Fang, B. (2005). Accelerated degradation of caspase-8 protein correlates with TRAIL resistance in a DLD1 human colon cancer cell line. *Neoplasia (New York)*, 7(6), 594. <https://doi.org/10.1593/NEO.04688>
- Zola, H., Macardle, P. J., Bradford, T., Weedon, H., Yasu, H., & Kurosawa, Y. (1991). Preparation and characterization of a chimeric CD19 monoclonal antibody. *Immunology and Cell Biology*, 69 (Pt 6)(6), 411–422. <https://doi.org/10.1038/ICB.1991.58>

6.2 Internetseiten

Datenbank zugelassener Antikörper:

<https://www.antibodysociety.org/antibody-therapeutics-product-data/>

Datenbank klinischer Studien:

<https://clinicaltrials.gov/>

Datenbank zugelassener Wirkstoffe in Europa:

<https://www.ema.europa.eu/en>

Liste monoklonaler Antikörper des Paul-Ehrlich-Instituts:

<https://www.pei.de/DE/arzneimittel/antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html;jsessionid=0B6947896EE708E592F5C4B0EA6DA866.intranet211>

7 Zusammenfassung

Die Therapie von B-Zell-Neoplasien wie der akuten B-lymphatischen Leukämie (B-ALL) hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht und die Prognose für Patientinnen/Patienten deutlich verbessert. Dies beruht teilweise auf besseren Kenntnissen über potente Kombinationen von Chemotherapeutika sowie auf Fortschritten im Bereich der Stammzelltransplantation. Besonders die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe wie *small molecules*, modifizierte T-Zellen mit artifiziellen, chimären Antigenrezeptoren (CAR) oder neuartige mABs hat in der Therapie der B-ALL neue Möglichkeiten eröffnet. Trotz der erzielten klinischen Erfolge sprechen nicht alle Patientinnen/Patienten gut auf die Therapie mit mABs an und Rezidive stellen nach wie vor ein Problem dar. Besonders für Patientinnen/Patienten, die unter Therapie mit CAR-T-Zellen oder T-Zell-aktivierenden bispezifischen Antikörpern schwere Nebenwirkungen aufwiesen, besteht weiterhin großer Bedarf nach neuen, gut verträglichen Therapiestrategien.

CD19 wurde aufgrund seines vorteilhaften Expressionsmusters als attraktives Zielantigen für die Therapie der B-Vorläuferzell-ALL identifiziert. Native CD19-gerichtete Antikörper waren allerdings nur begrenzt wirksam. Eine Strategie für die verbesserte Wirksamkeit von Antikörpern besteht in deren Kopplung mit Zelltod-induzierenden Substanzen, sodass die Antikörper spezifisch die Zelltod-induzierende Fracht zu den Tumorzellen transportieren. Dabei ist ein attraktiver Ansatz die Herstellung von Fusionsproteinen aus Tumorzell-gerichteten Antikörpern und humanen Liganden für DRs wie dem *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). TRAIL aktiviert DRs auf Tumorzellen und induziert darüber Apoptose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das hochaktive Fusionsprotein CD19-scTRAIL aus einem CD19-IgG1-Antikörper und einer optimierten, einzelkettigen Variante aus drei in Reihe angeordneten TRAIL-Untereinheiten (scTRAIL) hergestellt, um spezifisch TRAIL-Rezeptoren auf Tumorzellen zu aktivieren und darüber B-ALL Zellen zu eliminieren. Hierzu wurde scTRAIL an eine schwere Kette eines heterodimer-bildenden CD19-IgG1-Antikörpers fusioniert. Dafür wurden zunächst entsprechende Expressionsvektoren kloniert und erfolgreich exprimiert und gereinigt. Durchflusszytometrisch wurde eine antigenabhängige Bindung von CD19-scTRAIL auf CD19-positiven prä-B-ALL-Zelllinien nachgewiesen. CD19-scTRAIL induzierte bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen potent Apoptose in zwei etablierten B-ALL-Zelllinien *in vitro*. Dieser pro-apoptotische Effekt war streng abhängig von der Bindung der Fusionsproteine am Zielantigen CD19 auf der Tumorzelloberfläche.

Die durchgeführten *in vitro* Versuche zeigen das therapeutische Potenzial CD19-gerichteter TRAIL-Fusionsproteine zur Therapie der B-ALL, welche in Zukunft eine Tumorzell-spezifische, gut verträgliche Therapieoptionen bei der B-ALL darstellen könnten.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Krebs in Deutschland.	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers.	6
Abbildung 3: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.	7
Abbildung 4: Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.	9
Abbildung 5: Stadien-spezifische Expression von Oberflächenantigenen während der B-Zell-Entwicklung.	13
Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch TRAIL.	17
Abbildung 7: Wirkungsweise Tumorzell-gerichteter TRAIL-Fusionsproteine am Beispiel von scFv:sTRAIL.	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Antikörper-scTRAIL-Fusionsproteine.	40
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die schwere Ketten-Untereinheit ohne scTRAIL des heterodimeren CD19-scTRAIL (pSEC-HC-CD19-Der1).	41
Abbildung 10: Restriktionsanalyse des klonierten, für die schwere Kette ohne scTRAIL des Fusionsproteins CD19-scTRAIL kodierenden Expressionsvektors pSEC-HC-CD19-Der1.	42
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die scTRAIL-tragende schwere Ketten-Untereinheit des heterodimeren CD19-scTRAIL (pSEC-HC-CD19-Der2-scTRAIL).	43
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die schwere Ketten-Untereinheit ohne scTRAIL des heterodimeren HER2-scTRAIL (pSEC-HC-HER2-Der1).	44
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsvektors für die scTRAIL-tragende schwere Kette des heterodimeren HER2-scTRAIL (pSEC-HC-HER2-Der2-scTRAIL).	44
Abbildung 14: Restriktionsanalyse der klonierten, für die schweren Ketten des heterodimeren Fusionsproteins HER2-scTRAIL kodierenden Expressionsvektoren.	45
Abbildung 15: Analyse der konsekutiven Elutionsfraktionen der heterodimeren Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL durch SDS-PAGE.	47
Abbildung 16: Analyse der gereinigten heterodimeren Fusionsproteine CD19-scTRAIL und HER2-scTRAIL durch SDS-PAGE.	47
Abbildung 17: Proteinchromatographie und Coomassie-gefärbte SDS-Gele der heterodimeren Konstrukte.	49
Abbildung 18: SDS-PAGE und Western Blot der Fusionsproteine nach SEC unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen.	50

Abbildung 19: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von CD19-scTRAIL auf CD19-positiven B-ALL-Zelllinien.	52
Abbildung 20: Wachstumsinhibition von B-ALL-Zellen durch CD19-scTRAIL.	53
Abbildung 21: Blockade der Wachstumsinhibition im MTT-Assay.	54
Abbildung 22: Nachweis der Apoptose-Induktion in B-ALL-Zellen durch CD19-scTRAIL.	55
Abbildung 23: Apoptose-Nachweis mittels Detektion pro-apoptotischer Proteinspaltprodukte im Western Blot.	56

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	21
Tabelle 2: Labormaterialien	22
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Medien	24
Tabelle 5: Plasmide.....	25
Tabelle 6: Enzyme.....	25
Tabelle 7: Kits	26
Tabelle 8: Oligonukleotide	26
Tabelle 9: Bakterienstämme	26
Tabelle 10: Zelllinien.....	27
Tabelle 11: Zellkulturmedien.....	27
Tabelle 12: Antikörper.....	27
Tabelle 13: Computerprogramme.....	28
Tabelle 14: Western Blot Protokoll	35

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maren Oßwald, geboren am 10.02.1995 in Konstanz, die hier vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel sowie direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche ausgewiesen. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Des Weiteren erkläre ich, dass ich bisher an keiner anderen Stelle ein medizinisches Promotionsverfahren beantragt oder mich einem solchen erfolglos unterzogen habe.

Ort, Datum

Maren Oßwald

10 Publikation

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.

11 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Kellner für das spannende Promotionsthema, für die angenehme und ausgesprochen kompetente Betreuung, für seine Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit und seine große Verfügbarkeit trotz der räumlichen Distanz nach München. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp für die Mitbetreuung meiner Arbeit und seine fortwährende, freundliche Unterstützung. Beiden bin ich sehr dankbar für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki, welcher zu Beginn meiner Arbeit die Sektion für Stammzell- und Immuntherapie der Inneren Medizin II leitete und mir ermöglichte, meine Arbeit am Dr. Mildred-Scheel-Haus zu beginnen, und Frau Prof. Dr. Claudia Baldus, welche anschließend die Direktion der Klinik für Innere Medizin II übernahm.

Der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel danke ich für deren Förderung meiner Forschungstätigkeit in Form eines Promotionsstipendiums. Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie) und seiner Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. Denis M. Schewe (ALL-BFM-Studienzentrale, Klinik für Allgemeine Pädiatrie) und seiner Arbeitsgruppe sowie Frau Prof. Dr. Anna Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung) für die wertvolle Kooperation. Außerdem danke ich dem Institut für klinische Molekularbiologie in Kiel für die durchgeführten Sanger-Sequenzierungen.

Sehr dankbar bin ich für das tolle Labor-Team des Dr. Mildred-Scheel-Hauses: Die Postdocs Dr. Katja Klausz, Dr. Anna Otte und Dr. Thies Rösner waren stets ansprechbar und bereit, mir mit ihrer großen wissenschaftlichen Erfahrung beratend zur Seite zu stehen. Auch die anderen Doktorandinnen/Doktoranden und Master-Studierenden, unter anderem Sebastian Lutz, Steffen Krohn, Carina Gehlert, Ammelie Boje, Lea Ebinger, Amir Karimzadeh-Tabrizi, Niklas Baumann und Hauke Wilken, waren mir stets eine große Hilfe und trugen entscheidend zur angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor und dem motivierenden Teamgefühl bei. Ganz besonders hervorheben möchte ich hier Dorothee Winterberg, die mich all die Jahre sehr unterstützte, immer ansprechbar war und mir so oft motivierend zur Seite stand. Auch den fleißigen Technischen Assistentinnen Anja Muskulus, Britta von Below, Anna Böttiger und Kathrin Richter gilt mein großer Dank für ihre freundliche Anleitung, ihre Einweisung in die Laborarbeit und Hilfestellung bei zahlreichen Experimenten.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie und den vielen anderen wunderbaren Menschen, welche mich in allen Phasen der Arbeit immer wieder motiviert und unterstützt haben. Ganz besonders großer Dank gibt meiner Mutter und meinem Vater, die mir immer stärkend im Rücken stehen, und meiner

großen Schwester. Und ich danke meinem Onkel Martin für seine wiederholte Ermutigung, diese Arbeit nicht fertigzustellen, wodurch er immer wieder meinen Ehrgeiz geweckt hat.