

Aus dem
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Kinderheilkunde m.S. Onkologie und Hämatologie
Direktorin: Professorin Dr. med. Angelika Eggert

Habilitationsschrift

Neue Therapieansätze für die Behandlung Embryonaler Tumoren im Kindesalter

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pädiatrie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Annette Künkele
Geboren in Pforzheim

Eingereicht:	Mai 2018
Dekan:	Professor Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in	Prof. Dr. Rupert Handgretinger, Tübingen
2. Gutachter/in	Prof. Dr. Holger Lode, Greifswald

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
1.1. Embryonale Tumore im Kindesalter	5
1.2. TP53 Signalweg	6
1.3. Adoptive T-Zelltherapie	8
2. Eigene Arbeiten	11
2.1. Pharmakologische Aktivierung des TP53 Signalweges durch Nutlin-3 bewirkt anti-tumorale Effekte im Medulloblastom	11
2.2. RITA zeigt anti-tumorale Aktivität im Medulloblastom unabhängig des <i>TP53</i> Status	24
2.3. Reaktivierung des TP53 Signalweges durch den neuartigen MDM2 Inhibitor DS-3032b als therapeutische Option für das Hochrisiko-Neuroblastom	36
2.4. Funktionelle Optimierung von CAR-T-Zellen deckt Signalschwelle auf, die deren anti-tumorale Aktivität aufgrund von Fas-FasL-abhängigem Aktivierungs- induzierten Zelltod abschwächt	54
2.5. Präklinische Beurteilung CD171-gezielter adoptiver CAR-T-Zelltherapie für das Neuroblastom: CE7 Epitop Sicherheit und Machbarkeit der Produktherstellung	68
3. Diskussion	83
4. Zusammenfassung	89
5. Literaturangaben	91
6. Danksagung	95
7. Erklärung	97

Abkürzungen

ALK	„Anaplastic lymphoma kinase“
ATMP	„Advanced Therapy Medicinal Product“, Arzneimittel für neuartige Therapie
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CTLA-4	„cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4“, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
CRISPR	„clustered regularly interspaced short palindromic repeats“
CRS	„Cytokine Release Syndrome“, Zytokinfreisetzungssyndrom
EGFRt	„truncated epidermal growth factor receptor“, trunkierter epidermaler Wachstumsfaktor
FcR γ	Fc Rezeptor gamma Kette
GMP	„good manufacturing process“
ITCC	„Innovative Therapies for Children with Cancer“, Innovative Therapien für Kinder mit Krebs
JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinasen/stress-aktivierte Phosphokinase
kg	Kilogramm
MDM2	„murine double minute-2“
mAb	„monoclonal antibody“, monoklonaler Antikörper
MTD	maximal tolerierte Dosis
MYCN	„Myelocytomatosis oncogene cellular homolog neuroblastoma“
PBMZ	Periphere mononukleäre Zellen des Bluts
PD-1	„programmed cell death 1“
PD-L1	„programmed cell death ligand 1“
scFv	„single chain variable fragment“
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	„Smoothened“
TP53	Tumorprotein p53
TMU	Tumormikroumgebung
TNM	Tumor Nodus Metastasen

1. Einleitung

Mein wissenschaftliches Interesse besteht darin, neue Therapieansätze zur Verbesserung der Heilungsrate für Kinder mit neuroektodermalen Tumoren zu entwickeln. Dieses spezielle Interesse entwickelte sich aus meinem anfänglich breiten Interesse an der Onkologie, das bereits vor meinem Medizinstudium bestand. Während der Patient mein zentraler Fokus bleibt, glaube ich, dass wir einen Punkt in der pädiatrischen Krebsforschung erreicht haben, wo Therapieerfolge nur weiter verbessert werden können, wenn folgende drei Punkte adressiert werden:

- 1) Es muss ein ausgeprägtes Wissen und Verständnis der molekularen Genetik und der zellulären Mechanismen/Signalwege, welche Krebs vorantreiben, vorliegen.
- 2) Dieses Wissen muss genutzt werden, um neue Tumor-gerichtete „*small molecules*“ zu entwickeln, sie präklinisch zu evaluieren und konsequent in frühen pädiatrischen Studien einzusetzen.
- 3) Es muss untersucht werden, ob eine Kombination dieser neuen tumorspezifischen Medikamente mit innovativen immuntherapeutischen Behandlungsoptionen zielführend ist.

1.1 Embryonale Tumore im Kindesalter

Embryonale Tumore entstehen durch Entartung unreifer Zellen (Blasten) während der embryonalen Organ- und Gewebeentwicklung und werden daher auch als Blastome bezeichnet. Zu ihnen gehören unter anderem das Medulloblastom und das Neuroblastom, welche beide aus primitiven neuroektodermalen Zellen des Nervensystems hervorgehen und histologisch als zelldichte klein-, rund- und blauzellige Tumore imponieren. Embryonale Tumore können bereits bei der Geburt vorhanden sein oder treten vorwiegend innerhalb der ersten 5 Lebensjahre auf.

Das **Medulloblastom** ist der häufigste bösartige Hirntumor im Kindesalter¹. Die Prognose besonders von Patienten mit Metastasen, postoperativem Resttumor oder ungünstigem histologischen Subtyp ist trotz multimodaler Therapieansätze wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie weiterhin schlecht². Medulloblastome werden nach molekularbiologischen und klinischen Parametern in 4 Gruppen eingeteilt, welche ebenfalls Einfluss auf die Prognose haben: WNT-, Sonic hedgehog (SHH)-, Gruppe-3- und Gruppe-4-Medulloblastome³. Während Patienten mit Medulloblastomen des WNT-Subtyps ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von über 90% aufweisen, haben Patienten mit einem Medulloblastom der Gruppe-3 ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von nur 40-60%⁴. Im Fokus der Entwicklung neuer Therapien steht die Hemmung spezifischer Signalwege, wie z.B. des

TP53/MDM2-Signalweges (siehe 1.2) oder des Hedgehog-Signalweges. Ein Einzelheilversuch bei einem 26 Jahre alten Patienten mit dem oral verfügbaren SMO-Antagonisten Vismodegib (GDC-0449) zeigte ein beeindruckendes Ansprechen, das aufgrund einer raschen Resistenzentwicklung leider nur vorübergehend war⁵. Eine laufende klinische Phase-I/II-Studie untersucht die Effektivität und Sicherheit von Vismodegib in der Behandlung Erwachsener mit therapierefraktärem oder rezidiviertem Medulloblastom (NCT01601184). Die Verwendung von Inhibitoren spezifischer Signalwege könnte eine wirksame Therapieoption darstellen und vielleicht einige der schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie sie bei der derzeitigen Behandlung auftreten, vermeiden.

Das **Neuroblastom** ist der häufigste bösartige Tumor bei Kindern. Der klinische Verlauf ist sehr heterogen mit >95% Überleben bei Kindern, die der Niedrigrisiko-Gruppe zugeordnet werden (Stadium 1, 2 und 4s) und somit wenig oder keine Therapie erhalten, und >50% Mortalität bei Kindern, die zur Hochrisiko-Gruppe gehören (Stadium 4) und eine intensive multimodale Therapie erhalten. Die Polychemotherapie ruft anfänglich ein gutes Ansprechen hervor, aber im Verlauf kommt es häufig aufgrund einer minimalen Resterkrankung zur Ausbreitung einiger weniger resistenter Tumorzellen. In dieser Rezidivsituation hat eine konventionelle Chemotherapie wenig Erfolg. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich molekulare Merkmale klinisch aggressiver, metastasierter Neuroblastome von denen therapieempfindlicher Tumoren unterscheiden. Klinische und molekulare Risikofaktoren umfassen (1) Patientenalter, (2) Tumorstadium, (3) MYCN-Amplifikation, (4) ALK-Mutation und (5) Deletionen von 1p, 3p und 11q⁶⁻⁸. Präklinische Studien zu molekular gezielten Therapieansätzen, u.a. mit Inhibitoren von Bromodomän-Proteinen oder „*Targeting*“-Molekülen, die MYCN destabilisieren, sind vielversprechend⁹. Molekularbasierte Phase-I-Studien mit ALK-wirksamen Medikamenten wie *LDK378* oder *Crizotinib* sind noch nicht abgeschlossen, aber die Therapieeffekte scheinen aufgrund sekundärer Resistenzentwicklung ebenfalls nur vorübergehend zu sein. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapien und integrativer Behandlungsprotokolle, die gezielte Ansätze zur Verringerung der Resistenzentwicklung bei embryonalen Tumoren miteinander kombinieren.

1.2 TP53 Signalweg

In der Tumorgenese spielt die Inaktivierung des Tumorsuppressors TP53 eine große Rolle. Dabei kann die Aktivität von TP53 durch eine Mutation von TP53 selbst oder durch deregulierende Komponenten des TP53-Signalweges inhibiert sein. Während TP53-

Mutationen in ca. 35% aller Krebsarten vorkommen, treten sie bei embryonalen Tumoren, wie dem Medulloblastom oder dem Neuroblastom, nur selten auf¹⁰⁻¹³. So weisen weniger als 10% der Medulloblastome und weniger als 2% der Neuroblastome eine TP53-Mutation auf. Allerdings liegen vermutlich andere Mechanismen vor, die zu einer TP53-Signalweg Inaktivierung führen¹⁴⁻¹⁷. In anderen Krebsarten, die einen Wildtyp-TP53 aufweisen, wurde beobachtet, dass die TP53-Inaktivierung durch einen schnellen proteasomalen Abbau von TP53 durch die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 vermittelt wird und eine Amplifikation oder Überexpression von MDM2 vorliegt, die somit zu einem erhöhten Abbau von TP53 führt¹⁸⁻²⁰. Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung von Inhibitoren der MDM2-TP53-Interaktion, welche die TP53-Funktion in Tumoren mit Wildtyp-TP53 wiederherstellen sollten. Einer der ersten identifizierten Inhibitoren war **Nutlin-3**, welcher selektiv an die TP53-Interaktionsdomäne von MDM2 bindet und somit die Ubiquitinierung und den Abbau von TP53 verhindert²¹. Während es normalerweise schwierig ist, „small-molecule“ Inhibitoren nicht-enzymatischer Protein-Protein Interaktionen zu entwickeln, weist die kristalline Struktur von MDM2 eine Tasche auf, an welche diese Inhibitoren binden und dadurch die Interaktion von MDM2 und TP53 verhindern können. Die Wirksamkeit der Nutlins, deren Namen sich aus der Stadt, in der sie entwickelt wurden, nämlich Nutley, New Jersey und dem Begriff Inhibitor zusammensetzt, konnte *in vitro* und *in vivo* gegen Kolonkarzinom- und Osteosarkomzelllinien gezeigt werden.

Ein weiterer Inhibitor, **RITA**, bindet im Gegensatz zu Nutlin-3 an den N-Terminus von TP53 selbst und induziert eine Konformationsänderung, welche die Interaktion mit MDM2 hemmt. Dabei bindet RITA in einem ersten schnellen Schritt direkt an TP53 und führt in einem zweiten langsameren Schritt zu der oben beschriebenen Konformationsänderung, welche die Bindung an MDM-2 verhindert, dadurch die Halbwertszeit von TP53 erhöht und zu einer Ansammlung von TP53 in der Tumorzelle führt^{22,23}. Es konnte außerdem in Kolonkarzinomzelllinien gezeigt werden, dass die Konformationsänderung die Bindung zu weiteren Proteinen, wie zum Beispiel iASPP und Parc blockiert. Ein Mechanismus, der ebenfalls zur anti-proliferativen Wirkung von RITA beitragen könnte. So fand sich in Mammakarzinomen eine iASPP Überexpression, die zu einer Einschränkung der TP53 Funktion und einer damit verbundenen Resistenzentwicklung führte²⁴. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Parc durch eine Komplexbildung mit TP53 ebenfalls die apoptotische Wirkung von TP53 in Neuroblastomzelllinien aufhebt²⁵.

DS-3032b, eine neue oral verfügbare Verbindung auf Dispiropyrrolidin-Basis, ist mittlerweile 10-fach so stark wie Nutlin-3 und führt ebenfalls zur TP53-induzierten Apoptose in

verschiedenen Krebsentitäten mit Wildtyp-TP53 (unter anderem akute myeloische Leukämie, Osteosarkom und Melanom) aufgrund einer Hemmung der MDM2-TP53-Interaktion²⁶. Im Gegensatz zu den anderen beiden MDM2/TP53-Inhibitoren wird DS-3032b bereits in Phase-I-Studien eingesetzt. Die bislang aufgetretenen Nebenwirkungen in Patienten mit rezidivierten/refraktären hämatologischen Neoplasien manifestierten sich als Myelosuppression, Nephro- und Gastrointestinaler Toxizität und waren akzeptabel. Erste vorläufige Ergebnisse waren vielversprechend und weitere Studien für Patienten mit soliden Tumoren oder rezidiviertem/refraktärem multiplen Myelom wurden initiiert (siehe www.clinicaltrials.gov).

Aufgrund der biologischen und klinischen Bedeutung der phänotypisch eingeschränkten TP53-Funktion bei embryonalen Tumoren, entschlossen wir uns die oben genannten drei Inhibitoren der MDM2-TP53-Interaktion im Medulloblastom und Neuroblastom zu testen. Drei Manuskripte, welche die Ergebnisse der erstmaligen präklinischen Testung von Nutlin-3 und RITA im Medulloblastom und der erstmaligen präklinischen Testung von DS-3032b im Neuroblastom untersucht haben, sind Teil dieser Habilitationsschrift.

1.3 Adoptive T-Zelltherapie

Die gezielte Behandlung von Tumoren durch adoptive T-Zelltherapie ist ein vielversprechender innovativer Ansatz, der das Immunsystem nutzt, metastatische und chemoresistente Tumorzellen zu bekämpfen. Eine Form der T-Zelltherapie verwendet chimäre Antigenrezeptoren (CARs), um T-Zellen in die Lage zu versetzen, tumorspezifische Antigene zu erkennen und die antigenpräsentierende Zelle zu zerstören. CARs sind synthetische Rezeptoren, die aus einem einkettigen variablen Fragment (scFv) eines für ein Tumorantigen spezifischen monoklonalen Antikörpers, einem sogenannten „spacer“, einer Transmembrandomäne, CD3ζ und keiner (erste Generation), einer (zweite Generation) oder mehrerer (dritte Generation) intrazellulärer T-Zell-co-stimulierender Signalmoleküle bestehen (Abbildungen 1 und 2)^{27,28}.

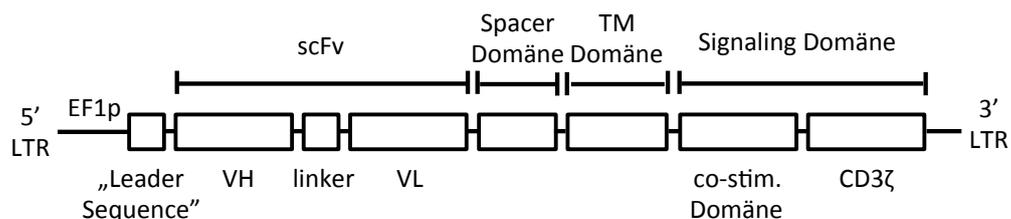


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines CARs. scFv=„single chain variable Fragment“, TM=transmembran, VH=V „domain of heavy chain“, VL=V „domain of light chain“, co-stim.=co-stimulatorisch.

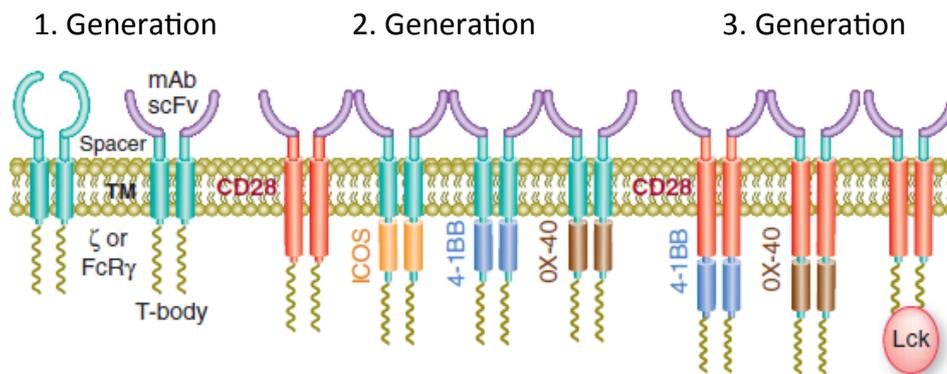


Abbildung 2. Schematische Darstellung von CARs der 1., 2. und 3. Generation. mAb=monoklonaler Antikörper, scFv=„single chain variable Fragment“, TM=transmembran, FcRγ=FcRezeptor gamma Kette. Modifiziert nach Sadelain et al²⁹.

Während die scFv für die spezifische Erkennung der Antigen-tragenden Tumorzelle sorgt, sichert die Transmembrandomäne eine Verankerung des CARs auf der Oberfläche der T-Zelle. Nachdem die Bindung an das Antigen erfolgt ist, sind die intrazellulären Signalmolekülen für die Aktivierung, Proliferation und Persistenz der CAR-T-Zelle verantwortlich.

Für die Herstellung von **CAR-T-Zellen** ist die Gewinnung autologer peripherer mononukleärer Zellen des Bluts (PBMZ) durch eine Apherese notwendig. Anschließend werden entweder eine bestimmte Anzahl an PBMZ oder eine aus dem PBMZ isolierte Fraktion an CD3, CD4 oder CD8 positiven Zellen mit CD3/CD28-spezifischen „beads“ aktiviert und expandiert. Je nach Herstellungsprozess erfolgt ein, zwei oder drei Tage später die Transduktion der Zellen mit dem CAR. Hierfür werden retro- oder lentivirale Ansätze genutzt, welche die genetische Information für den CAR auf die T-Zellen übertragen und stabil in deren Genom einbauen. Dadurch ist sicher gestellt, dass die Information für den CAR bei einer Teilung der T-Zelle an die Tochterzelle weiter gegeben wird. Nach mehreren Tagen einer *ex vivo* Kultur in speziellen, mit verschiedenen Zytokinen angereicherten Medien werden die CAR-T-Zellen „geerntet“ und entweder direkt dem Patienten verabreicht oder zunächst einmal kryokonserviert. Vor der CAR-T-Zellinfusion erhält der Patient eine Konditionierung, die mittlerweile zumeist aus den lymphodepletierenden Substanzen Cyclophosphamid und Fludarabin besteht. Dies führt zu einer Reduzierung der körpereigenen Lymphozyten und schafft somit Raum für die Expansion der CAR-T-Zellen.

CAR-T-Zellprodukte werden in Deutschland zu den Arzneimitteln für neuartige Therapien (ATMPs) gerechnet, so dass bestimmt gesetzliche und regulatorische Anforderungen bei ihrer Herstellung erfüllt sein müssen. Innerhalb der ATMPs fallen CAR-T-Zellprodukte in die

Arzneimittel-Produktklasse der Gentherapeutika, da sie eine zusätzliche genetische, für den CAR codierende Sequenz enthalten.

Die adoptive T-Zelltherapie mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen ist bei Patienten mit Lymphomen³⁰ und Leukämien hochwirksam³¹⁻³³, aber gleiche Erfolge konnten für Patienten mit soliden Tumoren bislang nicht erzielt werden. Dass auch embryonale Tumore prinzipiell gut auf Immuntherapien ansprechen, zeigen vor allem die Daten einer klinischen Phase-III-Studie für den neuroblastomspezifischen Antikörper ch14.18, welcher gegen das Gangliosid GD2 gerichtet ist³⁴.

Ein weiteres einheitlich auf der Oberfläche von primären und metastatischen Neuroblastomzellen exprimiertes Antigen ist CD171, auch bekannt als L1CAM³⁵; seine Expression korreliert mit der Tumorprogression und Metastasierung bei vielen Krebsarten³⁶⁻³⁹, und hilft bei der Regulierung der Differenzierung, Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen^{38,40,41}. Ein gegen das CE7-Epitop von CD171 gerichteter monoklonaler Antikörper wurde aus Mäusen erzeugt⁴², die zuvor mit humanen Neuroblastomzellen immunisiert wurden. Die Entwicklung eines entsprechenden CARs der ersten Generation basierend auf der scFv dieses Antikörpers führte Anfang 2000 zu einer „*First-in-Man*“-Studie bei Kindern mit rezidiertem Neuroblastom⁴³. Kein Patient erlebte unerwünschte Nebenwirkungen, aber die Wirksamkeit und Persistenz der CAR-T-Zellen war begrenzt, wahrscheinlich zurückzuführen auf die Verwendung eines CAR-Konstrukts der ersten Generation und der somit fehlenden co-stimulatorischen Signalmolekülen. Zwei Manuskripte, welche die Entwicklung und präklinische Testung neuroblastomspezifischer CARs der zweiten und dritten Generation beschreiben, sind Teil dieser Habilitationsschrift.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Pharmakologische Aktivierung des TP53 Signalweges durch Nutlin-3 bewirkt anti-tumorale Effekte im Medulloblastom

Künkele A., De Preter K., Heukamp L., Thor T., Pajtler K.W., Hartmann W., Mittelbronn M., Grotzer M.A., Deubzer H.E., Speleman F., Schramm A., Eggert A., Schulte J.H.

Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas

Neuro Oncol 2012; 14: 859-69. doi:10.1093/neuonc/nos115

Im Rahmen dieses Projektes untersuchten wir, ob eine Behandlung mit Nutlin-3 die TP53-Funktion in Medulloblastomen wiederherstellen kann und somit eine Therapieoption für Medulloblastome darstellt, welche ein Wildtyp-TP53 in Gegenwart von hoher MDM2-Aktivität besitzen. Dafür untersuchten wir verschiedene etablierte humane Medulloblastomzelllinien auf ihren TP53 Status und, zusammen mit primären Tumoren, auf das Vorliegen einer MDM2-Amplifikation oder -Überexpression. Wir testeten die Wirksamkeit des MDM2-Inhibitors Nutlin-3 gegenüber Medulloblastomzellen mit Wildtyp-TP53 oder TP53-Mutation in Zellkulturmodellen und als Xenotransplantate in Nacktmäusen und konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Nutlin-3 in der Lage ist, die Aktivität von TP53 in Medulloblastomen mit Wildtyp-TP53 und erhöhtem MDM2 wiederherzustellen. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der unter 2.1 genannten Arbeit:

„Medulloblastome machen 20% der kindlichen Hirntumoren aus. Mit einem Gesamtüberleben von 40% - 70% ist ihre Behandlung immer noch eine Herausforderung. Der Mehrzahl der Medulloblastome fehlen TP53-Mutationen, aber selbst bei Krebserkrankungen, die ein Wildtyp-TP53 beibehalten, wird die Tumorüberwachungsfunktion von TP53 durch das Onkoprotein MDM2 inhibiert. Die Deregulierung der MDM2/TP53-Balance führt zur malignen Transformation. Wir analysierten die MDM2-mRNA- und -Protein-Expression in primären Medulloblastomen und normalem Kleinhirn und bestimmten den Mutationsstatus von TP53 und MDM2 in 6 Medulloblastom-Zelllinien. Die MDM2-Expression war bei Medulloblastomen im Vergleich zum Kleinhirn erhöht. Vier von 6 Medulloblastom-Zelllinien exprimierten ein Wildtyp-TP53 und besaßen hohe MDM2-Spiegel. Die tumorfördernde TP53-MDM2-Interaktion kann durch das kleine Molekül Nutlin-3, das die TP53-Funktion wiederherstellt, inhibiert werden. Das gezielte Angreifen der TP53-MDM2-Achse unter Verwendung von Nutlin-3 verringerte die Lebensfähigkeit der Zellen signifikant und induzierte entweder Zellzyklusarrest oder

Apoptose und die Expression des TP53-Zielgens p21 in diesen 4 Zelllinien. Im Gegensatz dazu waren DAOY- und UW-228-Zellen, die *TP53*-Mutationen besitzen, durch die Behandlung mit Nutlin-3 nahezu unbeeinträchtigt. MDM2-Knockdown in Medulloblastomzellen durch siRNA ahmte die Behandlung mit Nutlin-3 nach, während die Expression von dominant negativem TP53 die Wirkung von Nutlin-3 aufhob. Die orale Nutlin-3-Behandlung von Mäusen mit etablierten Medulloblastom-Xenotransplantaten hemmte das Tumorwachstum und erhöhte signifikant das Überleben der Tiere. Somit reduzierte Nutlin-3 die Vitalität der Medulloblastomzellen *in vitro* und *in vivo* durch Reaktivierung der TP53-Funktion. Wir schließen daraus, dass die Hemmung der MDM2-TP53-Interaktion mit Nutlin-3 eine vielversprechende therapeutische Option für Medulloblastome mit funktionellem TP53 ist, die in klinischen Studien weiter evaluiert werden sollte.“ (Übersetzung durch die Autorin)

<https://doi.org/10.1093/neuonc/nos115>

2. 2 RITA zeigt anti-tumorale Aktivität im Medulloblastom unabhängig des TP53 Status

Gottlieb A., Althoff K., Grunewald L., Thor T., ODersky A., Schulte M., Deubzer H.E., Heukamp L., Eggert A., Schramm A., Schute J.H., **Künkele A.**

RITA displays anti-tumor activity in medulloblastomas independent of TP53 status

Oncotarget 2017, 8(17):27882-27891. doi: 10.18632/oncotarget.15840

Nachdem wir für das Medulloblastom zeigen konnten, dass die Hemmung der MDM2-TP53-Interaktion mit Nutlin-3 eine vielversprechende therapeutische Option für Medulloblastome mit Wildtyp-TP53 ist, wollten wir untersuchen, ob sich neuere Moleküle auch für Tumore mit TP53-Mutationen eignen. Als Inhibitor der MDM2-TP53-Interaktion wählten wir RITA, ein kleines Molekül, das seinen Namen von „Reaktivierung von TP53 und Induktion von Tumorzellapoptose“ ableitet. Frühere Untersuchungen anderer Gruppen konnten nicht nur zeigen, dass RITA gegen Kolonkarzinom- und Osteosarkomzelllinien wirksam war, sondern auch gegen Tumore, die bereits eine Resistenz gegenüber standardmäßig eingesetzten Medikamenten entwickelt hatten⁴⁴. Es wurde besonders für diese resistenten Tumore die initiale Annahme angezweifelt, dass RITA nur eine therapeutische Wirksamkeit besitzt, wenn ein intaktes Wildtyp-TP53 vorliegt. Weilbacher et al zeigten, dass RITA über eine Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinasen/stress-aktivierte Phosphokinasen (JNK/SAPK) und p38 auch unabhängig von TP53 Tumorzellen vernichten kann⁴⁵. Mit unseren Untersuchungen konnten wir erstmals zeigen, dass eine Behandlung mit RITA, unabhängig des TP53 Status, einen therapeutischen Effekt auf Medulloblastomzellen hat. Wir erbrachten somit den ersten präklinischen Beweis, dass RITA auch zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden kann, deren Medulloblastome eine TP53-Mutation besitzen. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der unter 2.2 genannten Arbeit:

„Die derzeitige Therapie des Medulloblastoms, des häufigsten malignen Hirntumors im Kindesalter, erreicht eine Überlebensrate von 40-70%. Sekundäre Chemotherapieresistenz trägt zu einem Therapieversagen bei, bei dem die Funktionsstörung des TP53 eine Schlüsselrolle spielt. Die MDM2-Wechselwirkung mit TP53 führt zu dessen Abbau. Die Reaktivierung der TP53-Funktionalität durch „*small molecule*“ Inhibitoren wie RITA zur Unterbrechung der TP53-MDM2-Bindung könnte therapeutisches Potenzial haben. Wir zeigen hier, dass RITA die Viabilität aller 4 analysierten Medulloblastom-Zelllinien unabhängig des TP53-Funktionsstatus verringert. Die Abnahme der Zellviabilität wurde in 3 der 4 Medulloblastom-Zelllinien durch Akkumulation von TP53-Protein in den Zellen und erhöhter CDKN1A-Expression begleitet. RITA-Behandlung in Mausmodellen hemmte das Medulloblastom-Xenograft-Tumorwachstum. Diese Daten zeigen, dass die Behandlung mit

RITA die Überlebensrate von Medulloblastomzellen sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* Modellen reduziert und unabhängig vom zellulären *TP53*-Status wirkt. Wir konnten somit RITA als potenzielles Therapeutikum zur Behandlung von Medulloblastomen identifizieren.“
(Übersetzung durch die Autorin)

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15840>

2.3 Reaktivierung des TP53 Signalweges durch den neuartigen MDM2 Inhibitor DS-3032b als therapeutische Option für das Hochrisiko-Neuroblastom

Arnhold V., Schmelz K., Proba J., Winnkler A., Wünschel J., Toedling J., Deubzer H.E., **Künkele A.**, Eggert A., Schulte J.H., Hundsdoerfer P.

Reactivating TP53 signaling by the novel MDM2 inhibitor DS-3032b as a therapeutic option for high-risk neuroblastoma

Oncotarget 2018, 9(2):2304-2319. doi: 10.18632/oncotarget.23409

Neben dem Medulloblastom zählt auch das Neuroblastom zu den embryonalen Tumoren. Es weist ebenfalls nur selten TP53 Mutationen auf, so dass wir auch für diese Tumorentität die Möglichkeit einer MDM2-TP53 gerichteten Therapie evaluieren wollten. Als Medikament wählten wir DS-3032b, welches bereits Einsatz in klinischen Phase-I-Studien für Erwachsene mit multiplem Myelom, Leukämien und Lymphomen findet (siehe www.clinicaltrials.gov). Die im Rahmen dieser klinischen Studien gemachten Erfahrungen werden helfen, den Einsatz von DS-3032b auch in der Behandlung pädiatrischer Patienten zu untersuchen. In der folgenden Arbeit evaluierten wir den therapeutischen Effekt von DS-3022b auf Neuroblastomzellen und generierten erste vielversprechende präklinische Daten für einen möglichen Einsatz von DS-3022b in frühen klinischen Studien für Kinder mit primär refraktärem oder rezidiertem Neuroblastom. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der unter 2.3 genannten Arbeit:

„Weniger als 50% der Patienten mit Hochrisiko-Neuroblastom sind fünf Jahre nach der Diagnose mit aktuellen Behandlungsprotokollen am Leben. Zielgerichtete molekulare Therapien sollen das Überleben verbessern. Obwohl MDM2 als ein vielversprechendes Ziel in präklinischen Modellen validiert wurde, sind noch keine MDM2-Inhibitoren für Neuroblastom-Patienten in klinische Studien aufgenommen worden. Toxische Nebenwirkungen, schlechte Bioverfügbarkeit und geringe Wirksamkeit der verfügbaren MDM2-Inhibitoren, die in Phase I/II Studien eingetreten sind, treiben die Entwicklung neuer MDM2-Inhibitoren mit einem verbesserten Risiko-Nutzen-Profil voran. Wir untersuchten die Wirkung des neuen MDM2-Inhibitors DS-3032b auf Lebensfähigkeit, Proliferation, Seneszenz, Migration, Zellzyklusarrest und Apoptose in einer Gruppe von sechs Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen von *TP53* und *MYCN* und bewerteten die Wirksamkeit in einem murinen subkutanen Hochrisiko-Neuroblastom Modell. Re-Analyse der vorhandenen Expressionsdaten von 476 primären Neuroblastomen zeigte, dass ein hoher Level an MDM2 mit einer schlechten Überlebensrate

der Patienten korreliert. Die DS-3032b-Behandlung erhöhte die TP53-Zielgenexpression und induzierte G1-Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose. CRISPR-vermittelter MDM2-Knockout in Neuroblastomzellen imitierte die DS-3032b-Behandlung. Die TP53-Signalgebung wurde in Neuroblastomzellen mit Wildtyp-*TP53* unabhängig von der Anwesenheit von *MYCN*-Amplifikation selektiv durch DS-3032b aktiviert, wurde jedoch durch *TP53*-Mutationen oder die Expression einer dominant-negativen TP53-Mutante signifikant reduziert. Die orale Verabreichung von DS-3032b inhibierte das Xenograft-Tumorwachstum und verlängerte das Überleben der Mäuse. Unsere *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, dass DS-3032b die TP53-Signalgebung sogar in Gegenwart von *MYCN*-Amplifikation in Neuroblastomzellen reaktiviert, um die proliferative Kapazität zu reduzieren und Zytotoxizität zu verursachen.“ (Übersetzung durch die Autorin)

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23409>

2.4 Funktionelle Optimierung von CAR-T-Zellen deckt Signalschwelle auf, die deren anti-tumorale Aktivität aufgrund von Fas-FasL-abhängigem Aktivierungs-induzierten Zelltod abschwächt

Künkele A., Johnson A.J., Rolczynski L.S., Chang C.A., Hoglund V., Kelly-Spratt K.S., Jensen M.C.

Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8⁺ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas–FasL-Dependent AICD

Cancer Immunol Res 2015b; 3: 368-79. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0200

Therapien, die das Immunsystem nutzen, um gezielt Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören, sind eindeutig auf dem Vormarsch. CAR-T-Zellen, die das für B-Zell Leukämien typische Antigen CD19 erkennen, zeigen außerordentliche Erfolge in klinischen Phase-I/II-Studien und eine klinische Studie, die bei nicht vorhandenem passendem Familienspender CAR-T-Zelltherapie gegen allogene Stammzelltransplantation randomisiert, ist in den USA in Planung. Um die CAR-T-Zelltherapie auch bei Patienten mit Neuroblastom anwenden zu können, entwickelten wir verschiedene CAR-Konstrukte, welche die T-Zellen in die Lage versetzen, CE7 zu erkennen, ein Epitop des neuroblastomspezifischen Antigens CD171. Dabei konstruierten und analysierten wir CAR-Konstrukte, die sich sowohl in ihrem sogenannten „*spacer*“ unterscheiden, der den Abstand zwischen Tumor- und T-Zelle bestimmt, als auch in ihrer co-stimulatorischen Domäne, die eine zusätzliche Aktivierung und Persistent der CAR-T-Zellen bewirken soll. Wir konnten zeigen, dass beide Komponenten die CAR-T-Zell-Effektorfunktion beeinflussten und dass die CAR-T-Zellen mit dem langen „*spacer*“, während sie die höchste Effektorfunktion *in vitro* zeigen, *in vivo* aufgrund von Fas / FasL-vermitteltem Zelltod vollständig versagten. Aufgrund einer in der CAR-Sequenz enthaltenen trunkierten Form des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFRt) waren wir in der Lage, den auf den T-Zellen exprimierten CAR nachzuweisen und die CAR⁺ T-Zellen über magnetische Separation anzureichern. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der unter 2.4 genannten Arbeit:

„Die Entwicklung eines CARs ist auf die Auswahl von Konstrukten ausgerichtet, welche die größte Stärke an T-Zell-Funktionen hervorrufen. Wir zeigen hier, dass CAR Komponenten von extrazellulären „*spacern*“ und intrazellulären Signaldomänen in zusammen wirkender Weise die Größe der Aktivierung CD8⁺-zytotoxischer T-Lymphozyten für Tumorzell-Lyse und Zytokin-Sekretion modulieren. Überraschenderweise zeigen CAR-Konstrukte, welche die höchste *in-vitro*-Aktivität erzeugen, entweder durch extrazelluläre „*spacer*“-Längenabstimmung oder durch Hinzufügen intrazellulärer Signalmoleküle, eine

abgeschwächte Antitumor-Wirksamkeit *in vivo* („hyperaktive CARs“). CARs hingegen, die auf moderate Signalausgaben abgestimmt sind, bewirken eine Tumor-Eradikation („hypoaktive CARs“). Die wiederholte CAR-Triggerung macht zytotoxische T-Lymphozyten, die hyperaktive CARs exprimieren, sehr anfällig für aktivierungsinduzierten Zelltod aufgrund einer verstärkten FasL-Expression. Die CAR-Optimierung unter Verwendung von Kombinationen extrazellulärer „spacer“ und intrazellulärer Signalldomänen, die aktivierungsinduzierten Zelltod von CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten begrenzen, kann ein kritischer Parameter sein, um eine klinische Aktivität gegen solide Tumore zu erreichen.“ (Übersetzung durch die Autorin)

<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0200>

2.5 Präklinische Beurteilung CD171-gezielter adoptiver CAR-T Zelltherapie für das Neuroblastom: CE7 Epitop Sicherheit und Machbarkeit der Produktherstellung

Künkele A., Taraseviciute A., Finn L.S., Johnson A.J., Berger C., Finney O., Chang C.A., Rolczynski L.S., Brown C., Mgebroff S., Berger M., Park J.R., Jensen M.C.

Preclinical assessment of CD171-directed CAR T cell adoptive therapy for childhood neuroblastoma: CE7 epitope target safety and product manufacturing feasibility

Clin Cancer Res 2017; 23(2):466-477. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0354

Basierend auf der in der vorangehenden Arbeit gezeigten Effektorfunktion der CD171-spezifischen CAR-T-Zellen gegenüber Neuroblastom-Zelllinien *in vitro* und *in vivo*, führten wir eine Sicherheitsstudie an nicht-humanen Primaten durch und initiierten eine klinische Phase-I-Studie für Kinder mit primär refraktärem oder rezidiviertem Neuroblastom im Seattle Children's Hospital, USA. Bei der Studie handelt es sich um eine Dosisescalierungsstudie, in welcher die Patienten CD171-spezifische CAR-T-Zellen mit kurzem „spacer“ der zweiten (Arm A) oder der dritten (Arm B) Generation erhalten (Clinical Trial.Gov; IND FDA # 16139). Zur Herstellung der autologen CAR-T-Zellen ist die Isolation, Aktivierung, lentivirale Transduktion und Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen notwendig, die zu Beginn von stark vorbehandelten Patienten mittels Apherese gewonnen werden müssen. Besonders war hier vor allem die getrennte Transduktion und Expansion CD171-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ CAR-T-Zellen in verschiedenen Zytokinkombinationen, welche die weltweit einzigartige Gabe eines Endproduktes in einem definierten 1:1 Verhältnis von CD4:CD8 ermöglichte. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung a) eines *on-target off-tumor* Effektes von CD171-spezifischen CAR-T-Zellen in einem nicht-humanen Primatenmodell, sowie b) der Machbarkeit der Herstellung und funktionelle *in vitro* / *in vivo* Testung von CD171-spezifischen Zweit- und Drittgenerations CAR-T-Zellen der ersten fünf in die klinische Studie eingeschlossenen Patienten. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der unter 2.5 genannten Arbeit:

„Hintergrund: Die Identifizierung und Überprüfung zelloberflächentumor-restringierter Epitope für die CAR-T-Zell-Immuntherapie ist Gegenstand einer intensiven Untersuchung. Wir haben uns auf CD171 (auch bekannt als L1-CAM) konzentriert, ein reichlich auf Neuroblastomen vorhandenes Zelloberflächenmolekül und dabei speziell auf das Glykosylierungs-abhängige tumorspezifische Epitop, das vom CE7 monoklonalen Antikörper erkannt wird.

Experimentelles Design: Die CD171-Expression wurde durch IHC unter Verwendung von CE7-

mAb in Tumor-Microarrays von primären, metastatischen und rezidierten Neuroblastomen sowie menschlichen und Rhesus-Makaken-Geweben beurteilt. Die Sicherheit der Applikation von CAR-T-Zellen, die spezifisch das CE7-Epitop von CD171 erkennen, wurde in einem präklinischen Rhesus-Makaken-Versuch auf der Basis der CD171-Homologie und CE7-Kreuzreaktivität evaluiert. Die Machbarkeit der Herstellung funktioneller CAR-T-Zellen aus stark vorbehandelten pädiatrischen Patienten mit rezidierten/refraktären Erkrankungen wurde untersucht.

Ergebnisse: CD171 wird einheitlich und reichlich von Neuroblastom-Tumorproben exprimiert, die bei Diagnosen und Rezidiven unabhängig von der klinischen Risikogruppe des Patienten entnommen wurden. Die Expression von CD171 in normalen Geweben ist bei Menschen und Rhesusmakaken ähnlich. Eine Infusion von bis zu 1×10^8 / kg CE7-CAR⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten in Rhesusmakaken bewirkte keine Anzeichen einer spezifischen Toxizität außerhalb des Tumors. Die Herstellung von lentiviral transduzierten CD4⁺- und CD8⁺-CE7-CAR-T-Zell-Produkten unter GMP war bei 4 von 5 nacheinander eingeschlossenen Neuroblastom-Patienten in einer Phase-I-Studie erfolgreich. Alle vier CE7-CAR-T-Zell-Produkte zeigten *in vitro* und *in vivo* Antitumoraktivität.

Schlussfolgerungen: Unsere präklinische Bewertung des CE7-Epitops von CD171 unterstützt dessen Nutzen und Sicherheit als CAR-T-Zell-Ziel für die Neuroblastom-Immuntherapie.“
(Übersetzung durch die Autorin)

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0354>

3. Diskussion

Trotz deutlichem Anstieg der Heilungschancen in der pädiatrischen Onkologie in den letzten 50 Jahren, haben Kinder mit einem refraktären oder rezidierten Medulloblastom oder Neuroblastom weiterhin nur eine geringe Chance auf Heilung^{46,47}. Nicht zu vernachlässigen sind auch die schweren Langzeitfolgen, wie z.B. eingeschränktes Wachstum, Infertilität, Kardiotoxizität, Ototoxizität oder Zweitmalignome, die gerade die Strahlentherapie oder die Hochdosistherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation verursachen und die Patienten für den Rest ihres Lebens einschränken können⁴⁸⁻⁵⁰. Viel Zuversicht wird in die Entwicklung gezielter Therapien gesteckt, die in der Lage sind, differenzierter zwischen malignen und gesunden Zellen zu unterscheiden. Im Bereich der ektodermalen Tumoren sind dies vor allem die sogenannten „*small molecules*“, deren Wirkung auf der Inhibition bestimmter Signalwege beruht. Ein besonders interessanter Signalweg in den neuroektodermalen Tumoren ist der TP53/MDM2-Signalweg, der in diesen überwiegend Wildtyp-TP53 tragenden Tumorentitäten funktionell eingeschränkt ist. Eine Wiederherstellung der TP53 Tumorsuppressorfunktion durch Blockade der Interaktion zwischen TP53 und MDM2 ist ein vielversprechender Ansatz, der sowohl von akademischen als auch von pharmazeutischen Einrichtungen verfolgt wird. Untersuchungen zeigen, dass TP53 in der Lage zu sein scheint, gezielt Tumorzellen zu zerstören ohne einen negativen Effekt auf gesunde Zellen zu haben. Grinkevich et al postulieren, dass dies auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass Tumorzellen im Vergleich zu nicht-malignen Zellen eine besondere Empfindlichkeit gegenüber „*small molecules*“ besitzen, die eine Herstellung der TP53 Funktion bewirken²³. Ihrer Meinung nach, greift TP53 gezielt Onkogene an und schaltet Überlebensprogramme aus, von denen die Existenz der Tumorzellen abhängt.

Während molekular gezielte Medikamente bei Erwachsenen bereits breit in klinischen Phase-I/II-Studien eingesetzt und untersucht werden, ist die Zahl pädiatrischer Studien nach wie vor limitiert. Wir haben deshalb den möglichen Einsatz von „*small molecules*“, die den TP53/MDM2 Signalweg zum Ziel haben, in den beiden pädiatrischen Tumorentitäten Medulloblastom und Neuroblastom präklinisch in Zellkultur- und Mausmodellen untersucht. Die Ergebnisse waren für beide Tumorentitäten sehr vielversprechend. Besonders die neue Erkenntnis, dass manche dieser Inhibitoren, wie z.B. RITA, vor allem auch in Tumoren mit Wildtyp-TP53 wirksam sind, liefert die Grundlage für die Planung zukünftiger klinischer Studien für Kinder mit Medulloblastom oder Neuroblastom. Zusammen mit Frau Prof. Dr. A. Eggert, Direktorin der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie und Koordinatorin der nationalen Hochrisiko- und Rezidivstudien zum Neuroblastom, werden wir

den Einsatz von Inhibitoren des TP53/MDM2 Signalwegs in Phase-I/II-Studien für Kinder mit primär refraktärem und/oder rezidiviertem Neuroblastom beziehungsweise Medulloblastom unter dem Dach des europaweiten ITCC-Verbundes (siehe www.itcc-consortium.org) für frühe klinische Studien in der pädiatrischen Onkologie weiter vorantreiben.

Leider lassen die Daten der aktuellen klinischen Studien, die bei Erwachsenen durchgeführt werden, vermuten, dass die Therapieerfolge der „*small molecules*“ bei Anwendung als Einzelsubstanz nur vorübergehend sind und es zu Resistenzentwicklungen in den Tumoren kommt^{51,52}. Betrachtet man die Geschichte der bisherigen Chemotherapie, ist dies nicht überraschend. Erst die Applikation mehrerer verschiedener Chemotherapeutika innerhalb kurzer Zeit, brachte den Durchbruch⁵³. Neben der Möglichkeit mehrere „*small molecules*“ miteinander zu kombinieren, besteht auch die Möglichkeit, sie mit anderen Therapieformen, wie z.B. innovativen Immuntherapien zu kombinieren. Immuntherapien wie Antikörper, Checkpoint-Inhibitoren oder genetisch modifizierte CAR-T-Zellen befinden sich auf dem Vormarsch^{54,55}. Bislang wurden mehr als 300 klinische CAR-T-Zellstudien durchgeführt und allein im Jahr 2017 wurden weltweit über 80 weitere Studien initiiert (siehe www.clinicaltrials.gov). Am erfolgreichsten war hier die CD19-spezifische CAR-T-Zelltherapie, die bei 81% austerapierteter Kinder mit B-Zelleukämie zu einem vollständigen Ansprechen nach 3 Monaten führte³³. Das Antigen CD19 ist bislang einzigartig, denn trotz seiner Präsenz auf gesunden B-Zellen lässt sich ein mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen verbundener „*on-target off-tumor*“ Effekt in Kauf nehmen. So leiden Patienten, deren CD19-spezifischen CAR-T-Zellen persistieren, an einem B-Zell-Mangel, welcher die regelmäßige Substitution von Immunglobulinen zur Infektprophylaxe notwendig macht. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen der CAR-T-Zelltherapie sind das Zytokinfreisetzungssyndrom (CRS) und die Neurotoxizität. Aufgrund der Antigenerkennung durch den CAR, kommt es zunächst zu einer raschen Aktivierung und Expansion der CAR-T-Zellen, welche mit einer Freisetzung von Zytokinen einhergeht und somit zu einem CRS führen kann⁵⁶. Das CRS geht einher mit Fieber und Herz-Kreislauf-Störungen, die den Einsatz von Kreislauf-unterstützenden Medikamenten auf Intensivstationen notwendig machen können und vereinzelt auch zum Tod geführt haben⁵⁷. Ebenfalls tödlich war für vereinzelte Patienten die durch CAR-T-Zellgabe verursachte Neurotoxizität, die zu schweren Hirnödemen führte⁵⁸. Die meisten Fälle an Neurotoxizitäten gingen jedoch mit vorübergehenden Kopfschmerzen, Halluzinationen und Krampfanfällen einher und führten zu keinen bleibenden Schäden. Diese mit der Aktivierung und vor allem Expansion der CAR-T-Zellen assoziierten und zum Teil schwersten Nebenwirkungen machen deutlich, dass CAR-T-Zellen nicht wie übliche Medikamente eine

Halbwertszeit haben, sondern die Fähigkeit zur Expansion besitzen, was mit einer Wirkstofferrhöhung einhergeht. Dies unterstreicht die Notwendigkeit und Sicherstellung, dass diese Form der Krebstherapie nur von besonders geschultem medizinischen Personal an spezialisierten Zentren angewandt werden sollte.

Ein zu CD19 äquivalentes und genauso erfolgversprechendes Antigen konnte in soliden Tumoren bislang noch nicht identifiziert werden. Wir entwickelten einen CAR, der das neuroblastomspezifische Antigen CD171 erkennt. CD171 wird zwar auch von gesundem Gewebe wie z.B. Niere und Haut exprimiert, aber durch eine Glykosylierung des CD171 Epitops CE7, wird es zu einem tumorspezifischen Antigen. Wird die Glykosylierung unterbunden, kann auch der Antikörper, auf dessen scFv der CAR aufgebaut ist, nicht mehr an das Antigen binden⁵⁹. Es ist anzunehmen, dass für solide Tumore solche Modifizierungen zwischen Tumor-spezifität und „*on-target off-tumor*“ Effekten verantwortlich sein werden. So konnten Alvarez-Rueda *et al* zeigen, dass die o-Acetylierung von GD2 die Tumorspezifität des GD2-Antikörpers deutlich erhöht und die Nebenwirkungen, die mit einer Erkennung von GD2, das von gesundem Gewebe exprimiert wird, assoziiert werden, deutlich abgeschwächt werden konnten⁶⁰. Unter Verwendung der das glykosylierte CE7 Epitop erkennenden scFv, entwickelten wir verschiedene CAR-Konstrukte, die sich bezüglich „*spacer*“ und co-stimulatorischer Domäne unterscheiden und führten präklinische *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durch. Als Vorbereitung für die geplante klinische Studie führten wir zusätzlich eine Sicherheitsstudie durch, in der wir Lymphozyten aus Makaken entnommen, mit unserem CD171-spezifischen CAR transduziert und in die Makaken re-infundiert haben. Da das humane CD171, das von gesundem Gewebe exprimiert wird, homolog zu Makaken-CD171 ist, eignete sich dieses *in vivo* Modellsystem sehr gut für Untersuchungen zu möglichen „*on-target off-tumor*“ Nebenwirkungen. Bei Injektion haben wir 10- und 100-fach höhere Dosen verwendet, als für die erste Dosis im Rahmen der Studie vorgesehen war. Die engmaschige klinische und laborchemische Überwachung der Tiere zeigte keine Toxizitäten, die auf eine Erkennung „gesunden CD171“ durch unsere CAR-T-Zellen schließen ließ. Basierend auf all diesen Daten initiierten wir eine klinische Phase-I-Studie, in welcher Kinder mit primär therapierefraktärem und/oder rezidiertem Neuroblastom mit CD171-spezifischen CAR-T-Zellen der zweiten oder dritten Generation behandelt werden. Es handelt sich dabei um eine Dosiseskaliierungsstudie zur Festlegung der maximal tolerierten Dosis (MTD) an applizierten CAR-T-Zellen. Aktuell sind 18 Patienten in die Studie eingeschlossen und 15 Patienten behandelt worden. Die MTD wurde bislang noch nicht erreicht und erste Daten bezüglich Machbarkeit der Herstellung der

neuroblastomspezifischen CAR-T-Zellen, deren Persistenz und Funktionalität sind vielversprechend (Veröffentlichung in Vorbereitung).

Trotzdem ist die Behandlung vieler Patienten mit soliden Hochrisiko-Tumoren nach wie vor eine große Herausforderung in der pädiatrischen Onkologie und es besteht die Möglichkeit, dass auch CAR-T-Zellen von einer Kombination mit sogenannten „*small molecules*“ profitieren können. Eine Studie könnte zum Beispiel die zeitgleiche Applikation eines TP53/MDM2-Inhibitors mit CAR-T-Zellen vorsehen. Wir konnten bereits erste Daten generieren, dass eine Kombination von indirekten Inhibitoren des *MYCN* Onkogens, welches eine große Rolle in Pathogenese und Malignität von Neuroblastomen spielt, mit CAR-T-Zellen zu einer Verbesserung sowohl der Wirkung der *MYCN*-Inhibitoren als auch der CAR-T-Zellen führte. Allerdings muss für alle Kombinationstherapien präklinisch gründlich untersucht werden, ob die Funktion der CAR-T-Zellen durch weitere Medikamente inhibiert und dadurch geschwächt anstatt verstärkt wird und umgekehrt. Zukünftige Untersuchungen, die diese synergistischen oder antagonistischen Effekte untersuchen, werden essentiell sein. Eine weitere Möglichkeit, die CAR-T-Zelltherapie für solide Tumore zu verbessern, ist die Berücksichtigung und therapeutische Adressierung von „Immunescape“-Mechanismen in der Tumorumgebung. Wir wissen, dass solide Tumore von verschiedenen Immun- und Stromazellen infiltriert werden (unter anderem T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen, Makrophagen und Fibroblasten) und bezeichnen die Gesamtheit dieser Nicht-Tumorzellen als Tumormikroumgebung (TMU). Frühe Daten beim Kolonkarzinom zeigten, dass die Dichte und die Verteilung der Immunzellen innerhalb des Tumors einen signifikanten prognostischen Wert haben und der TNM-Klassifikation in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der Prädiktion der Prognose überlegen sind⁶¹. Im Neuroblastom wurde publiziert, dass die Dichte von Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten im Primärtumor mit dem klinischen Verlauf korreliert⁶². Die Zellen der TMU sind mit einer Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen sowie entzündlichen und zytotoxischen Mediatoren beladen, die ihrerseits negativen Einfluss auf Aktivierung, Funktion und Persistenz der CAR-T-Zellen haben können. Verschiedene therapeutische Strategien, wie zum Beispiel die sogenannten Checkpoint Inhibitoren zielen darauf ab, eine Tumor-fördernde TMU zu blockieren⁶³. Sie verhindern die Interaktion zwischen den inhibitorischen auf T-Zellen exprimierten Molekülen (zum Beispiel CTLA-4 und PD-1) und ihren Liganden und verstärken somit die anti-tumorale Antwort von T-Zellen. Besonders in Tumoren mit einer hohen Mutationslast, wie dem Melanom oder nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, konnten Checkpoint Inhibitoren vielversprechende und

anhaltende Erfolge erzielen^{64,65}. Pädiatrische Tumore weisen eine signifikant geringere Mutationslast auf und scheinen auf Grund dessen weniger auf Checkpoint Inhibitoren anzusprechen^{66,67}. Wir konnten zeigen, dass Neuroblastomzelllinien in Gegenwart CD171-spezifischer CAR-T-Zellen den Liganden von PD-1, PD-L1, hochregulieren und somit die Effektivität der CAR-T-Zellen deutlich beeinträchtigen. Die Untersuchung einer Kombinationstherapie bestehend aus neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zellen und Inhibitoren des PD-1/PD-L1 Signalweges sind Gegenstand meiner aktuellen Forschung.

Im Jahr 2017 erfolgte durch die amerikanische Arzneimittelbehörde die Zulassung von zwei CD19-spezifischen CAR-T-Zellprodukten, Tisagenlecleucel der Firma Novartis und Yescarta der Firma KitePharma. Eine Europa-Zulassung für Tisagenlecleucel wird im Herbst 2018 erwartet. Damit bricht ein neues Zeitalter für adoptive T-Zelltherapie an. Ärzte werden zukünftig in der Lage sein, CAR-T-Zellen zu verschreiben, sofern die Kosten dafür getragen werden. Nichts desto trotz halte ich es für essentiell, dass die Entwicklung und Herstellung der CAR-T-Zellen aufgrund der erforderlichen Patientennähe weiterhin in akademischer Hand bleibt. Ärzte müssen zudem diejenigen sein, die entscheiden, welche Patienten, welchen Alters und welcher Entität von einer Behandlung profitieren können. Aktuell liegt Deutschland im internationalen Vergleich hoffnungslos zurück, was die Anzahl an laufenden CAR-T-Zellstudien angeht. Ein übergeordnetes wissenschaftliches und klinisches Ziel meiner Arbeitsgruppe ist der Aufbau einer „*good manufacturing process*“ (GMP)-Pipeline zur erfolgreichen Herstellung und Verabreichung der von uns entwickelten Immuntherapien für Kinder mit soliden Tumoren. Momentan sind wir dabei, in Kooperation mit der Firma Miltenyi Biotec GmbH die Erlaubnis zur Herstellung von CD19-spezifischen CAR-T-Zellen für die Charité zu beantragen. Damit können wir zwar noch keine Kinder mit neuroektodermalen Tumoren behandeln, sind aber schon einen ganzen Schritt weiter auf dem Weg, diese vielversprechende Therapie in die Klinik zu bekommen.

Gegenstand meiner Forschung war und ist es somit, solide Tumore und ihre Signalwege besser zu verstehen, um a) Therapien entwickeln und testen zu können, die diese Signalwege gezielt angreifen, b) die CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren ebenso erfolgreich zu machen wie bei Leukämien und c) die dafür notwendigen sinnvollen Kombinationstherapien bestehend aus Tumor-gerichteten „*small molecules*“ und Tumor-gerichteten CAR-T-Zellen zu identifizieren und präklinisch wie klinisch zu evaluieren.

4. Zusammenfassung

Die Heilungschancen für Kinder mit therapierefraktärem oder rezidiviertem Medullo- oder Neuroblastom sind weiterhin schlecht und die Langzeitnebenwirkungen schränken die Betroffenen teilweise ihr Leben lang ein. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieformen, die gezielt Krebszellen erkennen und zerstören, essentiell. Große Beachtung finden die sogenannten „*small molecules*“, die bestimmte tumorspezifische Signalwege angreifen. Wir haben drei verschiedene Inhibitoren des für die Tumorentstehung essentiellen TP53-MDM2-Signalweges in Medullo- und Neuroblastom Zellkultur- und Mausmodellen untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass diese Inhibitoren, teilweise unabhängig des TP53-Status, das Wachstum der Tumorzellen verhinderte. Weiterhin konnten wir keine toxischen Nebenwirkungen in den präklinischen Mausversuchen beobachten.

Eine weitere vielversprechende Therapieform stellt die CAR-T-Zelltherapie dar. Hier werden patienteneigene T-Zellen entnommen, gentechnisch modifiziert, so dass sie nach einer Reinfusion in der Lage sind, gezielt Antigene zu erkennen und die antigenpräsentierende Zelle zu zerstören. In unserem Fall ist die antigenpräsentierende Zelle eine Krebszelle. Während diese Therapie in den USA und in China schon in zahlreichen klinischen Phase-I/II-Studien getestet wird, gibt es in Deutschland noch keine Einrichtung mit einem fest etablierten Prozess der GMP-gerechten CAR-T-Zellherstellung. Wir stehen kurz vor der Beantragung einer Herstellungserlaubnis beim Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin, um an der Charité CD19-spezifische CAR-T-Zellen herstellen zu dürfen.

Ähnliche herausragende Ansprechraten, wie sie bei der CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapie beobachtet wurden, wurden für CAR-T-Zellen, die in Phase-I/II-Studien zur Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren eingesetzt werden, noch nicht erreicht. In ersten präklinischen Versuchen konnten wir zeigen, dass eine Kombinationstherapie mit „*small molecules*“, die spezielle Signalwege, Mutationen oder die Tumorumgebung angreifen, zum einen zu einer Effektivitätssteigerung der CAR-T-Zellen führt und zum anderen einer Resistenzbildung vorbeugt.

Um sinnvolle Kombinationstherapien zu entwickeln, ist ein grundlegendes Verständnis der molekularen Genetik und der zellulären Mechanismen und Signalwege, welche Krebs vorantreiben notwendig. Zusätzlich muss in geeigneten präklinischen Modellen untersucht werden, ob eine Kombination zu einem synergistischen Effekt führt oder sich die Therapieformen gegenseitig in ihrer anti-tumoralen Wirkung beeinträchtigen. Zuletzt

müssen diese präklinischen Ergebnisse konsequent in frühen klinischen pädiatrischen Studien an spezialisierten Kliniken umgesetzt werden.

5. Literaturangaben

1. McNeil DE, Cote TR, Clegg L, Rorke LB. Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a SEER update. *Surveillance Epidemiology and End Results. Med Pediatr Oncol.* 2002;39(3):190-194.
2. Lannering B, Rutkowski S, Doz F, et al. Hyperfractionated versus conventional radiotherapy followed by chemotherapy in standard-risk medulloblastoma: results from the randomized multicenter HIT-SIOP PNET 4 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(26):3187-3193.
3. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):465-472.
4. Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):473-484.
5. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med.* 2009;361(12):1173-1178.
6. Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet.* 2011;204(3):113-121.
7. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;362(23):2202-2211.
8. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):65-86.
9. Henssen A, Althoff K, Odersky A, et al. Targeting MYCN-Driven Transcription By BET-Bromodomain Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2470-2481.
10. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat.* 2016;37(9):865-876.
11. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat.* 2003;21(3):182-191.
12. Saylors RL, 3rd, Sidransky D, Friedman HS, et al. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. *Cancer Res.* 1991;51(17):4721-4723.
13. Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, et al. Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res.* 1993;53(21):5284-5288.
14. Biegel JA. Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors. *Neuro Oncol.* 1999;1(2):139-151.
15. Ellison D. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002;28(4):257-282.
16. Imamura J, Bartram CR, Berthold F, Harms D, Nakamura H, Koeffler HP. Mutation of the p53 gene in neuroblastoma and its relationship with N-myc amplification. *Cancer Res.* 1993;53(17):4053-4058.
17. Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, et al. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 1993;53(21):5269-5273.
18. Wu H, Pomeroy SL, Ferreira M, et al. UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nat Med.* 2011;17(3):347-355.
19. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(12):909-923.
20. Giordana MT, Duo D, Gasverde S, et al. MDM2 overexpression is associated with short survival in adults with medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 2002;4(2):115-122.
21. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004;303(5659):844-848.

22. Issaeva N, Bozko P, Enge M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med*. 2004;10(12):1321-1328.
23. Grinkevich VV, Nikulenkov F, Shi Y, et al. Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer Cell*. 2009;15(5):441-453.
24. Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet*. 2003;33(2):162-167.
25. Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell*. 2003;112(1):29-40.
26. Ishizawa J, Nakamaru K, Seki T, et al. Predictive gene signatures determine tumor sensitivity to MDM2 inhibition. *Cancer Res*. 2018.
27. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(2):720-724.
28. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):35-45.
29. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-398.
30. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*. 2015;33(6):540-549.
31. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
32. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-733.
33. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448.
34. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-1334.
35. Hoefnagel CA, Rutgers M, Buitenhuis CK, et al. A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(3):359-368.
36. Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1190-1197.
37. Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*. 2003;362(9387):869-875.
38. Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol*. 2005;168(4):633-642.
39. Izumoto S, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T. Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res*. 1996;56(6):1440-1444.
40. Mechttersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, et al. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol*. 2001;155(4):661-673.

41. Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem*. 2004;279(28):28880-28888.
42. Schonmann SM, Iyer J, Laeng H, Gerber HA, Kaser H, Blaser K. Production and characterization of monoclonal antibodies against human neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1986;37(2):255-262.
43. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*. 2007;15(4):825-833.
44. Jones RJ, Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Kuhn DJ, Orlowski RZ. Drug resistance to inhibitors of the human double minute-2 E3 ligase is mediated by point mutations of p53, but can be overcome with the p53 targeting agent RITA. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(10):2243-2253.
45. Weilbacher A, Gutekunst M, Oren M, Aulitzky WE, van der Kuip H. RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1318.
46. Sabel M, Fleischhack G, Tippelt S, et al. Relapse patterns and outcome after relapse in standard risk medulloblastoma: a report from the HIT-SIOP-PNET4 study. *J Neurooncol*. 2016;129(3):515-524.
47. Moreno L, Rubie H, Varo A, et al. Outcome of children with relapsed or refractory neuroblastoma: A meta-analysis of ITCC/SIOPEN European phase II clinical trials. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(1):25-31.
48. Loar RW, Noel CV, Tunuguntla H, Colquitt JL, Pignatelli RH. State of the art review: Chemotherapy-induced cardiotoxicity in children. *Congenit Heart Dis*. 2018;13(1):5-15.
49. Waissbluth S, Chuang A, Del Valle A, Cordova M. Long term platinum-induced ototoxicity in pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018;107:75-79.
50. Choi DK, Helenowski I, Hijjiya N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: perspectives and review of the literature. *Int J Cancer*. 2014;135(8):1764-1773.
51. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2011;71(18):6051-6060.
52. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-390.
53. Frei E, 3rd, Karon M, Levin RH, et al. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*. 1965;26(5):642-656.
54. Majzner RG, Heitzeneder S, Mackall CL. Harnessing the Immunotherapy Revolution for the Treatment of Childhood Cancers. *Cancer Cell*. 2017;31(4):476-485.
55. Anderson J. Unleashing the immune response against childhood solid cancers. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(10).
56. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014;124(2):188-195.
57. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther*. 2017;25(1):285-295.
58. DeFrancesco L. Juno's wild ride. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):793.

59. Meli ML, Carrel F, Waibel R, et al. Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1999;83(3):401-408.
60. Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D, et al. A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011;6(9):e25220.
61. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):610-618.
62. Mina M, Boldrini R, Citti A, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncoimmunology*. 2015;4(9):e1019981.
63. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437.
64. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2006-2017.
65. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-135.
66. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421.
67. Merchant MS, Wright M, Baird K, et al. Phase I Clinical Trial of Ipilimumab in Pediatric Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2016;22(6):1364-1370.

Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Mentorin **Prof. Dr. Angelika Eggert** danken, die mich immer bestärkt hat und maßgeblichen Einfluss und Anteil an meiner wissenschaftlichen Karriere hatte. Außerdem hat sie mir immer gezeigt, dass Wissenschaft Spaß machen und im Team erfolgen muss, um erfolgreich zu sein.

Ein weiterer wichtiger Begleiter auf meinem Weg zur Habilitation war **Prof. Dr. Johannes H. Schulte**. Sein Wissen, sein Mut und seine Beharrlichkeit in der Wissenschaft und in der Klinik werden mir immer Vorbild sein.

Großer Dank gilt auch **Prof. Dr. Michael C. Jensen**, in dessen Labor ich meine sehr lehrreiche Zeit als Post-doc verbringen durfte und der ebenfalls ein großartiger Mentor war und ist.

Danken möchte ich auch jedem einzelnen meiner ersten eigenen Arbeitsgruppe, denn ohne deren Vertrauen, Einsatz, Leidenschaft und Verständnis für die Klinik wäre nichts möglich: **Solin Ali, Lena Andersch, Dr. Carina Flemmig, Laura Grunewald, Anika Klaus, Silke Schwiebert, Dr. Ana Textor, Karin Töws, Annika Winkler und Dr. Felix Zirngibl**.

Außerdem möchte ich die Gelegenheit nutzen, meinen **Eltern** und meiner großen **Schwester Claudia** zu danken, da sie mich immer in meinen Plänen unterstützt haben und mit Rat zur Seite standen. Das gleiche gilt auch für meine 3 Mädels: **Dr. Susanne Isfort, Dr. Christina Müller** und **Dr. Daniela Waschke**, denen ich hiermit auch herzlich danken möchte.

Zuletzt möchte ich **Robert Langer** danken, der die Hoffnung nicht aufgibt, dass meine Arbeit eines Tages weniger werden wird, mir großen Halt gibt und mich bei all meinen Plänen immer 100% unterstützt.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

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

23.04.2018

.....
Datum

.....
Unterschrift