

Abstract and Zusammenfassung

Abstract

T-prolymphocytic leukemia (T-PLL) is the most common mature T-cell leukemia in Europe and North America. However, it is a rare disease with an incidence of 0.6 per million per year. T-PLL cells are characterized by rapid proliferation accompanied by a marked chemotherapy-refractory behavior. This results in median survival of fewer than 2 years. T-PLL is therefore classified as an aggressive disease, for which no curative treatment is currently available.

Over the past decade, the understanding of the pathogenesis of T-PLL, centered around the overexpression of the oncogene T-cell leukemia/lymphoma 1A (TCL1A) and its aggravated influence on the impaired protective functions of ataxia-telangiectasia (ATM), has improved significantly. Synergistic TCL1A overexpression and ATM deficiency result in compromised p53-mediated apoptosis activation in response to genotoxic stimuli. Therefore, reactivation of p53 by inhibition of Mouse double minute 2 (MDM2), (Histone) deacetylases ((H)DACs), or B-cell lymphoma 2 (BCL2), as well as the disruption of vital growth signals, mediated by inducible T-cell kinases (ITKs), cyclin-dependent kinases (CDKs), or the Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway, may present reasonable treatment strategies in T-PLL. The focus of this work was to investigate the efficacy of novel compounds that interfere in these pathways and to test their combinations in T-PLL with the overall goal of identifying therapeutic options for upcoming clinical trials.

First, *ex-vivo* single-agent efficacy studies with selected compounds, including the above-mentioned substance classes as well as cytostatic agents that are used in clinical routine, were performed in a clinically, genetically, and transcriptomically characterized patient cohort. Notably, among 7 classical nucleosides and alkylators we identified cladribine as most efficient in killing T-PLL cells, which was paralleled by its most pronounced ability to phosphorylate p53. Patient samples that showed the best response to cladribine presented higher expression of *ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2)*, an adjunctive target of cladribine. Overall, within this screening, MDM2 inhibitors, represented by the substance idasanutlin, were the most potent compound class. Idasanutlin was convincing firstly because of its uniform efficacy within the entire T-PLL cohort and secondly, it showed T-PLL-selectivity

compared to healthy peripheral blood mononuclear cells. Similar to cladribine, its efficacy was associated with robust reactivation of p53.

Subsequent *ex-vivo* drug combination studies on 20 T-PLL patient samples revealed a dual mode of action, namely via genotoxic impulses and via p53 reactivation to be highly efficient. In particular, the combination of idasanutlin and cladribine showed a strong synergistic effect. No synergism, but an equally high efficacy was demonstrated by the combination of cladribine and the (H)DAC inhibitor romidepsin.

Next, the antitumor activity of both of these combinations was validated in mice transplanted with leukemic splenocytes from the *CD2-hMTCP1^{p13}(tg)* murine T-PLL model. In the absence of severe toxicity, a significant reduction of white blood cell counts as well as of CD8 positive tumorigenic T cells was evident in peripheral blood and spleens upon systemic treatment with both combinations.

Finally, a case report of a relapsed, multiply pretreated T-PLL patient provided early evidence that relapses and/or prolonged treatment can impede the effect of novel therapeutics (e.g. idasanutlin) through an increased or diminished expression of apoptosis-influencing genes (e.g. *Bcl-2-like 1* and *Bcl-2-like 11*). This calls for particular sensitivity testing in such relapsed/refractory (r/r) T-PLL.

In summary, within a panel of classical cytostatic substances, we identified cladribine as most effective. In addition, MDM2 and (H)DAC inhibitors, both targeting the aberrant ATM-p53 axis in T-PLL, emerged as the most potent substance classes in these *in-vitro* studies. Utilizing an *ex-vivo* combination screening, the interplay of genotoxic impulses and p53 reactivation by cladribine treatment combined with MDM2 or (H)DAC inhibition stood out as efficient as well as synergistic. Notably, we confirmed the efficacy of these combinations in a T-PLL-like mouse model, further underlining the potency of this treatment approach. Clinical trials investigating these treatment combinations are highly warranted to develop a comprehensive understanding of their long-term effects.

Zusammenfassung

Die T-Prolymphozyten Leukämie (T-PLL) ist die häufigste reifzellige T-Zell Leukämie in Europa und Nord Amerika. Trotzdem zählt sie mit einer Inzidenz von 0.6 Neuerkrankungen pro Millionen pro Jahr zu den seltenen Erkrankungen. T-PLL Zellen weisen eine rasante Proliferation, einhergehend mit einem ausgeprägten Chemotherapie-refraktären Verhalten, auf. Dies führt zu einem mittleren Überleben der Patienten von weniger als zwei Jahren. Daher wird die T-PLL als eine aggressive Erkrankung eingestuft, für die derzeit kein kuratives Arzneimittel zur Verfügung steht. Im letzten Jahrzehnt hat sich das Verständnis der Pathogenese der T-PLL, in dessen Mittelpunkt die Überexpression des Onkogens T-cell leukemia/lymphoma 1A (TCL1A) und dessen verstärkender Einfluss auf die beeinträchtigten Schutzfunktionen von Ataxia telangiectasia (ATM) steht, erheblich verbessert. Das synergistische Zusammenspiel aus TCL1A Überexpression und ATM Defizit münden in einer gestörten, p53-vermittelten Apoptose-Aktivierung als Antwort auf genotoxische Impulse. Die Reaktivierung von p53 durch die Hemmung von Mouse double minute 2 (MDM2), (Histone) Deacetylasen ((H)DACs) oder B-cell lymphoma 2 (BCL2), sowie die Unterbrechung verschiedener Wachstumssignalkaskaden, die durch die induzierbaren T-Zell Kinasen (ITKs), die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) oder den Janus-Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) Signalweg vermittelt werden, könnten sinnvolle Behandlungsstrategien darstellen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Wirksamkeit neuartiger Wirkstoffe, die diese Signalwege hemmen. Wirkstoffkombinationen wurden getestet, mit dem Ziel therapeutische Optionen für kommende klinische Studien in T-PLL zu identifizieren.

Als erstes wurden verschiedene *ex-vivo* Wirksamkeitsuntersuchungen mit ausgewählten Substanzen, darunter die oben genannten Substanzklassen, sowie in der Klinik häufig verwendete Zytostatika, an einer klinisch, genetisch und transkriptomisch gut charakterisierten Patientenkohorte durchgeführt. Unter den sieben untersuchten Chemotherapeutika ging Cladribin als die wirksamste Substanz zur Tötung von T-PLL Zellen hervor, einhergehend mit einer ausgeprägten Fähigkeit der p53 Phosphorylierung. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen einer erhöhten mRNA Expression der *Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase Untereinheit M2 (RRM2)* und einer gesteigerten Cladribin Wirksamkeit gezeigt werden, die ein zusätzliches Target von Cladribin darstellt. Insgesamt erwiesen sich MDM2 Inhibitoren, hier

vertreten durch die Substanz Idasanutlin, als die wirksamste Substanzklasse in diesem Screening. Idasanutlin überzeugte zum einen durch seine gleichmäßige Wirksamkeit in der gesamten T-PLL Kohorte und zum anderen durch seine T-PLL-selektive Aktivität im Vergleich zu gesunden mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Wie zuvor bei Cladribin war die Wirksamkeit von Idasanutlin mit einer ausgeprägten Reaktivierung von p53 verbunden.

Anschließende *ex-vivo* Kombinationsuntersuchungen an Hand von 20 T-PLL Patientenproben zeigte ein hocheffizientes Zusammenspiel aus genotoxischen Impulsen und p53-Reaktivierung. Insbesondere die Kombination aus Idasanutlin und Cladribin zeigte eine ausgeprägte synergistische Wirkung. Keine synergistischen Effekte, aber eine ebenso hohe Wirksamkeit zeigte die Kombination von Cladribin und dem (H)DAC Inhibitor Romidepsin.

Die gegen T-PLL Zellen gerichtete Wirkung beider Substanzkombinationen wurde im Anschluss in Mäusen validiert, in die leukämischen Splenozyten, aus dem CD2-*hMTCP1^{p13}(tg)* murinen T-PLL Modell stammend, transplantiert wurden. In Abwesenheit schwerwiegender Nebenwirkungen, zeigte sich nach systemischer Behandlung mit beiden Kombinationen eine signifikante Verringerung der Anzahl weißer Blutzellen, sowie der Anzahl CD8-positiven tumorerzeugenden T Zellen im peripheren Blut und in den Milzen der Tiere.

Abschließend lieferte ein Fallbericht eines rezidierten, mehrfach vorbehandelten T-PLL Patienten erste Hinweise darauf, dass ein Rezidiv und/oder eine andauernde Behandlung die Wirkung neuartiger Therapeutika (z.B. Idasanutlin) durch eine erhöhte oder verminderte Expression Apoptose-beeinflussender Gene (z.B. Bcl-2-like 1 und Bcl-2-like 11) negativ beeinflussen können. Dies bedingt eine besondere Wirksamkeitsprüfung solcher rezidierten/refraktären (r/r) T-PLL.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit aus einem Kollektiv klassischer zytostatischer Substanzen, Cladribin als am wirksamsten identifiziert werden. Überdies erwiesen sich MDM2- und (H)DAC-Inhibitoren, als die potentesten Substanzklassen zur Behandlung von T-PLL Zellen. In einem *ex-vivo* Kombinations-Screening erwies sich das Zusammenspiel von genotoxischen Impulsen und p53-Reaktivierung durch Cladribin-Behandlung in Kombination mit MDM2- oder (H)DAC-Inhibition als effizient und synergistisch. Die Wirksamkeit beider Kombinationen konnte in einem T-PLL-ähnlichen Mausmodell bestätigt werden, was die Potenz dieses Therapiekonzeptes unterstreicht. Zukünftige klinische Studien in denen diese

Wirkstoffkombinationen untersucht werden, sind dringend erforderlich, um ein umfangreiches Verständnis ihrer Langzeitwirkungen zu entwickeln.