

Aus der  
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie  
der medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Evaluation von bispezifischen CD19XCD3 TandAb und CD19XCD16  
TandAb Antikörpern für die Therapie von Patienten mit Non-Hodgkin-  
Lymphomen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lisa Maria Pörtner

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Rainer Haas

Zweitgutachterin: Univ. Prof. Dr. Royer-Pokora

Für meine Familie und Freunde

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Pörtner LM, Schönberg K, Hejazi M, Brünnert D, Neumann F, Galonska L, Reusch U, Little M, Haas R, Uhrberg M, (2012), T and NK cells of B cell NHL patients exert cytotoxicity against lymphoma cells following binding of bispecific tetravalent antibody CD 19 x CD3 or CD 19 x CD16. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(10): 1869-75.

## Zusammenfassung

Mit konventionellen Chemo- und Immuntherapeutika lässt sich ein Großteil der Patienten mit einem NHL nicht endgültig heilen. Daher sind in den letzten Jahren neue Medikamente entwickelt worden, darunter die bispezifischen Antikörper (BsAb), welche mit einem Arm an ein Oberflächenantigen auf der Tumorzelle und mit dem anderen Arm an einen aktivierenden Rezeptor auf einer Immuneffektorzelle binden. Diese Antikörper sollen zytotoxische Zellen an die Tumorzellen binden und so eine spezifische und lokalisierte Immunreaktion hervorrufen. Die in dieser Studie evaluierten BsAb sind der CD19XCD16 BsAb, der Natürliche Killerzellen aktivieren soll, sowie der CD19XCD3 BsAb für die Rekrutierung von T-Lymphozyten. Diese Antikörper zeigten *in vitro* sowie in Tierexperimenten und zum Teil in ersten klinischen Studien vielversprechende Wirkungen. Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob die BsAb prinzipiell bei allen NHL-Patienten einsetzbar sind, oder ob es abhängig von NHL-Subtyp, Krankheitsstatus oder Vortherapie Einschränkungen in der Anwendbarkeit gibt. Dazu wurde das Blut von 44 Patienten mit NHL untersucht, die sich anhand der vorgenannten Merkmale unterschieden. Zum einen wurde die Zahl der Immuneffektorzellen bestimmt, die für die Wirkung der BsAb notwendig sind. Die zytotoxische Aktivität der NK- und T-Zellen wurde nach Zugabe bekannter aktivierender Reagentien sowie in Gegenwart des jeweiligen BsAb und CD19+ Zielzellen untersucht. Dazu wurde der CD107a-Zytotoxizitätsassay verwendet, mit dem sich der Prozentsatz der degranulierten Zellen in einer bestimmten Zellpopulation bestimmen lässt. Die an Patienten erhobenen Ergebnisse wurden mit jenen von 17 gesunden Probanden verglichen.

Die Bestimmung der Zellzahlen ergab bei NHL-Patienten eine verminderte Anzahl an T- und B-Lymphozyten sowie eine stark verminderte CD4/CD8-Ratio, während die NK-Zellzahl bei den meisten Patienten normal war. Dabei zeigten Patienten mit progredienter Erkrankung im Gegensatz zu Patienten in Remission eine starke Verminderung der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Die Beurteilung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen gegenüber physiologischen Stimuli zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten. Das gleiche Bild ergab sich bei Inkubation von Effektorzellen mit CD19+ Lymphomzellen und CD19XCD16 bzw. CD19XCD3 BsAb. NK-Zellen zeigten im Gegensatz zu einer Exposition gegenüber den Lymphomzellen allein einen dreifachen Anstieg der aktivierten Zellpopulation, T-Zellen sogar einen siebenfachen Anstieg in der zytotoxischen Aktivität. Es zeigten sich auch hier keine Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Kontrollen. Krankheitssubtyp, -status sowie Vortherapie hatten keinen Einfluss auf

die zytotoxischen Fähigkeiten der Patienten. Es konnte somit demonstriert werden, dass die Applikation von CD19XCD16 und CD19XCD3 BsAb mögliche Therapieoptionen bei NHL bietet. Die Anfertigung eines prätherapeutischen Immunstatus könnte sinnvoll sein, um bei den Zellzahlen Abnormitäten zu erkennen, die die Therapieeffektivität negativ beeinflussen könnten.

**Abkürzungen**

<b>5-JÜR</b>	5-Jahres-Überlebensrate
<b>ADCC</b>	antibody mediated cellular cytotoxicity
<b>AML</b>	Akute myeloische Leukämie
<b>BiTE</b>	Bispecific T-cell-engager
<b>BsAb</b>	Bispezifische Antikörper
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CLL</b>	Chronisch-lymphatische Leukämie
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>E:T-Ratio</b>	Effektor:Target-Ratio
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting
<b>FL</b>	Follikuläres Lymphom
<b>FLIPI</b>	Follicular lymphoma international prognostic index
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HTLV</b>	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IPI</b>	Internationaler Prognostischer Index
<b>LDH</b>	Laktat- Dehydrogenase
<b>mAb</b>	Monoclonal Antibody
<b>MALT</b>	Mucosa-associated lymphatic tissue
<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>MNC</b>	mononukleäre Zellen
<b>NHL</b>	Non- Hodgkin- Lymphom
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>PBSZT</b>	periphere Blutstammzelltransplantation
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>PHA</b>	Phytohämagglutininsäure
<b>Rpm</b>	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<b>SEB</b>	staphylococcal enterotoxin B

<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>TandAb</b>	Tandem Antibody
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Tumor derived growth factor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>VEGF</b>	vascular endothelium derived growth factor
<b>WHO</b>	World health organization



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Non-Hodgkin-Lymphome</b> .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie .....	1
1.1.3 Klassifikation.....	2
1.1.4 Klinik.....	4
1.1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung.....	4
1.1.6 Therapie der B-Zell-NHL .....	6
1.1.6.1 Therapie indolenter NHL am Beispiel des folliculären Lymphoms .....	6
1.1.6.2 Therapie aggressiver NHL.....	8
1.1.6.3 Neue Strategien in der Therapie der NHL .....	9
<b>1.2 Antikörper in der Tumortherapie</b> .....	11
1.2.1 Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung .....	11
1.2.2 Monoklonale Antikörper .....	12
1.2.2.1 Monoklonale Antikörper in der Therapie der NHL.....	13
1.2.3 Bispezifische Antikörper .....	14
1.2.3.1 Bispezifische Antikörper für die Therapie der NHL .....	17
<b>1.3 Zielsetzung</b> .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	19
<b>2.1 Patienten und gesunde Spender</b> .....	19
<b>2.2 Immunstaten</b> .....	20
2.3.1 Ficoll.....	22
2.3.2 Magnetische Zellseparation mit MACS .....	22
<b>2.4 Zellkultur</b> .....	24
2.4.1 Kultivierung von MNCs .....	24
2.4.2 Zelllinien.....	24
<b>2.5 CD107a-Zytotoxizitätsassay</b> .....	24
2.5.1 Bispezifische Antikörper.....	24
2.5.2 Durchführung des Assays .....	25
<b>2.6 Statistische Auswertung</b> .....	28
<b>3. Ergebnisse</b> .....	29

<b>3.1 Anzahl und Verteilung der Immunzellen im peripheren Blut</b> .....	29
3.1.1 Vergleich von Patienten und gesunden Kontrollen .....	29
3.1.2 Unterschiede innerhalb der Patientengruppe .....	32
<b>3.2 Spontane Effektorzellaktivität</b> .....	34
<b>3.3 Reaktion auf aktivierende Stimuli</b> .....	35
<b>3.4 Zellaktivität in Gegenwart von Lymphomzellen</b> .....	37
<b>3.5 Zytotoxizität gegen Lymphomzellen in Gegenwart des bispezifischen Antikörpers</b> .....	37
<b>3.6 Reaktion der Effektorzellen bei Inkubation mit dem bispezifischen Antikörper ohne Zugabe der Zielzellen</b> .....	40
<b>3.7 Faktoren, die die zytotoxische Funktion der Effektorzellen beeinflussen</b> .....	42
<b>3.8 Korrelation zwischen T- und NK- Zell- Funktion</b> .....	43
<b>4. Diskussion</b> .....	44
<b>4.1 Zellzahl und Zelluntergruppen</b> .....	44
<b>4.2 Der CD107a-Assay zur Beurteilung der Zellfunktion</b> .....	49
<b>4.3 Aktivierbarkeit der T- und NK-Zellen von Patienten mit NHL</b> .....	50
<b>4.4 Aktivierbarkeit durch Bispezifische Antikörper</b> .....	53
<b>4.5 Einfluss des BsAb bei fehlenden Targetzellen</b> .....	57
<b>4.6 Fazit und Ausblick</b> .....	59
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	61

## **1. Einleitung**

### **1.1 Non-Hodgkin-Lymphome**

#### 1.1.1 Epidemiologie

Die Non- Hodgkin- Lymphome (NHL) bilden gemeinsam mit den Hodgkin-Lymphomen die Gruppe der malignen Lymphome. Bei den Non- Hodgkin- Lymphomen handelt es sich um seltene Krankheitsbilder (Prävalenz ca. 10/100.000 Einwohner jährlich), deren Inzidenz in den letzten Jahren jedoch stetig zugenommen hat [1]. In der Rangfolge der häufigsten Krebserkrankungen stehen die NHL weltweit auf Platz 12 (Männer Platz 8, Frauen Platz 10) [2]. Sie sind verantwortlich für 2,7 % aller Krebstodesfälle weltweit. Die Wahrscheinlichkeit, an einem NHL zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter an; das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 70 Jahren. Männer erkranken 1,5-mal häufiger als Frauen [3]. Die Lymphome entstehen durch die Entartung eines Zellklons der lymphatischen Reihe und können somit sowohl von B-Lymphozyten (85-90 % der Fälle) als auch von T-Lymphozyten (10-15 %) unterschiedlicher Reifestadien ihren Ausgang nehmen [4]. Daraus resultiert eine große Heterogenität der Krankheitsbilder bezüglich Histologie, Verlauf und Prognose.

#### 1.1.2 Ätiologie

Über die Ätiologie der NHL ist nur wenig bekannt. Gesichert ist, dass Immundefekte für die Entwicklung eines malignen Lymphoms prädisponieren. Dies können angeborene Immundefekte wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom sein, jedoch auch erworbene Immundefunktionen nach einer Therapie mit Zytostatika oder Immunsuppressiva [5]. Eine Infektion mit dem HI-Virus lässt das Erkrankungsrisiko sogar auf das 60-fache ansteigen [6]. Auch einige Autoimmunerkrankungen bergen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines NHL, darunter rheumatoide Arthritis, Sjögren-Syndrom, Lupus erythematodes und Zöliakie [7]. Für einige Lymphom-Unterformen besteht eine gesicherte Assoziation mit viralen oder bakteriellen Infektionen. So spielt eine Infektion mit *Helicobacter pylori* eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines MALT-Lymphoms des Magens [8]. In Endemiegebieten des HTLV1- Virus in Japan finden sich gehäuft T-Zell-Lymphome [9], in denen des Epstein-Barr-Virus in Afrika gehäuft Burkitt-Lymphome [10]. Weitere Assoziationen bestehen zu Infektionen mit dem humanen Herpesvirus Typ 8 und einer Hepatitis C-Virus-Infektion [11]. Auch chromosomale Aberrationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung maligner Lymphome. Bei 70-90 % der Patienten mit follikulärem Lymphom findet sich eine

Translokation t(14;18), die zu einer Aktivierung des bcl2-Onkogens führt [12]. Ähnliche Aberrationen sind auch für andere Lymphom- Subtypen nachgewiesen worden. Für den Einfluss exogener Faktoren wie die Exposition gegenüber Pestiziden, Insektiziden, Lösemitteln sowie den beruflichen Einsatz von Haarfärbemitteln gibt es in der Literatur nur schwache Hinweise bzw. sogar widersprüchliche Ergebnisse [13]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt jedoch die erhöhte Inzidenz von NHL nach Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen [14].

### 1.1.3 Klassifikation

Es existieren verschiedene Klassifikationssysteme für NHL, die sich nach klinischen, morphologischen, immunphänotypischen und molekulargenetischen Kriterien richten. Die gebräuchlichste Einteilung ist die WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2001 (Tabelle 1.1.1 und 1.1.2). Sie unterscheidet Lymphome der unreifen T- und B-Vorläufer-Zellen von reifzelligen B- und T-Zell-Lymphomen und berücksichtigt Merkmale der Morphologie, des Immunphänotyps und Genotyps, der zellulären Herkunft sowie des klinischen Verlaufs [15].

#### **NHL der B- Zell- Reihe**

##### **Vorläuferzell- Lymphome**

Vorläuferzell-B-lymphoblastische Leukämie/Lymphome

##### **Periphere Lymphome**

##### **B-CLL, kleinzelliges lymphozytisches Lymphom**

B-Zell-prolymphozytische Leukämie

B-CLL-Variante: mit monoklonaler Gammopathie/plasmozytoider Differenzierung

##### **Lymphozytisches Lymphom**

##### **Mantelzelllymphom**

Variante: Blastisches Mantelzell-Lymphom

##### **Follikuläres Lymphom**

Varianten: Grad 1, 2, und 3

Kutanes follikuläres Keimzentrumslymphom

##### **Marginalzonen-B-Zell- Lymphom**

MALT-Typ

Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom

Marginalzonen-B-Zell-Lymphom der Milz

Haarzell-Leukämie

##### **Plasmazellmyelom/ Plasmozytom**

**Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom**

Varianten: Zentroblastisch, immunoblastisch, T-Zell- oder histiozytenreich, anaplastisch-großzelliges Lymphom

**Mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell-Lymphom**

Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom  
Primäres Ergusslymphom

**Burkittlymphom**

Atypisches (pleomorphes) Burkitt-Lymphom

**Tabelle 1.1.1:** WHO-Klassifikation der B-Zell-NHL [16]

**NHL der T-Zell-Reihe**

**Vorläuferzell-Lymphome**

Vorläufer-T-Zell-lymphoblastische Leukämie/Lymphom

**Periphere Lymphome**

T-Zell-CLL, Prolymphozytische Leukämie  
T-Zell-großzelliges granuliertes lymphozytisches Lymphom  
Aggressive NK-Zell-Leukämie

**Mycosis fungoides/Sézary-Syndrom**

**Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht spezifiziert**

Subkutanen Pannikulitis-ähnliches T-Zell-Lymphom  
Hepatosplenisches gamma-delta T-Zell-Lymphom

**Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom**

**Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasal und nasaler Typ**

Enteropathie-typisches T-Zell-Lymphom  
Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom (HTLV1+)

**Anaplastisches großzelliges Lymphom, primär systemisch**

Primäre kutane CD30-positive T-Zell-proliferative Erkrankung

**Tabelle 1.1.2:** WHO-Klassifikation der T-Zell-NHL [16]

Zusätzlich zu der WHO-Klassifikation hat sich eine Einteilung in indolente, aggressive und sehr aggressive Lymphome anhand des klinischen Verlaufes bewährt [17]. Diese Einteilung spielt eine entscheidende Rolle bei der Wahl des Therapiekonzeptes- indolente Lymphome wie die Chronisch lymphatische Leukämie (CLL) oder das MALT-Lymphom zeigen häufig einen blanden Verlauf über viele Jahre, so dass sie in der Regel erst bei ausgeprägter Symptomatik oder rascher Progredienz therapiert werden. Die sich langsam teilenden

Tumorzellen sprechen jedoch auch langfristig nur begrenzt auf eine klassische Chemotherapie an, und eine definitive Heilung ist selten. Aggressive Lymphome wie das Plasmozytom oder das Burkitt-Lymphom hingegen haben ohne Therapie einen rasch tödlichen Verlauf, sind aber durch eine Chemotherapie zum Teil heilbar.

#### 1.1.4 Klinik

Ein Großteil der Patienten, die an einem NHL erkranken, stellt sich mit einer persistierenden, meist schmerzlosen Lymphknotenschwellung beim Arzt vor. Des Weiteren kann auch eine Splenomegalie, seltener eine Hepatomegalie bestehen. In ca. 20 % der Fälle berichten die Patienten über Allgemeinsymptome wie Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß, die sog. B-Symptome. Ggf. besteht bereits bei Erstdiagnose eine Knochenmarkinfiltration mit Beeinträchtigung der Hämatopoese. Diese äußert sich durch eine Anämie mit Blässe und Abgeschlagenheit, eine Thrombozytopenie mit Blutungsneigung und Petechien sowie eine Granulozytopenie mit Infektneigung. Auch extralymphatische Infiltrate, beispielsweise der Haut, kommen vor.

#### 1.1.5 Diagnostik und Stadieneinteilung

Neben einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung ist die Exstirpation eines betroffenen Lymphknotens mit anschließender histologischer, immunhistologischer, molekularbiologischer und zytogenetischer Untersuchung zur Bestimmung des Lymphom-Subtypus erforderlich. Zudem sollte immer eine Blutuntersuchung erfolgen, aus der sich erste Hinweise auf eine eventuelle Beteiligung des Knochenmarks ergeben können. Ebenfalls von großer Bedeutung im Rahmen der Labordiagnostik ist die Bestimmung des Prognosefaktors LDH (s.u.) sowie die HIV-Serologie. Weitere Untersuchungen beinhalten eine Knochenmarkpunktion und die Anwendung bildgebender Verfahren (Röntgen-Thorax, CT Hals/Thorax/Abdomen, Sonographie, ggf. PET). Abhängig von der klinischen Symptomatik sollten auch HNO-ärztliche Untersuchung, Kolo- oder Gastroskopie, eine Skelettszintigraphie oder eine Liquorpunktion angestrebt werden.

Nach Erhebung aller Befunde kann die Stadieneinteilung vorgenommen werden, die nach der Ann-Arbor-Klassifikation hinsichtlich der Lokalisation und nach der WHO-Klassifikation bezüglich des NHL-Subtyps erfolgt (Tabelle 1.1.1 bis 1.1.3). Spezielle Klassifikationen bestehen für die CLL (nach Binet oder Rai) sowie für das Plasmozytom (nach Durie und Salmon).

I	Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I/N) oder Vorliegen eines einzigen oder lokalisierten extranodalen Herdes (I/E)
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde (II/E) und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N/E)
III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III/N) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknotenbefall (III/E oder III/N/E)
III1	Subphrenische Lokalisation, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten allein oder gemeinsam
III2	Subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler Lymphknoten allein oder gemeinsam
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten
Zusatz „A“ bei Fehlen, „B“ bei Vorliegen von: -Nicht erklärbares Fieber > 38°C -Nicht erklärbares Nachtschweiß -Nicht erklärbarer Gewichtsverlust (>10% des KG inn. von 6 Monaten)	

**Tabelle 1.1.3:** Stadieneinteilung der NHL nach Ann-Arbor [16]

Bei den aggressiven NHL ermöglicht die genaue Stadieneinteilung unter Berücksichtigung des Patientenalters, der Serum-LDH, der Zahl der Extranodalbefälle und des Allgemeinzustandes eine individuelle Risikoabschätzung anhand des internationalen prognostischen Index (IPI, Tabelle 1.1.4) [18]. Mit Hilfe des IPI erfolgt eine Einteilung in 4 Risikogruppen (IPI 1;2;3;>3).

Alter >60 Jahre
Stadium III/IV
>1 extranodaler Befall
Schlechter Allgemeinzustand (WHO/ECOG>1)
LDH über Normwert

**Tabelle 1.1.4:** Klinische Risikofaktoren bei aggressivem NHL entsprechend dem Internationalen Prognostischen Index (IPI).

Die 5- Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) lag vor Einführung von Rituximab in der Gruppe mit dem niedrigsten Risiko bei 79 %, in der Gruppe mit der schlechtesten Prognose nur noch bei 26 % [19]. Auch nach Einführung der modernen Immunchemotherapie hat sich die Aussagekraft des IPI bewährt [20]. Bei Patienten unter 60 Jahren wird der altersadaptierte IPI eingesetzt; in dieser Altersgruppe zählt „bulky disease“ (Lymphknotenkonglomerat bzw. einzelnes Lymphom > 7,5 cm) als zusätzlicher Risikofaktor [21].

### 1.1.6 Therapie der B-Zell-NHL

Die Wahl der Therapieform richtet sich nach dem histologischen Subtyp des Lymphoms und danach, wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist. Die Unterteilung in aggressive und indolente NHL spielt hier eine zentrale Rolle. Nachfolgend soll auf das anerkannte therapeutische Vorgehen bei diesen beiden Gruppen eingegangen werden.

#### 1.1.6.1 Therapie indolenter NHL am Beispiel des folliculären Lymphoms

Das folliculäre Lymphom stellt mit 22 % aller Fälle die zweithäufigste Gruppe der NHL dar [4]. Die Erkrankung nimmt ihren Ausgang von einer entarteten B-Zelle aus dem Keimzentrum eines Lymphfollikels und damit von einer funktionell reifen Zelle. Die Wachstumsrate ist somit eher langsam, weshalb folliculäre Lymphome in der Regel indolent über mehrere Jahre verlaufen. Bei ca. 80 % der Patienten wird die Erkrankung erst im Stadium III/IV nach Ann-Arbor diagnostiziert; dies hat entscheidenden Einfluss auf die Prognose. Zusätzlich zur Ann-Arbor-Klassifikation ist bei den folliculären Lymphomen die Einteilung in drei Schweregrade nach histologischen Gesichtspunkten relevant; ein folliculäres Lymphom vom Grad IIIB verhält sich wie ein aggressives NHL und sollte auch dementsprechend behandelt werden (s.u.) [22]. Es existiert zudem ein modifizierter Prognoseindex, der FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) zur genaueren Risikoabschätzung unter Berücksichtigung der Parameter Hämoglobin-Wert, LDH, Anzahl der befallenen Lymphknoten und Krankheitsstadium [23].

Erfolgt die Diagnose eines folliculären Lymphoms in einem frühen, limitierten Stadium (Stadium I oder II), so ist eine Therapie mit kurativer Zielsetzung indiziert. Der Patient wird dazu einer Strahlentherapie mit einer mittleren Gesamtdosis von 30-40 Gray zugeführt. Mit dieser Therapie können 5-Jahres-Überlebensraten von 86 % erreicht werden [24].

Befindet sich der Patient zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem späteren, generalisierten Krankheitsstadium (Stadium III, IV) so erfolgt die Behandlung nach einem palliativen Therapiekonzept. In der Regel wird bis zum Auftreten klinischer Symptome bzw. dem Nachweis eines eindeutigen Progress die „wait and watch“- Strategie angewandt. Dies hat keinen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben [25]. Erst bei Auftreten krankheitsassoziierter Symptome (hämatopoetische Insuffizienz, B-Symptomatik, Größenzunahme des Lymphoms) wird eine Therapie empfohlen. Gängige Chemotherapie-Schemata sind z.B. das CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Daunorubicin, Vincristin, Prednison), das MCP-Schema (Mitoxantron, Chlorambucil, Prednison) oder das CVP-Schema



(Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison). Bei jüngeren Patienten mit ggf. geplanter Stammzelltherapie stellt die Durchführung des CHOP-Protokolls derzeit die Therapie der Wahl dar.

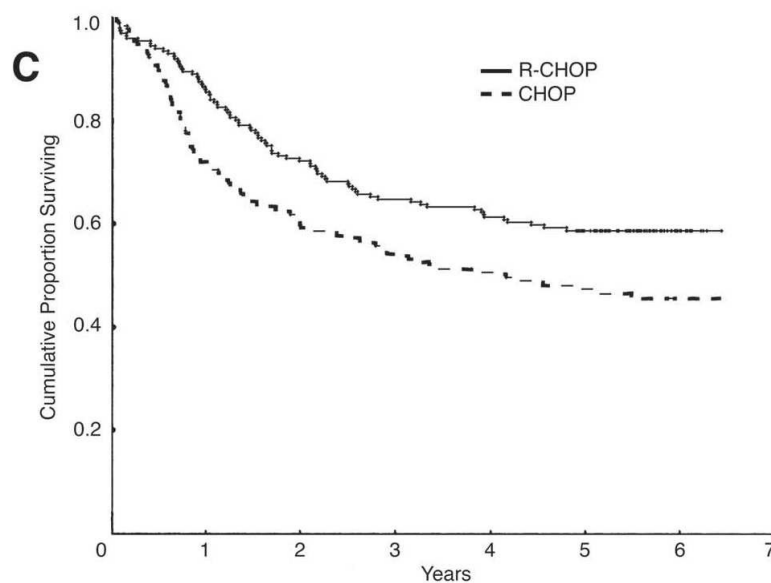
Durch die zusätzliche Verabreichung des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab kann eine höhere Ansprechrate (96 % vs. 90 %), eine Verdoppelung der progressionsfreien Zeit sowie ein verlängertes Gesamtüberleben erreicht werden [26, 27]. Die kombinierte Immunchemotherapie stellt daher heute den Standard in der Therapie follikulärer Lymphome dar.

Im Anschluss an das Erreichen einer Remission erfolgt die Einleitung einer Konsolidierungstherapie. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von Interferon-alpha, welcher nachweislich das krankheitsfreie Überleben verlängert. Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben ergibt sich jedoch bei alleiniger Erhaltungstherapie nicht [28]. Alternativ ist eine Rituximab-Erhaltungstherapie möglich. Die Wirksamkeit einer solchen Therapie im Anschluss an die Behandlung eines Rezidiv-FL ist beschrieben. Patienten, die in dieser Situation regelmäßig Rituximab erhielten, zeigten eine Verbesserung des ereignisfreien Überlebens und einen Vorteil im Gesamtüberleben [29]. Daher stellt die Rituximab-Konsolidierungstherapie derzeit den Goldstandard in der Anschlussbehandlung des rezidivierten FL dar; der Einsatz in der Primärtherapie ist Gegenstand aktueller Studien.

Nach einem mittleren progressionsfreien Überleben von 82.3 Monaten im Anschluss an eine R-CHOP-Behandlung erleiden fast 60 % der Patienten mit einem follikulären Lymphom ein Rezidiv [30]. Therapiemöglichkeiten in dieser Situation umfassen zum einen eine erneute Immunchemotherapie, z.B. nach dem R-FCM- (Rituximab plus Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron) oder dem BMR-Schema (Rituximab plus Bendamustin, Mitoxantron) mit anschließender Rituximab-Erhaltungstherapie. Die Applikation von R-FCM führte in einer Studie zu Ansprechraten von 79 % und einer 2-Jahresüberlebensrate von 73 % [31]. Eine weitere Therapieoption stellt die autologe Stammzelltransplantation nach Hochdosistherapie und Ganzkörperbestrahlung dar. Mit dieser Strategie können bei Patienten in der zweiten Remission 5-Jahres-Überlebensraten von 75 % erreicht werden [32]. Schwerwiegende Nebenwirkungen dieser Therapieoption sind die Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms oder einer akuten myeloischen Leukämie. Auch die allogene Stammzelltransplantation wird aufgrund erheblicher Nebenwirkungen nur bei Patienten mit Rezidiv eingesetzt. Dosisreduzierte Konzepte erreichen 2-Jahres-Überlebensraten von 84 %, jedoch entwickeln 64 % der Patienten chronische Graft-versus-Host-Reaktionen, bei denen transplantierte Immunzellen den Empfängerorganismus angreifen [33].

### 1.1.6.2 Therapie aggressiver NHL

Die als aggressiv bezeichneten NHL, beispielsweise das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom, zeigen im Gegensatz zu den indolenten Lymphomen ein rasches Wachstumsmuster und führen unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod. Betroffene Patienten sollten daher unmittelbar einer Therapie zugeführt werden, welche primär in kurativer Intention erfolgt. Patienten über 60 Jahre können zunächst mit einer Vorphasetherapie, bestehend aus Vincristin und Prednison behandelt werden. Ist anschließend, abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten, eine kurative Therapie durchführbar, so stellt auch hier (vorausgesetzt es liegt ein CD20-positives Lymphom vor) das R-CHOP-Schema, allerdings mit verkürztem Therapieintervall, das Standardvorgehen dar. Ebenso wie bei den indolenten Lymphomen verbessert der Einsatz von Rituximab progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben signifikant (Abb 1.1.1) [34].



**Abb. 1.1.1:** Gesamtüberleben nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren bei Patienten mit aggressivem Lymphom >60 Jahre, die mit CHOP bzw. R-CHOP behandelt worden sind [34]. *Reprinted with permission. © (2005) American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.*

Auch jüngere Patienten mit günstigem Risikoprofil (IPI 0-1) profitieren von einer kombinierten Immunchemotherapie, weshalb auch hier das R-CHOP-Schema als Standardtherapie eingesetzt wird. Mit Hilfe dieses Vorgehens konnte die 2-Jahres-Überlebensrate in dieser Patientengruppe von 85 % auf 95 % gesteigert werden [35]. Junge Patienten mit mehr als einem Risikofaktor nach dem internationalen Index zeigen ein

besonders schlechtes Gesamtüberleben und sollten daher möglichst im Rahmen klinischer Studien therapiert werden. Anwendung finden hier unter anderem Hochdosiskonzepte mit anschließender autologer Knochenmark- bzw. peripherer Blutstammzelltransplantation. Mit Hilfe des MegaCHOEP-Schemas (hochdosierte CHOP-Therapie plus Etoposid) und anschließender autologer Stammzelltransplantation kann beispielsweise eine 5-Jahres-Überlebensrate von 67 % erreicht werden [36].

Auch nach Erreichen einer kompletten Remission in der Primärtherapie erleiden 25-40 % der Patienten mit einem aggressiven NHL ein Rezidiv, davon über 90 % innerhalb der ersten zwei Jahre. In diesem Fall sollte bei allen Patienten eine Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation angestrebt werden, da hierbei ein im Vergleich zu einer konventionellen Therapie deutlich besseres 5-Jahres-Überleben erreicht werden kann (53 % vs. 32 %) [37]. Alternativ kommen analog zum Vorgehen bei den indolenten Lymphomen allogene Transplantationskonzepte zur Anwendung, deren Einsatz aufgrund der hohen therapieassoziierten Mortalität jedoch noch auf klinische Studien beschränkt ist [38].

#### 1.1.6.3 Neue Strategien in der Therapie der NHL

Seit der Einführung der CHOP-Chemotherapie in den 70er Jahren hat sich die Prognose für Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen kontinuierlich verbessert. Einen elementaren Beitrag hierzu leistete die Einführung des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, der mittlerweile einen festen Stellenwert in der Behandlung sowohl der indolenten als auch der aggressiven NHL hat. Mit Hilfe der kombinierten Immunchemotherapie ließen sich progressionsfreies und Gesamtüberleben signifikant verbessern; trotzdem bleibt eine definitive Heilung bei vielen Patienten weiterhin aus. Insbesondere an einem indolenten NHL erkrankte Patienten erleiden früher oder später einen Rückfall oder erweisen sich irgendwann als therapieresistent. Für Patienten mit fortgeschrittenem Stadium und mehreren Risikofaktoren nach dem IPI ist die Prognose von Beginn an immer noch unbefriedigend. Hinzu kommen bei der traditionellen Therapie Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patienten einschränken und die Einsetzbarkeit bei älteren, multimorbiden Patienten begrenzen. Weltweit wird daher daran gearbeitet, neue Konzepte für die Therapie der NHL zu entwickeln (Tabelle 1.1.5). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über aktuelle Therapieansätze gegeben werden.

<b>Wirkstoff</b>	<b>Wirkweise</b>
Bendamustin	Alkylans/Antimetabolit
Bortezomib	Proteasom- und NFκB-Inhibition
Clofarabin	Nukleosidanalogen
Lenalidomid, Thalidomid	Immunomodulation, Antiangiogenese
CAL-101	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor
Gallium nitrate	Hemmt Ribonukleotid-Reduktase/DNA-Synthese
Oblimersen sodium	Bcl-2- "Antisense"
SAHA, MGCD0103, Depsipeptide	Histon-Deacetylase-Inhibition
Rapamycin-Analoga (Temsirolimus u.a.)	Inhibiert mTOR
Geldanamycin (17-AAG)	HSP (heat shock protein)-90-Inhibitor
Enzastaurin, Bryostatin-1	Protein-Kinase-C-Inhibitoren
Pixantrone	DNA-Interkalator

**Tabelle 1.1.5:** Neue Wirkstoffe für die Therapie der NHL (ohne Antikörper) [47-49]

Eine therapeutische Option für gegen Rituximab und klassische Chemotherapeutika resistent gewordene Patienten ist die alkylierende Substanz Bendamustin, welche isoliert oder in Kombination mit anderen Substanzen, z.B. Rituximab, appliziert wird. Studien zeigen Ansprechraten von 76 % sowie zum Teil lang anhaltende Remissionen bei Patienten mit indolenten Lymphomen im Rezidiv oder bei Therapierefraktärität [39]. Auch für Patienten mit aggressiven NHL, welche aufgrund von Vorerkrankungen für eine R-CHOP-Therapie nicht in Frage kommen, scheint die Kombination aus Bendamustin und Rituximab eine Alternative zu sein [40]. Eine andere Substanz, der Proteasominhibitor Bortezomib zeigt erste vielversprechende Ergebnisse in der Kombinationstherapie, eine Zulassung für die Monotherapie besteht bereits für die Behandlung von Mantelzelllymphomen [41]. Auch die Anwendung von Clofarabin, einem Nukleosidanalogen, welches zur Therapie der AML/des MDS verwendet wird, zeigte therapeutische Erfolge in der NHL-Therapie [42].

Eine weitere derzeit untersuchte Substanzgruppe ist die Gruppe der Immunmodulatoren, darunter das aus der Therapie des Multiplen Myeloms bekannte Lenalidomid. Erste Einsätze in der Therapie indolenter NHL führten zu einer Ansprechraten von 75 % in der Kombination mit Rituximab [43]. Patienten mit indolenten NHL könnten zudem in Zukunft von einer Therapie mit dem Wirkstoff CAL-101 profitieren, einem Hemmstoff der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase, der erste Erfolge in einer Phase I-Studie erzielte [44].

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention basiert auf der Tatsache, dass ein großer Teil der NHL die Translokation t(14;18)(q32;21) aufweist, welche in der Überexpression des BCL-2-Proteins und damit der Unterdrückung proapoptotischer Signale resultiert. Oblimersen Sodium, ein sog. „Antisense“-Oligonukleotid, hemmt diesen Mechanismus; der Einsatz in klinischen Studien zeigte vielversprechende Ergebnisse [45, 46]. Einen Überblick über diese und weitere Therapeutika gibt Tabelle 1.1.5. Nicht aufgeführt sind die Antikörper gegen B-Zell-Oberflächenantigene. Auf diese Wirkstoffe soll im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden.

## **1.2 Antikörper in der Tumortherapie**

### 1.2.1 Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung

Im Rahmen der Entstehung eines malignen Tumors spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Aktuelle Konzepte unterteilen die Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunsystem in drei Phasen [50]: Zu Beginn steht die Phase der Elimination, während derer das Immunsystem maligne Zellen erkennt und eliminiert. Dies geschieht durch den Einsatz von zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Misslingt die Beseitigung der Tumorzellen und verändern sich die Tumorzellen unter dem Selektionsdruck bzw. entstehen Mutationen, so tritt die „Gleichgewichtsphase“ ein, während derer ein verzögertes Tumorwachstum stattfindet. Entwickeln die Tumorzellen nun genug Mechanismen, um der Aufmerksamkeit des Immunsystems zu entgehen, so kommt es zur finalen „Entkommensphase“, in welcher der Tumor ungehindert wachsen kann und klinisch apparent wird. Mechanismen, durch die Tumoren der Immunabwehr entgehen können, sind beispielsweise eine geringe Immunogenität durch Verlust von MHC-Molekülen oder costimulierenden Molekülen oder die Veränderung von Oberflächenantigenen. Viele Tumoren sezernieren zudem immunsuppressive Faktoren wie TGF- $\beta$ , IL-10 oder VEGF, welche Immuneffektorzellen direkt inhibieren. Ein weiterer Mechanismus ist die Mobilisation regulatorischer T-Zellen, welche ihrerseits immunsuppressive Zytokine freisetzen. Schließlich können Tumorzellen die Kollagenbildung induzieren und sich dadurch auf physikalischem Weg vor Effektorzellen schützen. [51].

Während viele konventionelle Tumortherapien auf der Zerstörung des Tumorgewebes durch toxische Substanzen oder radioaktive Strahlung basieren, gibt es zunehmende Bemühungen, therapeutisch in das Immunsystem einzugreifen und das

Tumorgewebe mittels einer exogen induzierten Immunreaktion zu eliminieren [52]. Dadurch ließe sich eine sehr viel spezifischere Wirkung gegen Tumorgewebe erzielen. Gesunde, sich schnell teilende Zellen könnten so im Gegensatz zu konventionellen Therapien stärker geschont werden, wodurch viele Nebenwirkungen vermeidbar würden. Ein Ansatzpunkt zur Aktivierung des Immunsystems ist die systemische Applikation pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IFN- $\alpha$  oder IL-2. Eine weitere Möglichkeit der Immuntherapie, die derzeit untersucht wird, ist die Vermehrung und Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen *in vitro* mit anschließender intravenöser Applikation. Auch die Entwicklung einer Tumorstoffimpfung mit aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen wird erforscht.

### 1.2.2 Monoklonale Antikörper

Eine andere, vielversprechende immun-modulatorische Therapiestrategie ist der Einsatz monoklonaler Antikörper, die spezifisch an ein Oberflächenantigen der Tumorzellen binden. Wirkweisen und Einsatzmöglichkeiten dieser Antikörper sind vielfältig. Monoklonale Antikörper bilden eine der größten Gruppen unter den innerhalb der letzten zehn Jahre neu für die Tumorthherapie zugelassenen Wirkstoffen. In der Regel handelt es sich hierbei um Antikörper der IgG-Klasse. Angriffspunkte für monoklonale Antikörper sind Oberflächenantigene, die möglichst spezifisch für das anzugreifende Tumorgewebe sein sollten. Ideale Zielantigene kommen zudem nicht frei im Plasma vor, werden auf einem hohen Niveau exprimiert und verbleiben auch nach Bindung des Antikörpers auf der Zelloberfläche [53]. Man unterscheidet unkonjugierte Antikörper, welche allein über die Bindung an ihr Zielmolekül ihre Wirkung entfalten, von konjugierten Antikörpern, die dazu dienen, toxische oder radioaktive Substanzen in das Tumorgewebe einzubringen, damit diese vor Ort maligne Zellen schädigen.

Ein Wirkmechanismus unkonjugierter Antikörper ist die Blockade von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel die Blockade des HER-2/neu-Rezeptors auf Brustkrebszellen durch den Antikörper Herceptin. Auch eine Behinderung der Blutversorgung des Tumors durch den VEGF (*vascular endothelial derived growth factor*)-Antikörper Bevacizumab ist möglich. Bevacizumab ist bereits für die Therapie des Kolorektalen Karzinoms zugelassen, und sein Einsatz bei weiteren Tumorentitäten wird geprüft. Andere Antikörper blockieren die Übertragung lebenswichtiger Signale in der Zelle oder induzieren dort pro-apoptotische Signale. Ein großer Teil der eingesetzten Antikörper, inklusive des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab, entfaltet seine Wirkung über die Aktivierung der Komplementkaskade und der antikörperbedingten zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody*

*dependent cytotoxicity*, ADCC). Hierbei erfolgt zunächst die Antikörperbindung an das Zielantigen mit dem Fab-Antikörper-Fragment, während das Fc-Fragment zunächst ungebunden bleibt. Bindet nun der Komplementfaktor C1 an die Fc-Domäne von IgM- oder IgG-Antikörpern, so wird die klassische Komplementkaskade ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung von Phagozyten und die Zerstörung der Antikörper-bindenden Zelle steht [54]. Zudem können Zellen, die IgG1- oder IgG3-Isotyp-Antikörper gebunden haben, über das Fc-Antikörper-Fragment von Fc $\gamma$ -Rezeptoren verschiedener Effektorzellen erkannt werden. Diese Reaktion ermöglicht die Phagozytose der Zielzelle durch Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Zellen. Nichtphagozytische Zellen wie NK-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen setzen nach Besetzung ihrer Fc-Rezeptoren gespeicherte Mediatoren frei. NK-Zellen beispielsweise erkennen mit Hilfe ihres Fc $\gamma$ RIII-Rezeptors (CD16) die IgG1- und IgG3- Subklassen und reagieren auf einen entsprechenden Stimulus mit der Freisetzung cytoplasmatischer Granula, die u.a. Perforin und Granzyme enthalten. Folge ist die Apoptose der Zielzelle [55]. Neuere Ergebnisse deuten an, dass Patienten nach der Immuntherapie mit einem tumorspezifischen Antikörper Tumor-Antigen-spezifische T- Zellen ausbilden [56]. Dies ließe sich dadurch erklären, dass dendritische Zellen mittels ihrer Fc-Rezeptoren sterbende Antikörper-markierte Tumorzellen phagozytieren und anschließend Tumor-Antigen-spezifische CD4- als auch CD8-T-Zell-Antworten induzieren [57]. Dies entspricht einem Impfeffekt, der auch die langanhaltenden Wirkungen einer Antikörper-Therapie bei manchen Patienten erklären würde.

#### 1.2.2.1 Monoklonale Antikörper in der Therapie der NHL

Der erste für die Tumorthherapie zugelassene monoklonale Antikörper ist Rituximab, welches als Zielstruktur das Oberflächenantigen CD20 auf B-Zellen besetzt. Mit Hilfe dieses Wirkstoffes ließen sich beeindruckende Fortschritte in der Therapie der NHL erzielen. Rituximab ist ein chimärer Antikörper, bestehend aus einer humanen IgG1 konstanten Region und zwei murinen variablen Regionen spezifisch für CD20 [58]. Die Bindung von Rituximab an sein Zielantigen löst verschiedene Mechanismen aus, darunter die Aktivierung der Komplementkaskade sowie der antikörperbedingten zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Hinzu kommen direkte, durch die Bindung des Antikörpers ausgelöste Effekte wie eine Beeinflussung des Zellzyklus bis hin zur Apoptoseinduktion [59]. Zudem scheint Rituximab Tumorzellen für Chemotherapeutika zu sensibilisieren [60]. Trotz der positiven Ergebnisse gibt es auch einige Einschränkungen in der Wirksamkeit von Rituximab: Zum einen reagieren nicht alle Patienten auf diesen Wirkstoff; am meisten profitieren Patienten mit gewissen

genetischen Eigenschaften wie bestimmten Fc $\gamma$ III-Polymorphismen sowie einer Bcl-2-Überexpression [61, 62]. Zum anderen entwickeln alle Patienten irgendwann eine Resistenz gegen Rituximab; die Ursachen hierfür sind noch nicht hinreichend geklärt [59]. Zur Zeit werden daher weitere CD20-Antikörper untersucht, die an ein anderes Epitop des CD20-Antigens binden und somit ggf. auch bei Rituximab-resistenten Patienten Erfolge erzielen können [63]. Ein weiterer Versuch, die Wirksamkeit von Anti-CD20-Antikörpern zu erhöhen, ist die Koppelung an radioaktive Substanzen. Durch eine solche gezielte Antikörpervermittelte Lymphombestrahlung werden nicht nur die markierte, sondern auch benachbarte Lymphomzellen zerstört (Crossing-Effekt). Für diese Radioimmunotherapie sind 2 Substanzen zugelassen: Tositumomab ( $^{131}\text{I}$ -Anti-CD20) und Ibritumomab ( $^{90}\text{Y}$ -Anti-CD20). Beide Wirkstoffe kommen bisher hauptsächlich bei therapierefraktären Verläufen oder Patienten, die einen Rückfall erlitten haben, zum Einsatz, werden jedoch im Rahmen klinischer Studien auch in der Erstlinien- oder Konsolidierungstherapie mit guten Ergebnissen eingesetzt [64]. Neben dem Oberflächenmarker CD20 bieten sich noch andere Oberflächenantigene als Zielstrukturen auf malignen B-Zellen an (Tabelle 1.2.1).

<b>Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Konjugat</b>
Rituximab	CD20	ohne
Ofatumumab, Veltuzumab, Ocrelizumab	CD20 (2. Generation)	ohne
Obinutuzumab, PRO 131921, Ocaratuzumab	CD20 (3. Generation)	ohne
Humanisiertes CD20	CD20	ohne
Tositumomab (Bexxar)	CD20	I-131
Ibritumomab (Zevalin)	CD20	Y-90
CAMPATH-1H	CD52	ohne
Epratuzumab	CD22	ohne, I-131, Y-90
Apolizumab (Hu1D10)	HLA-DR	ohne
Galiximab	CD80	ohne
Bevacizumab	VEGF	ohne

**Tabelle 1.2.1:** Monoklonale Antikörper/ Radioimmunokonjugate für die Therapie der NHL [47, 63]

### 1.2.3 Bispezifische Antikörper

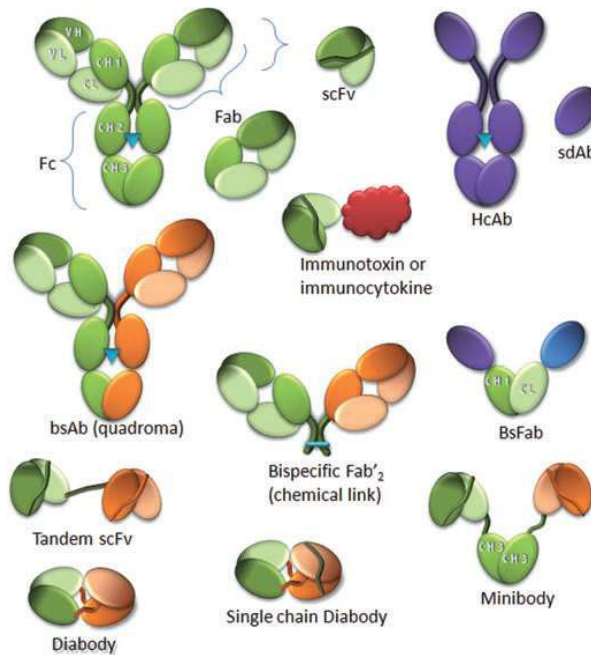
Seit der Entwicklung der ersten Antikörperformate in den 70er Jahren wurden diese ständig weiterentwickelt, um eine optimale Wirkung bei möglichst geringer Toxizität zu erzielen. Ein wichtiger Schritt war die Verringerung der Immunogenität der Antikörper, indem man statt muriner chimäre Antikörper entwickelte. Mittlerweile gibt es 22 Antikörperformate, die für die Therapie maligner und autoimmuner Erkrankungen zugelassen sind. Trotz der erzielten



Erfolge gibt es jedoch weiterhin Grenzen. So gelingt mit keinem der in der Tumorthherapie verwendeten Wirkstoffe bei alleiniger Anwendung (Monotherapie) die Heilung der malignen Grunderkrankung [65]. Entscheidende Einschränkungen der Wirksamkeit ergeben sich unter anderem aus der Antikörper-Größe, die das Eindringen in das Tumorgewebe verlangsamt, sowie Interaktionen des Fc-Fragmentes mit Fc-Rezeptoren auf anderen Körperzellen, beispielsweise Endothelzellen oder Makrophagen. Diese Interaktionen bewirken, dass nur ca. 20 % der Antikörper das Tumorgewebe erreichen, während der Rest v.a. im Blutkreislauf verbleibt [66]. Ein weiterer Grund für eine limitierte Wirksamkeit liegt in einem Polymorphismus der Fc $\gamma$ -Rezeptoren begründet, die entscheidend an der Umsetzung der antikörperbedingten Zytotoxizität beteiligt sind. Nur 20 % der Bevölkerung besitzen eine Punktmutation im Bereich des Fc $\gamma$ RIIIa- Rezeptors, welche eine fünffach höhere Affinität zu IgG1-Fc bedingt, während 80 % nur niedrig-affine Rezeptoren besitzen und somit in Bezug auf eine Antikörpertherapie benachteiligt sind [66]. Eine weitere Behinderung in der Rezeptor-Antikörper-Bindung entsteht aus der Glykosylierung im Bereich der Fc-Region der standardmäßig eingesetzten Antikörper [67]. Schließlich müssen therapeutisch eingesetzte Antikörper mit den körpereigenen IgG-Molekülen konkurrieren. 66 % der im Körper zirkulierenden IgG-Antikörper gehören der IgG1-Subklasse an und können daher ebenfalls an den Fc $\gamma$ RIIIa- Rezeptor binden. Daraus lässt sich die Tatsache erklären, dass *in vivo* sehr viel höhere Antikörper-Konzentrationen als *in vitro* benötigt werden, um eine effiziente ADCC auszulösen [68]. Ein weiterer Nachteil konventioneller Antikörper ist ihre Affinität zu inhibitorischen Fc-Rezeptoren wie Fc $\gamma$ RIIIb auf B-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Neutrophilen Granulozyten. Diese Rezeptoren sind normalerweise dafür verantwortlich, ein Gegengewicht zu den aktivierenden Stimuli zu setzen und damit Immunreaktionen zu kontrollieren und zu begrenzen. Durch diese Interaktion wird jedoch die Effektivität der therapeutischen Antikörper gemindert [66].

Im Rahmen der Versuche, die genannten Einschränkungen zu umgehen, wurden frühzeitig bispezifische Antikörper (BsAb) entwickelt. In den letzten Jahren wurde diese Antikörperklasse intensiv weiterentwickelt, so dass verschiedenste Formate entstanden (Abb. 1.2.1). Das Besondere an bispezifischen Antikörpern ist, dass sie in der Lage sind, gleichzeitig an zwei verschiedene Antigene zu binden. Dadurch eröffnet sich eine Vielfalt therapeutischer Möglichkeiten [69]. Zum einen können Wirkstoffe hergestellt werden, die auf direktem Wege gleich zwei Rezeptoren oder Liganden blockieren/binden und somit eine doppelte biologische Effektivität entfalten. Ein weiterer Vorteil könnte die hohe Spezifität der BsAb sein, wenn sie auf zwei bestimmte Oberflächenantigene ausgerichtet sind, die nur auf

der Zielzelle in dieser Kombination vorkommen. Schließlich, und dieses Feld ist besonders interessant für die Therapie maligner Tumoren, gibt es BsAb, die mit einem Arm an ein Tumorantigen binden und mit dem anderen Arm an eine zytotoxische Substanz oder an eine Immuneffektorzelle. Die Folge ist eine gezielte und potente Immunreaktion.



**Abb. 1.2.1:** Antikörperfragmente mit therapeutischem Potential: Oben links ein konventioneller IgG- Antikörper, bestehend aus Fc- und Fab- Fragment, dargestellt in grün (hell=Leichtkette, dunkel=schwere Kette). Daneben verschiedene neue Antikörperformate. Eine andere Bindungsspezifität wird orange dargestellt. HcAb von Kameliden und ihre Fragmente (sdAb für single-domain antibodies) sind violett oder blau dargestellt. Das rote Molekül stellt ein Zytokin oder Toxin dar. BsAb, bispecific antibodies; bsFab, bispecific Fab fragment; HcAb, heavy chain only antibodies. [66] *(This is an unofficial translation of an article that appeared in a Wiley publication. The publisher has not endorsed this translation.)*

*Reprinted with permission.*

Eine Reihe von BsAb ist derzeit Gegenstand erster klinischer Studien (Tabelle 1.2.2) [65]. Die Tumorantigene, die durch den einen Arm der bispezifischen Antikörper erkannt werden, entsprechen prinzipiell denjenigen, die Ziel bisheriger monoklonaler Antikörpertherapien sind, beispielsweise Her2, ERGF, CD20 oder auch CD19. Die andere Bindungsstelle des Antikörpers wird so konzipiert, dass sie spezifisch an aktivierende Rezeptoren auf Immuneffektorzellen bindet. Mögliche Angriffspunkte stellen hier zum einen der T-Zell-Rezeptor CD3 sowie alle vier Klassen von Fc-Rezeptoren auf humanen Leukozyten dar: FcγRI (CD64, Monozyten und Makrophagen) oder FcαRI (CD89, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, neutrophile Zellen, Untergruppen von B- und T-Zellen), FcγRII (CD32, Monozyten, Granulozyten, Untergruppen von T- Zellen) sowie FcγRIIIa (CD16, neutrophile Zellen, NK-Zellen, Makrophagen) [65, 69]. Insbesondere T- und NK-Zellen sind bevorzugte Effektorzellen bei der Entwicklung bispezifischer Antikörper für die Tumorthherapie.

Name	Format	Zielantigene	Malignom
MDX-210	(Fab') <sub>2</sub>	HER2 × CD64	Brust/Ovarial
MDX-H210	(Fab') <sub>2</sub>	HER2 × CD64	Brust/Ovarial
MDX-447	(Fab') <sub>2</sub>	EGFR × CD64	Lunge, Kolorektal...
HRS-3/A9	(Fab') <sub>2</sub>	CD30 × CD16	M. Hodgkin
Her2Bi	Cross-linked IgGs	HER2 × CD3	Brust/Prostata
CD20Bi	Cross-linked IgGs	CD20 × CD3	Multiples Myelom
Catumaxomab	Triomab	EpCAM × CD3	Maligner Aszites
Ertumaxomab	Triomab	HER2 × CD3	Brust, metastasiert
Bi20	Triomab	CD20 × CD3	B-Zell Malignome
rM28	Dimeric TaFv	NG2 × CD28	Melanom
Blinatumomab	BiTE	CD19 × CD3	NHL und B-ALL
MT110	BiTE	EpCAM × CD3	Lunge, Kolorektal
TF2 DNL	triFab	CEA × HSG	Kolorektal

**Tabelle 1.2.2:** Bispezifische Antikörper in klinischen Studien [65].

### 1.2.3.1 Bispezifische Antikörper für die Therapie der NHL

Auch für die Therapie der B- Zell- NHL gibt es einige vielversprechende Ansätze, die auf der Entwicklung von BsAb basieren. Zielantigene sind hier, analog zu Rituximab, das CD20-Antigen, aber auch CD19, ein weiteres B-Zell-Oberflächenantigen. Dieses eignet sich besonders als Ziel in der Immunotherapie, da es nicht auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, sondern erst ab dem Beginn der Differenzierung zur B-Zelle [70]. CD19 findet sich auf allen B-Zell-Entwicklungsstufen, bis es schließlich im Rahmen der endgültigen Differenzierung zur Plasmazelle herunterreguliert wird. Die Expression dieses Antigens bleibt auch bei der malignen Transformation von B-Zellen erhalten und geht auch im Verlauf der Erkrankung fast nie verloren. Es stellt daher ein ideales Zielantigen für Antikörpertherapien dar. Potentielle BsAb für die Therapie des NHL basieren sowohl auf der Aktivierung von T- als auch von NK-Zellen.

## 1.3 Zielsetzung

Die Entwicklung von Bispezifischen Antikörpern, die eine zielgerichtete Elimination maligner Zielzellen durch T- und NK-Zellen bewirken, ist eine der größten Hoffnungen in der Tumorthherapie. Voraussetzung für die Wirkung der Antikörper *in vivo* ist eine ausreichende Anzahl von Effektorzellen, die funktionell intakt sind und somit ihre zytotoxische Wirkung entfalten können. Die meisten Untersuchungen mit BsAb, die für die

Therapie der B-Zell-NHL entwickelt wurden, fanden *in vitro* unter Verwendung von Immunzellen von gesunden Spendern statt. Auch erste *in vivo*-Experimente mit Maus-Modellen bedienten sich dieser Methode. Aus diesen Ergebnissen lässt sich nicht ableiten, ob eine Anwendung der Antikörper bei NHL-Patienten erfolgversprechend ist und welche Einschränkungen es hinsichtlich der Vorbedingungen geben könnte. Gegenstand der vorliegenden Studie war daher die Frage, ob Patienten mit NHL in unterschiedlichen Stadien und nach verschiedenen Therapieregimen ausreichend funktionelle Immunzellen besitzen, die mit Hilfe des BsAb zur Eliminierung von Tumorzellen aktiviert werden können. Dazu wurden an der Uniklinik Düsseldorf Blutproben von 44 Patienten mit NHL gewonnen. Zunächst wurde mittels FACS-Analyse untersucht, welche Zellpopulationen in welchem Ausmaß im peripheren Blut vorkamen. Anschließend erfolgte eine Separation von T- und NK-Zellen und eine Untersuchung der Zellfunktionen unter Anwendung des CD107a-Zytotoxizitätsassays. Dabei wurde zunächst die zytotoxische Effektorzellfunktion untersucht, die als Reaktion auf bekannte aktivierende Reagenzien auftrat. Im Anschluss wurde die Aktivierung durch bispezifische Antikörper bestimmt. Zudem wurde die Aktivierung abhängig von der bispezifischen Bindung an die Zielantigene untersucht, verbunden mit der Frage, ob ggf. die alleinige Bindung an den Effektorzellrezeptor bereits zu einer zytotoxischen Reaktion führt. Um zu bestimmen, ob Immunzellen von Patienten mit NHL in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, folgte ein Vergleich mit der Zellfunktion von 17 gesunden Probanden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und gesunde Spender**

44 Patienten mit einem B-Zell-NHL, die in der Ambulanz der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf in Behandlung waren, nahmen an der Studie teil. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität hatte die Studie zuvor genehmigt und jeder Teilnehmer schriftlich sein Einverständnis gegeben (Studiennr. 3344). Von 27 Patienten wurde ein Immunstatus angefertigt, bei 32 Patienten wurde die Effektorzellaktivität untersucht. Charakteristika dieser Patienten sind in Tabelle 2.1.1 aufgeführt. Zusätzlich zu den Patienten nahmen 17 gesunde Probanden an der Studie teil (Charakteristika s. Tabelle 2.1.2). Bei 11 Probanden wurde ein Immunstatus erhoben. Jedem Teilnehmer wurden 5 (7ml) EDTA- Röhren venöses Blut abgenommen. Das Blut wurde innerhalb von 24-36h bearbeitet.

**Tabelle 2.1.1: Patientencharakteristika**

Patientenzahl	32
Männlich	19
Weiblich	13
Alter (Median)	64
Streubreite	33-81
NHL Subtyp	
Multiples Myelom	11
Follikuläres Lymphom	5
Hochmalignes NHL	8
Niedrigmalignes NHL	2
Immunozytom	1
MALT-Lymphom	1
B-CLL	4
Patienten nach PBSZT	16
Vorherige Therapie	
Zyklen	6,5 (0-16)
Regime	2 (0-9)
Zeit seit der letzten Therapie (Monate)	

Zytotoxisch	8 (0-120)
Immunotherapie inkl. Rituximab	3,5 (0-53)
Unter Therapie	
Zytotoxisch	7
Rituximab	10
Lenalidomid	2
Thalidomid	1

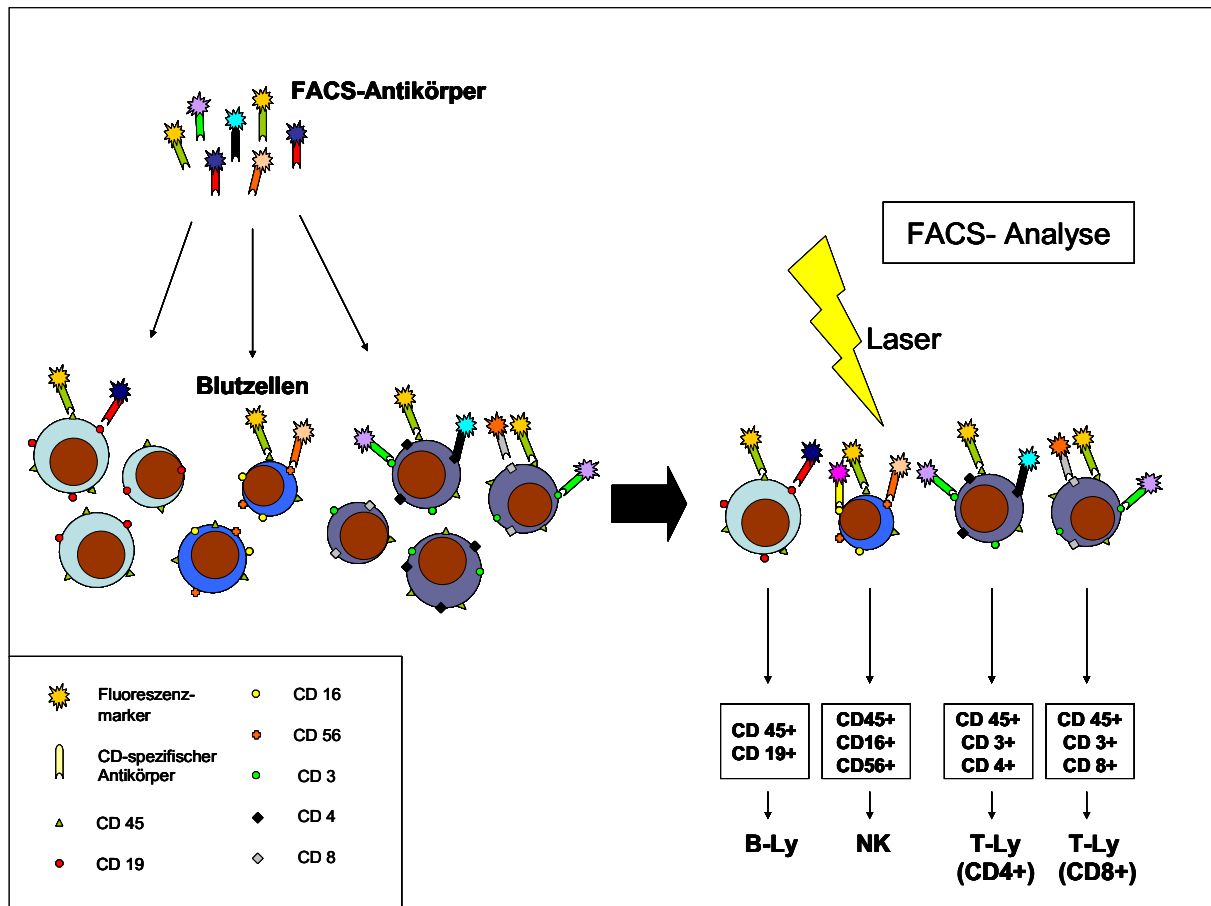
**Tabelle 2.1.2: Eigenschaften gesunder Probanden**

Anzahl	17
Männlich	6
Weiblich	11
Alter (Median)	28
Streubreite	23-54
Alter<35	11
Alter $\geq$ 50	6

## 2.2 Immunstaten

Das Blut von 27 Patienten und 11 gesunden Probanden wurde auf Anzahl und Zusammensetzung der Leukozyten untersucht. Mit Hilfe des Zellzähl-Gerätes Sysmex Kx-21N (Sysmex, Norderstedt) wurde zunächst aus jeder Blutprobe die Anzahl der Leukozyten und der prozentuale Anteil der Lymphozyten bestimmt. Das Gerät analysierte dafür ca. 500  $\mu$ l Vollblut. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Lymphozyten-Untergruppen. Dazu wurde in 2 Reagenzgläser jeweils 50  $\mu$ l Blut pipettiert. Es folgte die Zugabe von 20  $\mu$ l einer Färbemischung aus dem MultiTEST IMK Kit Reagenz (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Eine Probe wurde mit folgender Mischung inkubiert: MultiTEST CD3 FITC/ CD8 PE/ CD45 PerCP/ CD4 APC. Zu der anderen Probe wurde hinzugegeben: MultiTEST CD3 FITC/ CD16 und CD56 PE/ CD45 PerCP/ CD19 APC. Beide Proben wurden kurz zentrifugiert, es folgte eine 15-minütige Inkubation in Dunkelheit. Anschließend erfolgte die Durchführung einer Erythrozytenlyse mit Hilfe von 450  $\mu$ l MultiTEST IMK Kit Lysing Solution (1:10 verdünnt mit Aqua dest.). Die Proben wurden erneut zentrifugiert und 15 min.

lang inkubiert. Nun erfolgte die Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen mit Hilfe des FACSCalibur™ (BD Biosciences) (Abb. 2.2.1).



**Abb. 2.2.1:** Prinzip der Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen mittels FACS- Analyse. Die Zellen werden zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert, die an bestimmte Oberflächenantigene binden. Anschließend wird mit Hilfe der unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der Fluoreszenzmarker bestimmt, welche Antigene eine Zelle trägt und diese dann entsprechend eingeordnet. Abkürzungen: B-Ly, B-Lymphozyt; NK, natürliche Killerzelle; T-Ly, T-Lymphozyt.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der für die deutsche Population ermittelten Normalwerte bewertet (Tabelle 2.2.1).

<b>Lymphozyten</b>	1,14 - 3,38	<b>CD4/CD8 Ratio</b>	0,9 - 5,0
<b>T-Lymphozyten</b>	0,78 - 2,24	<b>B-Lymphozyten</b>	0,08 - 0,49
<b>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten</b>	0,49 - 1,64	<b>NK-Zellen</b>	0,08 - 0,69
<b>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten</b>	0,17 - 0,88		

**Tabelle 2.2.1:** Normalwerte für die Lymphozytenuntergruppen in der deutschen Bevölkerung (Perzentile 2,5-97,5, 10<sup>3</sup> Zellen/ $\mu$ l) [71]

## 2.3 Zellisolation und – separation

### 2.3.1 Ficoll

Um die mononukleären Zellen (MNCs) aus dem Vollblut zu isolieren, wurde eine Dichtezentrifugation mit Hilfe der Biocoll Separating Solution (Biochrom, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde das Vollblut zunächst in 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und mit warmem PBS (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) verdünnt. Dann wurden in ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Das Blut wurde langsam daraufgeschichtet, so dass 2 Phasen entstanden. Es folgte die Zentrifugation für 35 min. bei Raumtemperatur, 2000 rpm und ausgeschalteter Bremse. Im Anschluss konnte mit einer Pipette der Interphasering mit den MNCs zwischen Serum und Ficoll-Schicht entnommen werden. Dieser wurde in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS/EDTA vermischt und 7 min. bei 1900 rpm und 4°C zentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen wurden in PBS/EDTA resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden 20  $\mu$ l der Suspension entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

War das Zellpellet zu stark mit Erythrozyten verunreinigt, erfolgte im Anschluss eine Erythrozytenlyse mit Ammoniumchloridlösung. Dazu wurden die Zellen in 20 ml gekühlte Ammoniumchloridlösung aufgenommen und unter gelegentlichem Schwenken 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Röhrchen mit PBS/EDTA aufgefüllt und 7 min. zentrifugiert. Nach Resuspension in PBS/EDTA wurde erneut zentrifugiert, dieser Schritt wurde zweimal wiederholt.

### 2.3.2 Magnetische Zellseparation mit MACS

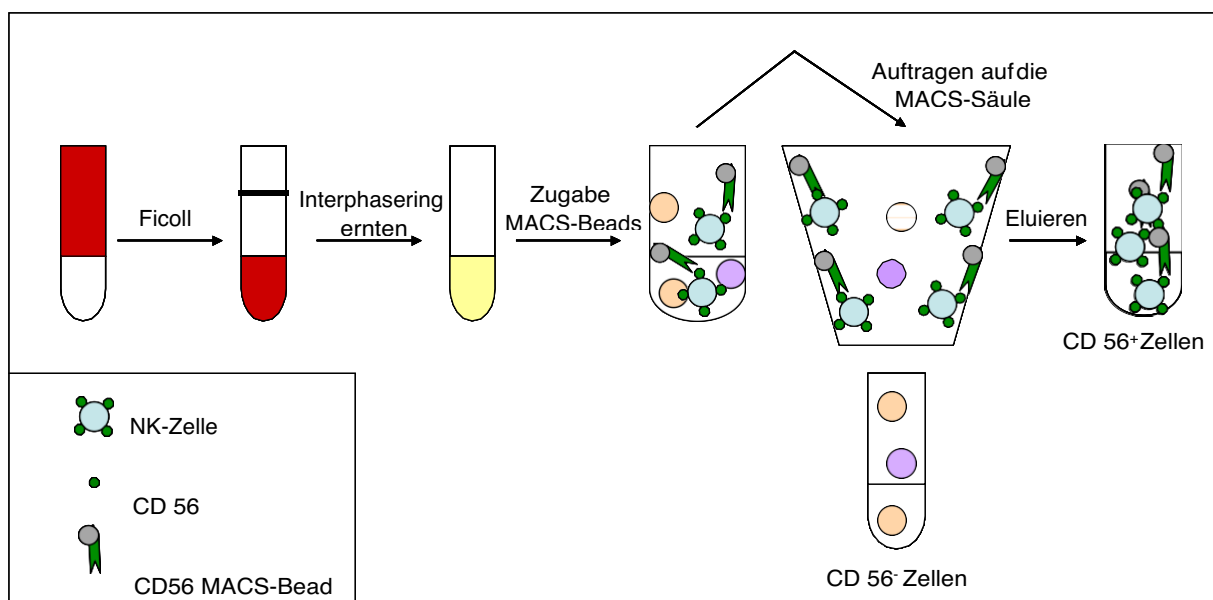
Um aus den MNCs die NK-Zellen herauszutrennen, wurden CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) genutzt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die



Zellen zentrifugiert und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer (PBS+0,5% BSA+2mM EDTA) pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Nun wurden 20  $\mu\text{l}$  CD56 MicroBeads/ $10^7$  Zellen hinzugegeben, die Lösung wurde geschwenkt und schließlich für 20 min. bei 4-8  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss erfolgte zum Waschen die Resuspension in 10 ml MACS-Puffer und die Zentrifugation bei 1900 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ , für 7 min. Die so gereinigten Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer resuspendiert und auf die mit 3 x 500  $\mu\text{l}$  äquilibrierten MS-Säulen (Miltenyi) aufgetragen. Im Anschluss wurde mit 3 x 500  $\mu\text{l}$  Puffer gewaschen. Die so gewonnenen CD56<sup>-</sup> Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung gekühlt. Die MACS-Säulen wurden auf ein 10 ml Falcon-Röhrchen aufgesetzt und die CD56<sup>+</sup> Zellen mit 1 ml Puffer eluiert. Nun wurden aus den CD56<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellpopulationen 20  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit abgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden beide Röhrchen mit Puffer aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert.

Im Regelfall wurde mit CD56<sup>-</sup> Zellen weitergearbeitet, da diese sich größtenteils aus T-Lymphozyten zusammensetzen und dementsprechend Informationen über die T-Zell-Funktion liefern. War jedoch der Anteil an B-Lymphozyten sehr groß, d.h. lag eine B-CLL vor, erfolgte die Isolation der T- Zellen analog zu der der NK-Zellen mit Hilfe von CD3 MicroBeads (Miltenyi).

Eine zusammenfassende Darstellung der Zellisolation gibt Abb. 2.3.1.



**Abb. 2.3.1:** Isolation von NK-Zellen aus peripherem Blut: Zunächst werden mittels Dichtezentrifugation auf Ficoll-Lösung mononukleäre Zellen isoliert. Nun erfolgt die Zugabe von magnetischen, an CD56-Antikörper gekoppelten MACS-Beads. Beim Auftragen auf eine MACS-Säule bleiben die so markierten Zellen in der Säule haften und können anschließend eluiert werden.

CD56<sup>+</sup> Zellen durchlaufen die Säule und können darunter aufgefangen werden. Die Isolation von T-Zellen erfolgt analog mit CD3-Beads.

## **2.4 Zellkultur**

Alle Zellen wurden in einer durchschnittlichen Dichte von bis zu  $10^6$  Zellen/ml bei 37° C im Brutschrank (FormaScientific, Thermo Life Sciences, Egelsbach) mit 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte kultiviert.

### **2.4.1 Kultivierung von MNCs**

NK- und T-Zellen wurden in 1-2 ml Kulturmedium pro  $10^6$  Zellen resuspendiert. Das Medium setzte sich zusammen aus RPMI-1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgien) mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum)(Biochrom), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland). Hinzu kamen für die Kultivierung der NK-Zellen 1000 U IL-2/ml (Novartis, Rocky Hill, NJ) und für die T- Zellen 100 U IL-2/ml. Die Zellen wurden über Nacht auf 12er Mikrotiterplatten kultiviert.

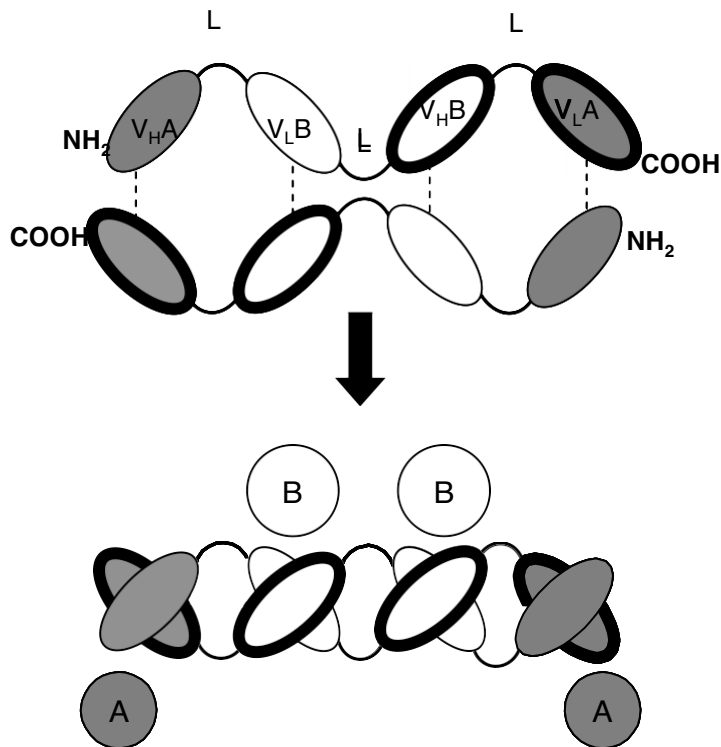
### **2.4.2 Zelllinien**

Die humane Leukämie-Zellreihe K562 (CCL-243) und die CD19<sup>+</sup> humane Lymphomzellreihe Raji (CCL-86) von der American Type Culture Collection (ATCC) wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

## **2.5 CD107a-Zytotoxizitätsassay**

### **2.5.1 Bispezifische Antikörper**

Als bispezifische Antikörper wurden CD19XCD16 TandAb sowie CD19XCD3 TandAb der Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, verwendet. Jeder dieser TandAb setzt sich aus 2 einzelnen, über Proteinbrücken verbundene Antikörper mit je einer Spezifität für CD19 und einer Spezifität für CD16 bzw. CD3 zusammen (Abb. 2.5.1). Informationen zur Produktion der Antikörper finden sich in der Literatur [72, 73]



**Abb. 2.5.1:** Aufbau des bispezifischen TandAb Antikörpers: Zwei einzelne, nicht funktionsfähige monomere Antikörpermoleküle bilden non-kovalente Bindungen aus, die in der Formation eines voll funktionsfähigen, tetravalenten Antikörpers resultieren. Dieser besitzt 2 Bindungsstellen für das Antigen A (z.B. CD3, CD16) und 2 Bindungsstellen für das Antigen B (z.B. CD19). Die variablen Antikörper-Domänen ( $V_H$ ,  $V_L$ ) für die 2 Spezifitäten (A/B) sind über Peptidbrücken (L) verbunden. Das entstehende Molekül bindet bivalent an seine Zielantigene und zeigt im Vergleich zu einfachen bispezifischen Antikörpern verbesserte pharmakologische Eigenschaften sowie eine erhöhte biologische Aktivität.

### 2.5.2 Durchführung des Assays

Nach der nächtlichen Inkubation wurden T- und NK-Zellen sowie K562- und Raji-Zellen in Falcon-Röhrchen eingefüllt, mit PBS verdünnt und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (7min., 1900 rpm, 23 °C) und jeweils in 100  $\mu$ l Medium/ $10^6$  Zellen resuspendiert.

Nun wurde eine 24-Well-Platte beschriftet und der CD107a-Assay angesetzt (Tabelle 2.5.1). Dazu wurde in alle Wells mit Ausnahme der ungefärbten Kontrolle zunächst 5  $\mu$ l CD107a FITC oder CD107a PE (BD Biosciences) vorgelegt. Auf diese Weise konnte der Antikörper direkt an das CD107a-Antigen binden, sobald die Zellen degranulierten. Nun wurden in alle Wells  $10^6$  NK- bzw. T-Zellen gegeben. Ein Well diente als Negativkontrolle, hier wurde kein weiteres stimulierendes Agens hinzugefügt. Ein Well pro Zellreihe diente als

Positivkontrolle, hier wurden den NK-Zellen K562-Zellen im Verhältnis 1:1 hinzupipettiert. Den T-Zellen wurde das Superantigen Staphylococcal enterotoxin B (SEB, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben (1 µl/well). In die zwei folgenden Wells wurden Raji Lymphom-Zellen im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. In das letzte dieser beiden Wells wurde den T-Zellen nun der bispezifische CD19XCD3 TandAb Antikörper (Affimed therapeutics AG, Heidelberg, Deutschland) bzw. den NK-Zellen der CD19XCD16 TandAb (Affimed therapeutics) in einer Konzentration von 1 µg/ml zupipettiert.

Ein sechstes Well wurde in 9 Experimenten mit den NK- und T-Zellen gesunder Kontrollen aufgesetzt, hier wurden den NK- bzw. T-Zellen nur die TandAb Antikörper hinzugefügt.

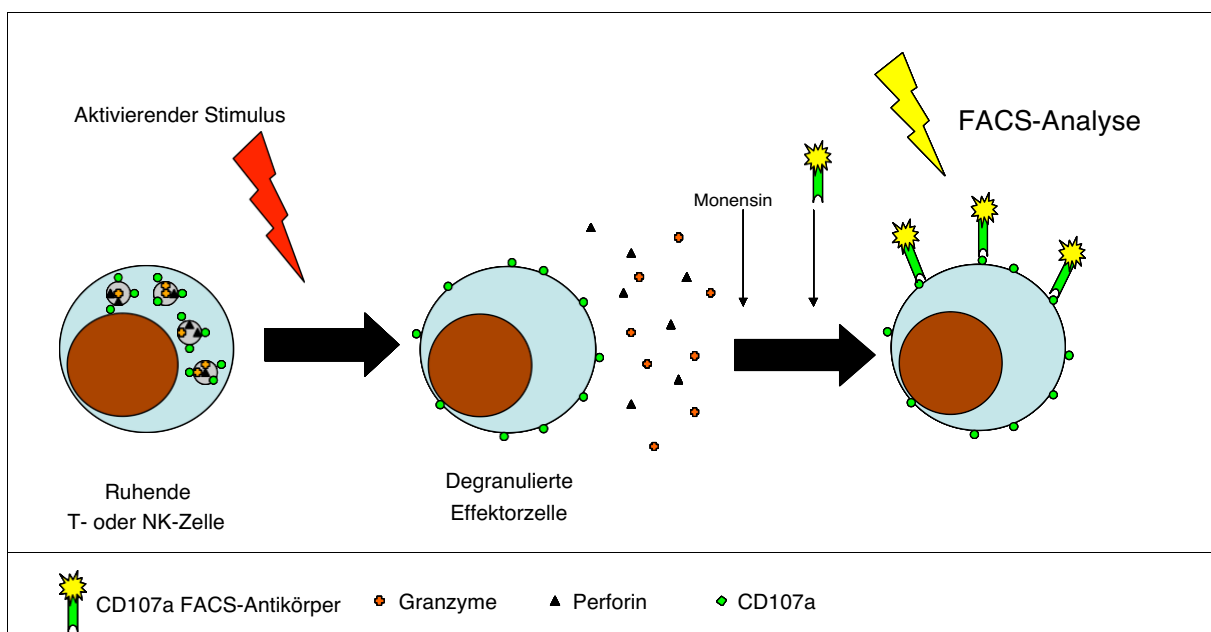
<b>NK- Zellen (je 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Zusätze</b>	<b>T- Zellen (je 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Zusätze</b>
<b>Ungefärbt</b>	Keine	<b>ungefärbt</b>	keine
<b>Negativkontrolle</b>	CD107a-Ak	<b>Negativkontrolle</b>	CD107a-Ak
<b>Positivkontrolle</b>	CD107a-Ak + K562- Zellen (1:1)	<b>Positivkontrolle</b>	CD107a-Ak + SEB
<b>+Target</b>	CD107a-Ak + Raji-Zellen (1:1)	<b>+Target</b>	CD107a-Ak + Raji-Zellen (1:1)
<b>+Target/TandAb</b>	CD107a-Ak + Raji- Zellen (1:1) +CD19XCD16TandAb	<b>+Target/TandAb</b>	CD107a-Ak + Raji- Zellen (1:1) +CD19XCD3TandAb
<b>+TandAb</b>	CD107a-Ak +CD19XCD16TandAb	<b>+TandAb</b>	CD107a-Ak +CD19XCD3TandAb

**Tabelle 2.5.1:** Versuchsaufbau für den CD107a- Zytotoxizitätsassay.

Die so präparierten Platten wurden nun eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert, dann wurden 2 µl Monensin (10 µl/ml) (BD Golgi Stop, BD Biosciences) in jedes Well pipettiert. Es folgte eine Inkubation für fünf Stunden. Die Zellen wurden anschließend entnommen, in FACS-Gefäße gefüllt und mit PBS gewaschen (7 min., 1900 rpm, 4 °C). Nach Abkippen der Überstände wurden die restlichen FACS-Antikörper (5 µl/Gefäß) hinzugefügt, unter Auslassen der ungefärbten Kontrolle. Dabei wurde jeweils für die Oberflächenmarker CD3, CD8, CD16 und CD56 angefärbt. Es wurden CD3 ECD, CD8 APC, CD56 PE and CD16 PC5 von Beckman Coulter (Marseille, Frankreich) sowie CD16 APC-Cy7 von BD Biosciences verwendet. Nun wurden die Röhrchen 30 min. bei 3-4 °C inkubiert und anschließend mit 2 ml PBS gewaschen (7 min., 1900 rpm, 4 °C). Nach Zugabe von 500 µl PBS in jedes Gefäß erfolgte die FACS-Messung am FACS Canto<sup>TM</sup> (BD Biosciences). Der prozentuale Anteil der aktivierten NK-Zellen wurde als Zellpopulation bestimmt, die in der FACS- Messung sowohl

durch die Expression von  $CD56^+$  als auch  $CD107a^+$  identifiziert wurde. In den neun Kontrollassays wurden die NK-Zellen indirekt als  $CD3^-$  Zellpopulation ermittelt. Dies war aufgrund ihrer Anreicherung mit CD56- MicroBeads ebenso zuverlässig wie die direkte Anfärbung über CD56 FACS-Antikörper. Aktivierte T-Zellen wurden als  $CD3^+ CD107a^+$  Zellen bestimmt.

Im Anschluss an diese Messungen wurden die Werte der Assays aussortiert, in denen die Negativkontrolle höhere Werte zeigte als die Positivkontrolle. Schließlich waren Daten über die NK-Zellen von 26 Patienten und 14 gesunden Kontrollen verwendbar. Bei den T-Zellen konnten die Werte von 32 Patienten und 17 Kontrollen genutzt werden.



**Abb. 2.5.2:** Prinzip des CD107a-Assays: Wird eine Effektorzelle einem aktivierenden Stimulus ausgesetzt, kommt es zur Exozytose zytotoxischer Granula, die auf ihrer Oberfläche CD107a tragen. Das auf der Zelloberfläche präsente CD107a wird nach Zugabe von Monensin nicht wieder in die Zelle aufgenommen und kann nun mit Hilfe von FACS-Antikörpern nachgewiesen werden. Mittels weiterer Antikörper für andere Oberflächenantigene kann die aktivierte Zelle einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden. So lässt sich der Prozentsatz aktivierter Zellen innerhalb einer Zellpopulation ermitteln.

## 2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel sowie SigmaPlot 10.0 und SigmaStat 3.5 für Windows (SysStat Software Inc.) genutzt. Für Vergleiche zwischen gesunden Probanden und Patienten wurde der Student-T-Test verwandt. Die Daten wurden mittels des Kolmogorov Smirnov Test auf Normalverteilung hin untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen Therapiekonzepten wurden durch Anwendung einer ANOVA für gepaarte Proben und anschließende paarweise Vergleiche multipler Proben (Holm-Sidak Methode oder Tukey's post-hoc Test) ermittelt. Eine Korrelation zwischen T- und NK-Zellfunktion wurde mittels linearer Regressionsanalyse durchgeführt. Gruppenwerte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. *P*-Werte  $<0,05$  galten als signifikant.

### **3. Ergebnisse**

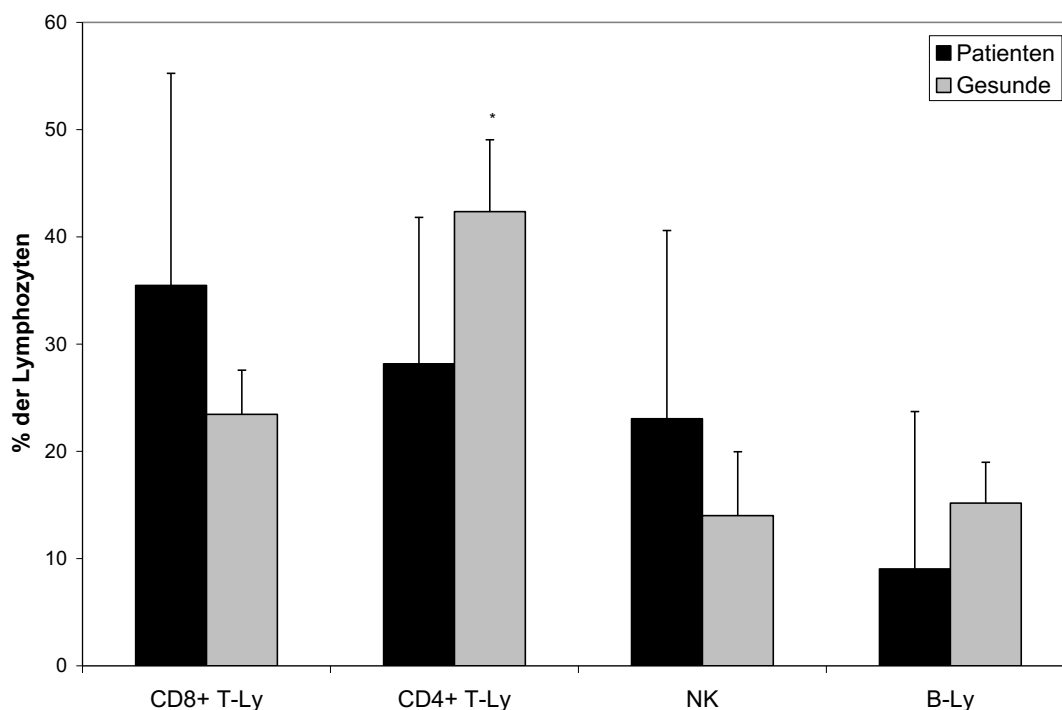
#### **3.1 Anzahl und Verteilung der Immunzellen im peripheren Blut**

##### 3.1.1 Vergleich von Patienten und gesunden Kontrollen

In den Blutproben der Patienten fand sich eine mediane Zahl von 4500 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  mit einer Bandbreite von 1100/ $\mu\text{l}$  bis hin zu 31200/ $\mu\text{l}$  bei einem Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie (CLL). 15 von 27 Patienten hatten Leukozytenzahlen außerhalb des Normbereichs: 12 Patienten zeigten Werte  $<4000$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , 3 Patienten Werte  $>10000$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ . Die gesunden Probanden hatten hingegen alle Werte im normalen Bereich (4000 bis 8100/ $\mu\text{l}$ , Median 5900/ $\mu\text{l}$ ). Für die prozentualen Berechnungen wurden die Werte der 2 Patienten mit einer CLL entfernt, da diese stark von den Werten der anderen Patienten abwichen.

Im Schnitt gehörten 25,2 % der Leukozyten bei den Patienten zur Untergruppe der Lymphozyten (Streubreite 2,3 % - 75,8 %). Die Gruppe der Lymphozyten setzte sich zahlenmäßig wie folgt zusammen (Median, Streubereich) (Abb. 3.1.1): T-Lymphozyten 71 % (19 % bis 95 %), davon 51,8 %  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten (21,6 % bis 88,9 %) und 48,5 %  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten (15,1 bis 80,8 %). Daraus ergab sich ein Verhältnis der  $\text{CD4}^+$ - zu den  $\text{CD8}^+$ -Zellen (CD4/CD8-Ratio) von im Median 0,95 (0,2 bis 3,7). 12 Patienten zeigten eine Ratio unter 0,9 (Normalwert 0,9-5,0, s. Tabelle 2.2.1). Der mediane Anteil der B-Lymphozyten an den Lymphozyten betrug 3 % (0 % bis 66 %) und der der NK-Zellen 16 % (2 % bis 63 %).

Bei den gesunden Probanden fanden sich unter den Leukozyten 31,2 % Lymphozyten (21,4 % bis 57,5 %). Unter den Lymphozyten bildeten auch hier die T-Lymphozyten die größte Untergruppe (69 %, 57 % - 76 %). 35,3 % (25,8 % bis 45,0 %) waren  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten, 64,8 % (54,1 % bis 70,4 %)  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten. Die CD4/CD8-Ratio betrug demnach im Median 1,84 (Streubreite 1,23 bis 2,72). Die B-Lymphozyten machten einen Anteil von 14 % (11 % bis 21 %) an den Lymphozyten aus, die NK-Zellen ebenfalls 14 % (5 % bis 24 %).



**Abb. 3.1.1:** Prozentuale Verteilung der Lymphozyten-Untergruppen im Blut von Patienten mit NHL (unter Ausschluss der 2 CLL-Patienten) und im Blut gesunder Probanden. Dargestellte Werte sind Mittelwerte + SD. \*zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Werten von gesunden Spendern und Patienten an.

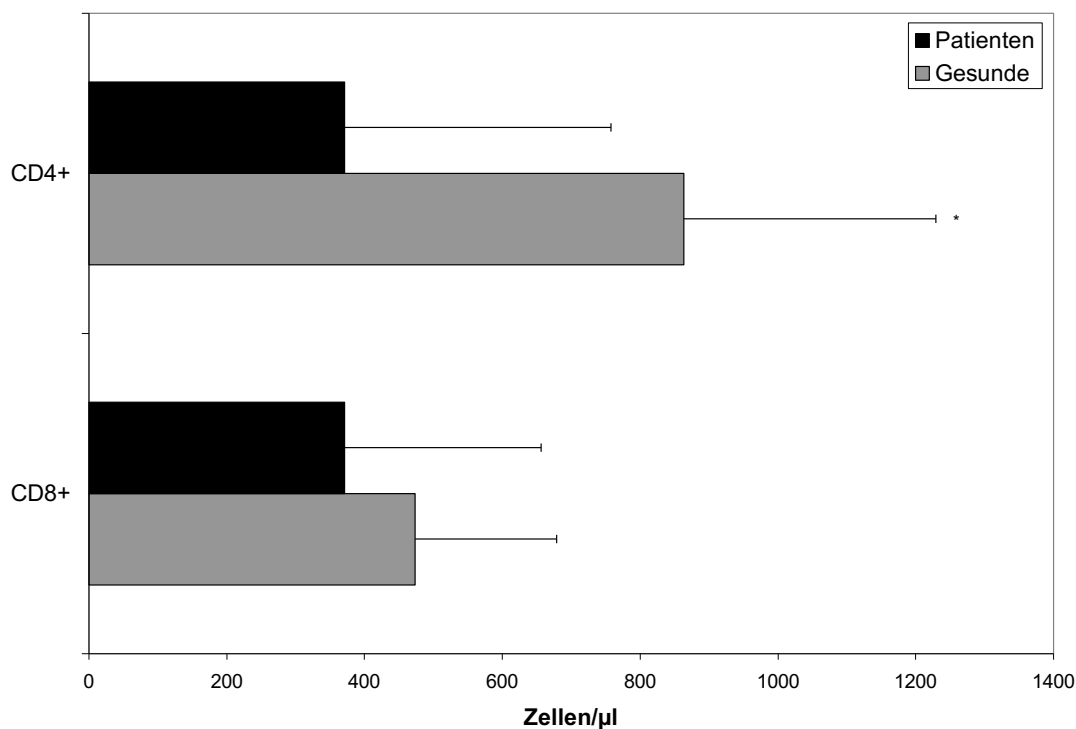
Bei den absoluten Zahlen zeigten 14/27 Patienten eine Lymphozytenzahl unterhalb des normalen Bereichs (für Normwerte s. Tabelle 2.2.1). 2 Patienten mit B-CLL lagen oberhalb der Norm. Die Zahl der T-Lymphozyten war bei 19 Patienten erniedrigt. 9 Patienten hatten eine verminderte Anzahl  $CD8^+$  T-Lymphozyten, während ein Patient oberhalb der Norm lag. Bei den  $CD4^+$  Zellen zeigten 20 Patienten unter den Normalbereich erniedrigte Werte. Hingegen hatten nur fünf Patienten zu wenig NK-Zellen. B-Zellen waren bei 18/27 Patienten vermindert und neben den 2 Patienten mit B-CLL bei einem weiteren Patienten vermehrt. Für genaue Angaben zur absoluten Zellzahl s. Tabelle 3.1.1.

Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen Patienten und Gesunden fanden sich in folgenden Bereichen: Patienten besaßen (nach Ausschluss der 2 CLL-Patienten) signifikant weniger Lymphozyten, wobei sowohl B- als auch T-Zellen signifikant vermindert waren. Innerhalb der T-Zell-Population waren die  $CD4^+$ -Lymphozyten signifikant vermindert. Damit war auch die CD4/CD8-Ratio signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollen ( $p = 0,004$ ) (Abb. 3.1.3).

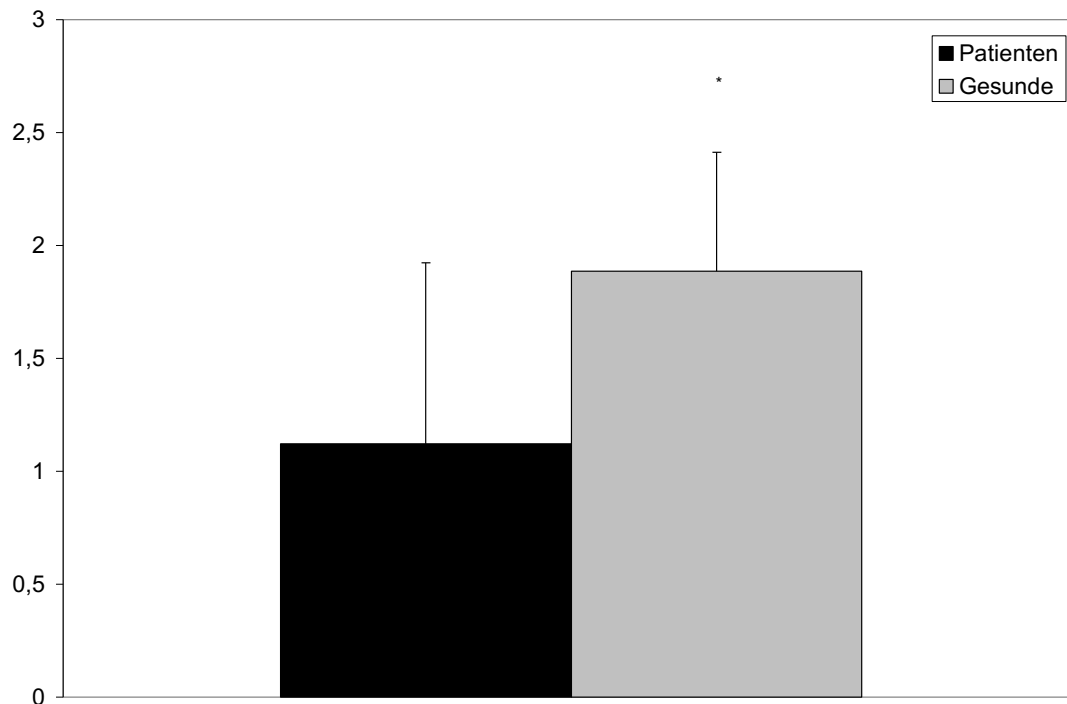


Zellgruppe	Patienten	Kontrollen
Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$6,4 \pm 7,0$ ( $4,8 \pm 3,9$ )	$5,9 \pm 1,2$
Lymphozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$2,6 \pm 5,7$ ( $1,0 \pm 0,5$ )	$2,0 \pm 0,69^{**}$
T-Lymphozyten	$772 \pm 642$ ( $631 \pm 407$ )	$1368 \pm 555^{**}$
CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	$371 \pm 284$ ( $336 \pm 265$ )	$473 \pm 206$
CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	$371 \pm 387$ ( $281 \pm 222$ )	$864 \pm 366^{**}$
NK-Zellen	$225 \pm 184$ ( $187 \pm 117$ )	$276 \pm 143$
B-Lymphozyten	$1349 \pm 4634$ ( $113 \pm 227$ )	$298 \pm 189^{**}$
CD4/CD8 Ratio	$1,1 \pm 0,8$ ( $1,1 \pm 0,8$ )	$1,8 \pm 1,9^{**}$

**Tabelle 3.1.1:** Absolute Zellzahlen im Blut von Patienten mit NHL und gesunden Kontrollen. In Klammern stehen die Werte der Patienten unter Ausschluss der Patienten mit CLL (n=2). Zahlen sind Mittelwerte  $\pm$  SD. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen Patienten und gesunden Kontrollen bei Einschluss aller Patienten. \*\* bezeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen Patienten und gesunden Kontrollen bei Ausschluss der Patienten mit CLL.



**Abb. 3.1.2:** Anzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit NHL (unter Ausschluss der 2 CLL-Patienten) und von gesunden Probanden. Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Werten von gesunden Spendern und Patienten an.



**Abb. 3.1.3:** CD4/CD8-Ratio: Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit NHL (unter Ausschluss der 2 CLL-Patienten). Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \*zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Werten von gesunden Probanden und Patienten an.

### 3.1.2 Unterschiede innerhalb der Patientengruppe

Die Patienten wurden in Gruppen unterteilt, um festzustellen, wie stark Faktoren wie Krankheitsstatus oder Vortherapie die Zellzahlen beeinflussen. Aufgrund stark abweichender Zellzahlen wurden die Werte der 2 Patienten mit B-CLL auch hier nicht mit einbezogen.

Zunächst wurden die Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf (bzw. stabilem Verlauf im Falle eines indolenten Lymphoms) den Patienten in partieller oder kompletter Remission gegenübergestellt (Tabelle 3.1.2). Hier zeigten sich folgende Muster: Die Zahl der Leukozyten insgesamt unterschied sich nicht signifikant (Median 3200/ $\mu\text{l}$ , Streubreite 1100 bis 21800/ $\mu\text{l}$  vs. 5000/ $\mu\text{l}$ , 3100-6300/ $\mu\text{l}$ ), allerdings hatten Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf signifikant weniger Lymphozyten (Median 680/ $\mu\text{l}$ , Streubreite 448 bis 1591/ $\mu\text{l}$  vs. 1369/ $\mu\text{l}$ , 769 bis 2186/ $\mu\text{l}$ ) ( $p=0,001$ ). Somit war der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten erniedrigt. Die prozentuale Zusammensetzung der Lymphozyten aus T-, B-, und NK-Zellen wich nicht signifikant voneinander ab. Die absolute Zahl der T-Lymphozyten war jedoch bei Patienten im Progress signifikant vermindert, ebenso wie die Zahl der  $\text{CD8}^+$  und der  $\text{CD4}^+$  Zellen (T-Lymphozyten: Median 349/ $\mu\text{l}$ , Streubreite 143 bis 1237/ $\mu\text{l}$  vs. 832,5/ $\mu\text{l}$ , 470 bis 1591/ $\mu\text{l}$ ) ( $p=0,001$ ),  $\text{CD8}^+$  Zellen: Median 154/ $\mu\text{l}$ ,

Streubreite 86 bis 710/ $\mu\text{l}$  vs. 377/ $\mu\text{l}$ , 178 bis 1225/ $\mu\text{l}$  ( $p=0.01$ ),  $\text{CD4}^+$  Zellen: Median 131/ $\mu\text{l}$ , 58 bis 576/ $\mu\text{l}$  vs. 376,5/ $\mu\text{l}$ , 115 bis 995/ $\mu\text{l}$  ( $p=0,01$ )). Der prozentuale Anteil der  $\text{CD8}^+$  und  $\text{CD4}^+$  Lymphozyten an den T-Lymphozyten war nicht signifikant verschieden, das gleiche galt somit für die  $\text{CD4}/\text{CD8}$ -Ratio.

Zellgruppe	Progress/stabiler Verlauf (n=15)	partielle/komplette Remission (n=10)
Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4,9 $\pm$ 5,1	4,7 $\pm$ 1,0
Lymphozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,8 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,4*
T-Lymphozyten	431 $\pm$ 277	930 $\pm$ 395*
$\text{CD8}^+$ Lymphozyten	234 $\pm$ 171	491 $\pm$ 312*
$\text{CD4}^+$ Lymphozyten	193 $\pm$ 157	414 $\pm$ 246*
NK-Zellen	175 $\pm$ 128	204 $\pm$ 103
B-Lymphozyten	98 $\pm$ 270	136 $\pm$ 151
$\text{CD4}/\text{CD8}$ Ratio	1,0 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,7

**Tabelle 3.1.2** Absolute Zellzahlen im Blut von Patienten mit progredienter/stabiler Erkrankung. Zahlen sind Mittelwerte  $\pm$  SD. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ) zwischen den Patientengruppen.

Für einen weiteren Vergleich wurden die Patienten in 2 Gruppen unterteilt, Unterscheidungskriterium war das Vorliegen eines indolenten oder eines aggressiven Lymphoms. Hier fanden sich im Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.1.3).

Zellgruppe	indolentes Lymphom (n=10)	aggressives Lymphom (n=15)
Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4,1 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 5,0
Lymphozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,0 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,5
T-Lymphozyten	554 $\pm$ 321	682 $\pm$ 459
$\text{CD8}^+$ Lymphozyten	303 $\pm$ 193	359 $\pm$ 308
$\text{CD4}^+$ Lymphozyten	234 $\pm$ 144	313 $\pm$ 262
NK-Zellen	189 $\pm$ 133	185 $\pm$ 111
B-Lymphozyten	179 $\pm$ 326	69 $\pm$ 123
$\text{CD4}/\text{CD8}$ Ratio	1,0 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 1,0

**Tabelle 3.1.3** Absolute Zellzahlen im Blut von Patienten mit indolentem und aggressivem NHL. Zahlen sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Stellte man nun die Patienten, die innerhalb der letzten 12 Monate eine Chemotherapie erhalten hatten, solchen gegenüber, deren Therapie länger zurücklag, so zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Bereich der Zellzahlen (Tabelle 3.1.3). Allerdings war der

absolute und der prozentuale Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten in der Chemotherapiegruppe tendentiell höher (Median 23 %, Streubreite 2 bis 63 % bei Patienten nach Chemotherapie vs. 14 %, 4 bis 31 % ( $p=0,067$ )).

Zellgruppe	Chemotherapie innerhalb der letzten 12 Monate (n=14)	keine Chemotherapie inn. 12 Monate (n=11)
Leukozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$5,4 \pm 5,1$	$4,2 \pm 1,5$
Lymphozyten ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$0,9 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,5$
T-Lymphozyten	$534 \pm 396$	$754 \pm 404$
CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	$294 \pm 317$	$390 \pm 178$
CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	$231 \pm 169$	$345 \pm 270$
NK-Zellen	$209 \pm 130$	$158 \pm 97$
B-Lymphozyten	$104 \pm 278$	$125 \pm 148$
CD4/CD8 Ratio	$1,1 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,7$

**Tabelle 3.1.3** Absolute Zellzahlen im Blut von Patienten mit NHL, die innerhalb der letzten 12 Monate eine Chemotherapie bekommen hatten und solchen Patienten, die keine Therapie erhalten hatten bzw. bei denen diese >12 Monate zurücklag. Zahlen sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

### 3.2 Spontane Effektorzellaktivität

Neben der Anzahl an Immuneffektorzellen wurde ihre Funktionsfähigkeit überprüft. Dazu wurde zunächst nach Inkubation in einem Interleukin 2- haltigen Medium per FACS-Analyse bestimmt, welcher Anteil der T- und NK-Zellen spontan zytotoxische Granula freigesetzt hatte (Abb. 3.3.1). Dabei stellte sich heraus, dass  $8,9 \pm 6,2$  % der NK-Zellen von Patienten spontan degranuliert waren. Bei den Zellen gesunder Probanden war der Anteil aktivierter Zellen mit  $13,5 \pm 13,7$  % nicht signifikant größer ( $p=0,11$ ). In der T-Zell-Population fanden sich hingegen bei den Patienten  $3,2 \pm 3,0$  % aktivierte Zellen, während bei den gesunden Probanden nur  $0,6 \pm 0,3$  % der Zellen degranuliert waren. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p=0,0009$ ).

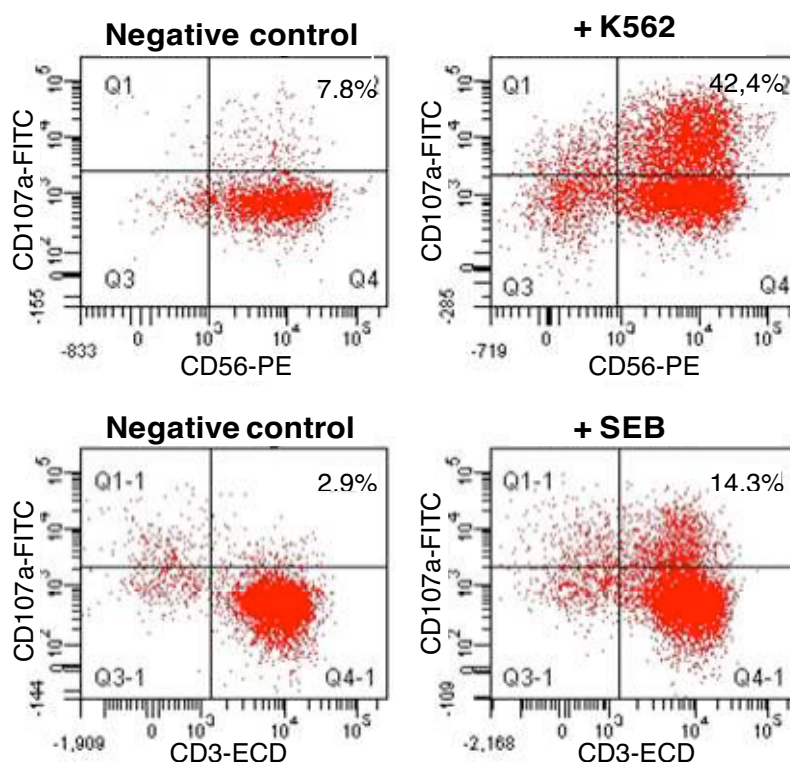
Von den Ergebnissen der weiteren Messungen wurden bei jedem Probanden die Werte der spontanen Effektorzellaktivität abgezogen, um die Differenz zwischen spontaner Aktivität und gesteigerter Aktivität als Reaktion auf einen Stimulus zu verdeutlichen.

### 3.3 Reaktion auf aktivierende Stimuli

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich NK- und T-Zellen bei Zugabe von Substanzen verhielten, die eine zytotoxische Reaktion hervorrufen.

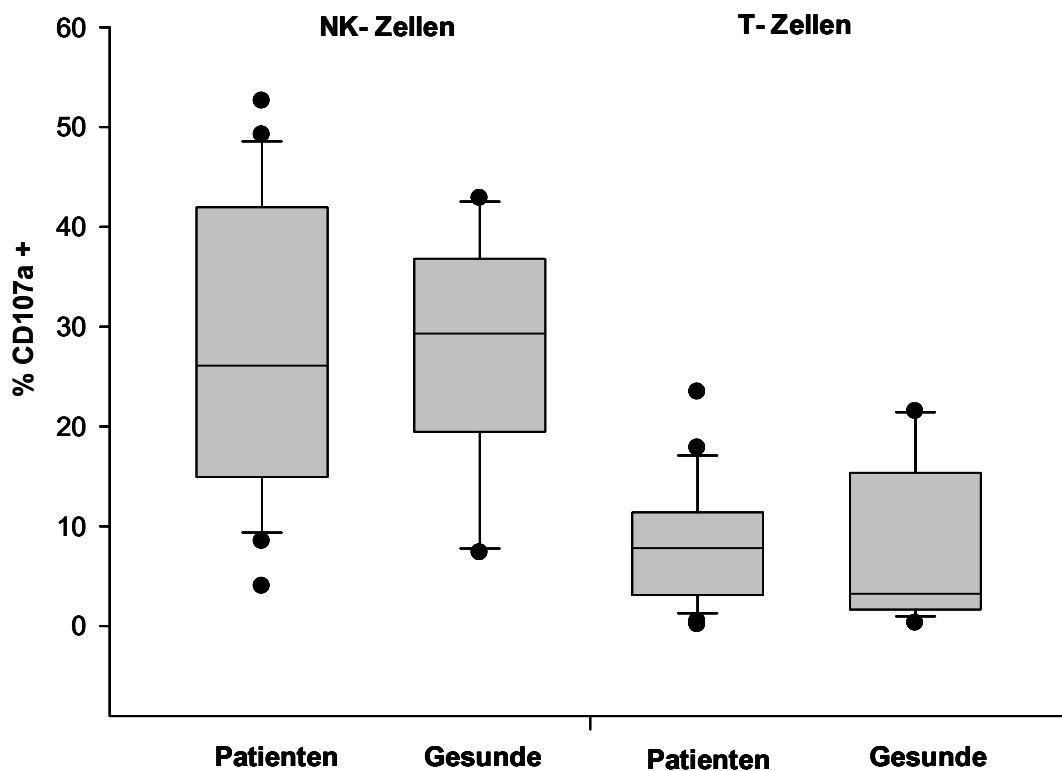
K562-Zellen sind humane Leukämiezellen, die keine MHC-I-Moleküle exprimieren und daher einen starken Reiz für NK-Zellen darstellen, zu degranulieren und zytotoxische Mediatoren freizusetzen. Wurden die NK-Zellen von Patienten mit K562-Zellen inkubiert, so konnte eine starke Aktivität beobachtet werden:  $27,4 \pm 11,6$  % der Zellen degranulierten. NK-Zellen von gesunden Probanden zeigten eine vergleichbare Reaktion ( $28,5 \pm 14,6$  %) (Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2).

Um eine T-Zell-Reaktion hervorzurufen, wurde das Superantigen SEB (staphylococcal enterotoxin B) eingesetzt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Effektorzellaktivität zwischen Patienten und Gesunden:  $8,1 \pm 5,7$  % der T-Zellen von Patienten reagierten mit einer Degranulation, während  $5,4 \pm 6,2$  % der T-Zellen der gesunden Spender auf den Antigen-Reiz ansprachen (Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2).



**Abb. 3.3.1:** Ermittlung der aktivierten Zellpopulationen im Blut eines Patienten mittels FACS-Analyse. Links oben: NK-Zellen, die über Nacht mit IL-2 inkubiert wurden, aber keinem weiteren stimulierenden Antigen ausgesetzt waren. Degranulierte Zellen ( $CD56^+ CD107^+$ ) finden sich im

rechten oberen Kasten. Rechts oben: NK-Zellen nach Zugabe von K562-Zellen. Links unten: T-Zellen nach nächtlicher Inkubation mit IL-2, ohne weiteres aktivierendes Antigen. Degranulierte Zellen ( $CD3^+ CD107^+$ ) finden sich im rechten oberen Kasten. Rechts unten: T-Zellen nach Zugabe des Superantigens SEB.



**Abb. 3.3.2:** Links: Vergleich der NK-Zell-Reaktion auf K562-Zellen. Aktivierte Zellen wurden mittels FACS-Analyse als  $CD56^+ CD107a^+$  Zellpopulation ermittelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zahl der aktivierten NK-Zellen zwischen Patienten und gesunden Probanden. Rechts: Vergleich der T-Zell-Reaktion auf das Superantigen SEB. Aktivierte Zellen wurden mittels FACS-Analyse als  $CD3^+ CD107a^+$  Zellpopulation ermittelt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zahl der aktivierten T-Zellen zwischen Patienten und gesunden Probanden. Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt. Obere und untere Begrenzung der Box zeigen 75 %- und 25 %-Perzentile, der Median ist durch die Mittellinie dargestellt. Die senkrechten Balken kennzeichnen größten und kleinsten Wert, Ausreißer werden gesondert als schwarze Punkte dargestellt.

### 3.4 Zellaktivität in Gegenwart von Lymphomzellen

T- und NK-Zellen wurden nun der CD19<sup>+</sup> humanen Lymphomzellreihe Raji ausgesetzt. Erneut wurde gemessen, wie viele der Effektorzellen mit der Freisetzung zytotoxischer Granula reagierten (Abb. 3.5.1).

10,7 ± 9,5 % der NK-Zellen von Patienten wurden durch die Konfrontation mit den Lymphomzellen aktiviert, bei den gesunden Probanden waren es 7,1 ± 6,6 %. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war nicht signifikant. Die Aktivität der NK-Zellen von Patienten in Gegenwart der Lymphomzellen war jedoch deutlich höher als die spontane NK-Zellaktivität in dieser Gruppe, dieser Unterschied war statistisch signifikant (p=0,0025).

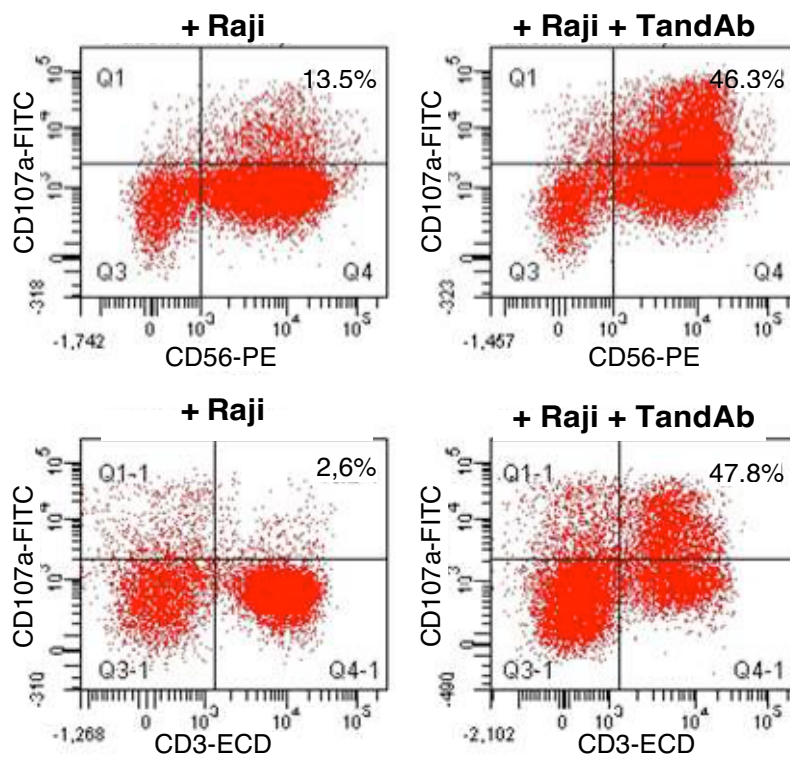
Im Gegensatz zu der deutlichen NK-Zell-Reaktion zeigten die T-Zellen der meisten Probanden nur eine geringe Aktivierung in Gegenwart der Lymphomzellen. T-Zellen der Patienten degranulierten im Schnitt zu 3,1 ± 8,4 %. Dabei ist zu beachten, dass die Werte stark durch zwei Patienten beeinflusst wurden, die eine ausgeprägte T-Zell-Reaktion zeigten (33 % und 32,2 %). Nach manueller Entfernung dieser zwei Ausreißer ergab sich ein Wert von 0,9 ± 2,5 % für die restliche Population. T-Zellen der gesunden Spender ließen sich durch Lymphomzellen kaum aktivieren (0,1 ± 0,2 %). Auch bei den T-Zellen ließ sich kein Unterschied zwischen Patienten und Gesunden ermitteln. Die Aktivität der T-Zellen in beiden Gruppen unterschied sich nicht wesentlich von der spontanen T-Zellaktivität.

### 3.5 Zytotoxizität gegen Lymphomzellen in Gegenwart des bispezifischen Antikörpers

Nachdem der Zusatz der Lymphomzellen keinen oder nur einen mäßigen Aktivierungsreiz dargestellt hatte, wurde nun die Inkubation mit den Targetzellen und dem bispezifischen Antikörper (CD19XCD16 TandAb sowie CD19XCD3 TandAb von Affimed) vorgenommen und die resultierende zytotoxische Reaktion ermittelt (Abb. 3.5.1).

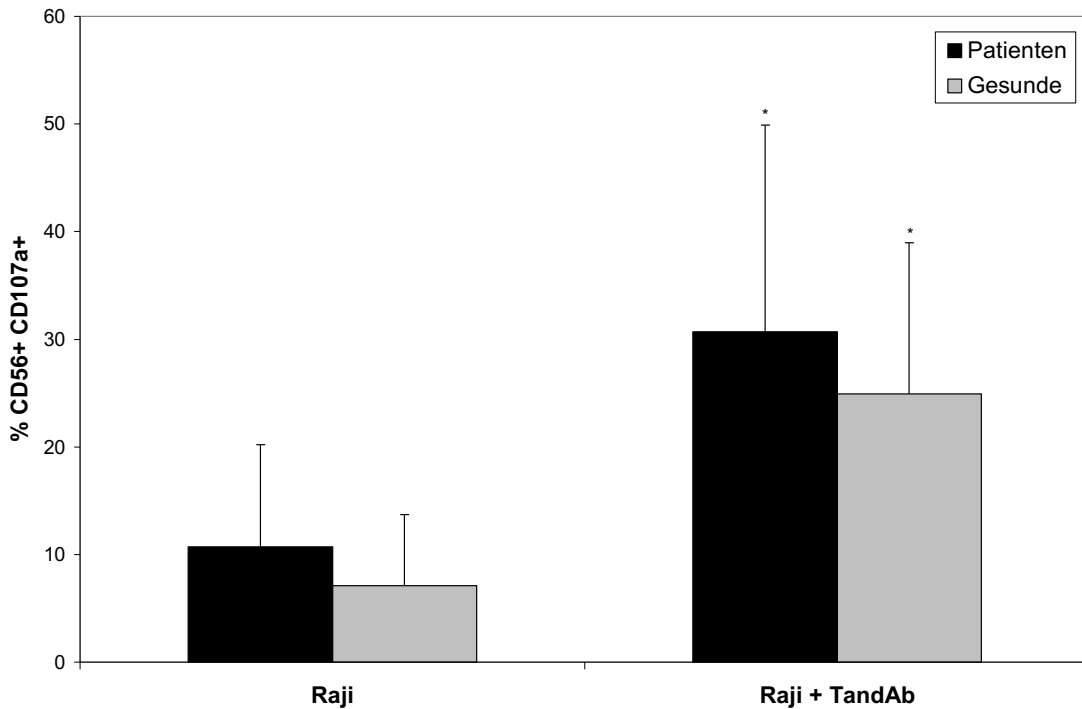
Während der Anteil degranulierter NK-Zellen in der Patientengruppe bei Zugabe von Lymphomzellen allein im Mittel nur bei 10,7 % gelegen hatte, führte die Addition des Antikörpers zu einer aktivierten Zellpopulation von 30,7 ± 19,2 % (Abb. 3.5.2). Gesunde Kontrollen zeigten nach Zugabe des Antikörpers einen ähnlich hohen Prozentsatz degranulierter Zellen (24,9 ± 14,1 %), während Lymphomzellen allein nur eine Aktivierung von im Mittel 7,1 % der Zellen hervorgerufen hatten.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den T-Zellen: Während die Lymphomzellen allein in der Patientenpopulation nur 3,1 % der Zellen aktivieren konnten, wurden nach Zugabe des Antikörpers  $21,3 \pm 14,3$  % zytotoxisch aktiv (Abb. 3.5.3). Auch T-Zellen gesunder Probanden, die vorher nur zu einem Anteil von 0,1% aktiv gewesen waren, zeigten nun eine deutliche Reaktion mit  $22,0 \pm 17,4$  % degranulierten Zellen. Damit waren auch hier die Werte von Gesunden und Patienten vergleichbar.

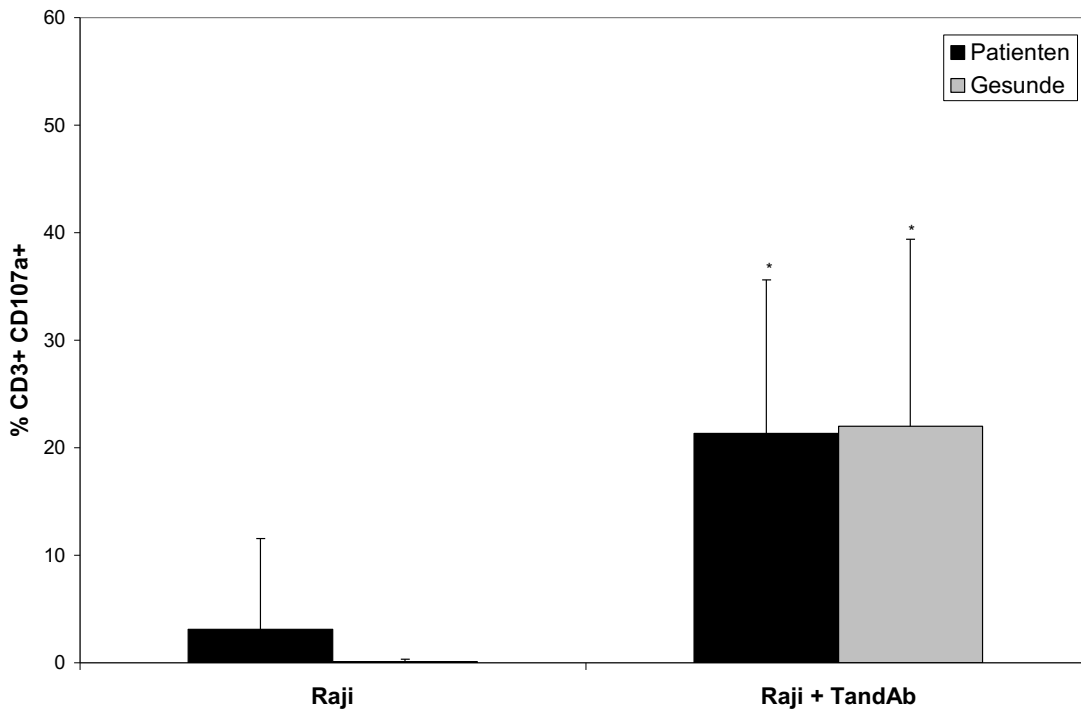


**Abb. 3.5.1:** Ermittlung der aktivierten Zellpopulationen im Blut eines Patienten mittels FACS-Analyse: Links oben: NK-Zellen nach Inkubation mit der Lymphom-Zellreihe Raji. Degranulierte Zellen ( $CD56^+CD107a^+$  Zellen) finden sich im rechten oberen Kasten. Rechts oben: NK-Zellen, die sowohl mit Lymphomzellen als auch dem CD19XCD16 TandAb inkubiert wurden. Links unten: T-Zellen nach Konfrontation mit Raji-Lymphomzellen. Aktivierte Zellen ( $CD3^+CD107^+$ ) finden sich im rechten oberen Kasten. Rechts unten: T-Zellen, die sowohl mit Lymphomzellen als auch mit dem CD19XCD3 TandAb inkubiert wurden.





**Abb. 3.5.2:** Darstellung der Prozentzahl aktivierter NK-Zellen als Reaktion auf Lymphomzellen bzw. Lymphomzellen kombiniert mit dem bispezifischen Antikörper CD19XCD16 TandAb. Aktivierte Zellen wurden per FACS-Analyse bestimmt als CD56<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> Zellpopulation. Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Reaktion gegenüber Lymphomzellen und der Reaktion gegen Lymphomzellen und TandAb an.

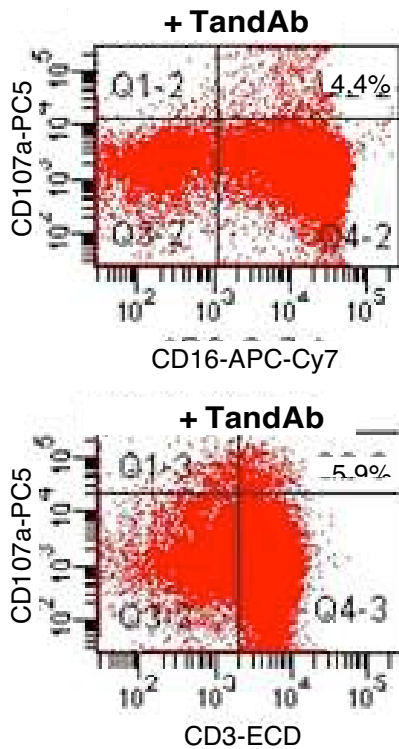


**Abb. 3.5.3:** Darstellung der Prozentzahl aktivierter T-Zellen als Reaktion auf Lymphomzellen bzw. Lymphomzellen kombiniert mit dem bispezifischen Antikörper CD19XCD3 TandAb. Aktivierte Zellen wurden per FACS-Analyse bestimmt als  $CD3^+ CD107a^+$  Zellpopulation. Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Reaktion gegenüber Lymphomzellen und der Reaktion gegen Lymphomzellen und TandAb an.

### 3.6 Reaktion der Effektorzellen bei Inkubation mit dem bispezifischen Antikörper ohne Zugabe der Zielzellen

Als nächstes galt es herauszustellen, ob die starke Aktivierung der Immunzellen in Gegenwart der Lymphomzellen und des bispezifischen Antikörpers nur auf die Bindung des entsprechenden Antikörperarms an den aktivierenden Rezeptor der Effektorzelle zurückzuführen ist oder ob eine Aktivierung der Zelle erst dann stattfinden kann, wenn beide Arme des Antikörpers ihr Zielantigen gebunden haben. Daher wurden die Effektorzellen von neun gesunden Kontrollen mit dem entsprechenden Antikörper ohne Zugabe von CD19-positiven Zielzellen inkubiert. NK-Zellen zeigten eine geringe Aktivierung, nur  $0,7 \pm 0,9$  % degranulierten und damit nicht signifikant mehr als in der Negativkontrolle (Abb. 3.6.1, 3.6.2). In der T-Zell-Population war der Anteil aktivierter Zellen hingegen mit  $7,6 \pm 3,4$  %

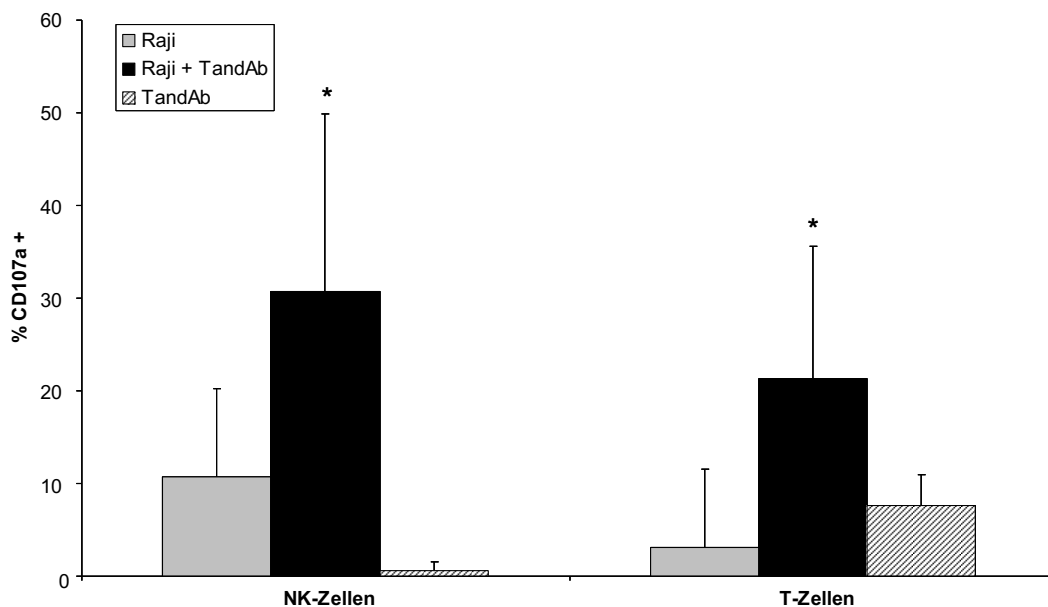
höher und damit signifikant unterschieden von der spontanen T-Zell-Aktivität ( $p=1,4^{-6}$ ) (Abb. 3.6.1, 3.6.2).



**Abb. 3.6.1:** Ermittlung der aktivierten Zellpopulationen im Blut gesunder Probanden nach Zugabe des entsprechenden TandAb Antikörpers.

Oben: Reaktion von NK-Zellen nach Inkubation mit CD19XCD16 TandAb, ohne Zugabe CD19<sup>+</sup> Zielzellen. Degranulierte Zellen (CD16<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>) finden sich im rechten oberen Kasten.

Unten: Reaktion von T-Zellen nach Inkubation mit CD19XCD3 TandAb, ohne Zugabe CD19<sup>+</sup> Zielzellen. Degranulierte Zellen (CD3<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>) finden sich im rechten oberen Kasten.



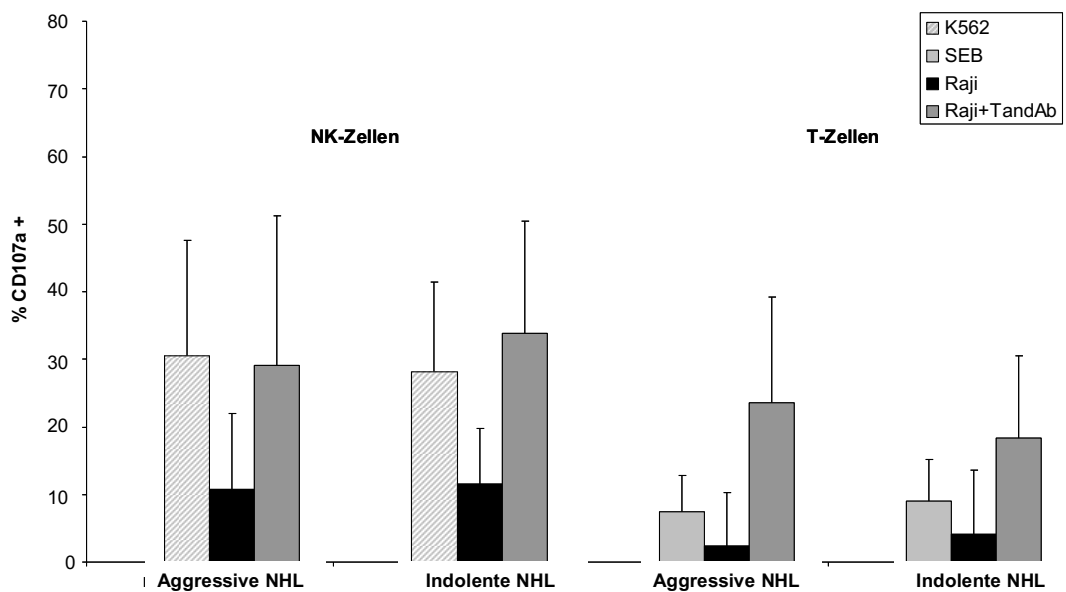
**Abb. 3.6.1 links:** Vergleich der NK-Zell-Reaktion von Patienten auf CD19<sup>+</sup>Raji Lymphomzellen sowie auf den CD19XCD16 TandAb, zunächst in Gegenwart der Lymphomzellen, dann ohne Zugabe von Zielzellen. Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ) zu den anderen beiden Gruppen an.

Rechts: Vergleich der T-Zell-Reaktion von Patienten auf CD19<sup>+</sup>Raji Lymphomzellen sowie auf den CD19XCD3 TandAb, zunächst in Gegenwart der CD19<sup>+</sup> Lymphomzellen Raji, dann ohne Zugabe von Zielzellen. Darstellung als Mittelwerte + Standardabweichung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zu den anderen beiden Gruppen an.

### 3.7 Faktoren, die die zytotoxische Funktion der Effektorzellen beeinflussen

Da die Zahl der NHL-Erkrankungen mit dem Alter zunimmt, hatten die untersuchten Patienten ein medianes Alter von 64 Jahren. Daher wurden bei den gesunden Kontrollen zwei Altersgruppen untersucht, um einen Einfluss des Alters auf die ermittelten Ergebnisse ausschließen zu können. Zwischen den beiden Gruppen mit einem medianen Alter von 26 Jahren (23 bis 34 Jahre) und 53 Jahren (50 bis 54 Jahre) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit der Effektorzellen zur zytotoxischen Reaktion. Auch ein Einfluss des Geschlechts konnte ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Funktionsfähigkeit der Effektorzellen davon beeinflusst wird, welche Therapie die Patienten in der Vergangenheit durchlaufen haben. Die Patienten wurden zu diesem Zweck in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe hatte weniger als den Median von 6,5 Therapiezyklen erhalten, die andere mehr. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Therapiezyklen keinen Einfluss auf die zytotoxischen Fähigkeiten der T- und NK-Zellen hat. Anschließend wurde verglichen, ob die Art der Therapie, im Sinne eines Hochdosis- oder eines konventionellen Schemas die Zellfunktion beeinflusste. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Ebenso spielte es keine Rolle, ob die Patienten eine Blutstammzelltransplantation hinter sich hatten oder nicht. Schließlich wurde untersucht, ob sich aus dem NHL-Subtyp eine Vorhersage über die Zellfunktion machen ließ. Dazu wurden zum einen die Patienten mit Multiplem Myelom (n=11) allen anderen Patienten gegenübergestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der erreichbaren Zytotoxizität. Anschließend wurden alle Patienten, die an einem aggressiven Lymphom erkrankt waren, mit denjenigen verglichen, die ein indolentes NHL hatten. Auch hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede (Abb. 3.7.1).



**Abb. 3.7.1:** Vergleich der zytotoxischen Reaktionen von NK- und T-Zellen auf unterschiedliche Stimuli, aufgeteilt nach Art des NHL des Spenders. Proben von Patienten mit indolenten und aggressiven NHL wurden verglichen, es konnten keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der zytotoxischen Antwort festgestellt werden. Dargestellte Werte sind Mittelwerte + Standardabweichung.

### 3.8 Korrelation zwischen T- und NK-Zell-Funktion

Mittels statistischer Untersuchungen wurde ermittelt, ob T- und NK-Zell-Funktion miteinander korrelierten. Innerhalb der Patientengruppe fanden sich keine Zusammenhänge zwischen der Aktivität der Effektorzellen (Lineare Regression,  $R^2=0,03$ ;  $p=0,14$ ). Überraschenderweise korrelierten jedoch innerhalb der gesunden Kontrollen T- und NK-Zell-Funktion stark miteinander (Lineare Regression,  $R^2=0,23$ ;  $p<0,01$ ).

## **4.Diskussion**

Die Therapie maligner Erkrankungen mit Hilfe bispezifischer Antikörper (BsAb) ist ein relativ neues und vielversprechendes Gebiet der onkologischen Forschung. Konventionelle Therapiemodalitäten wie die Radiotherapie oder die Chemotherapie bewirken über die Schädigung der Erbsubstanz die Apoptose sowohl gesunder als auch kranker, schnell teilender Zellen. Bispezifische Antikörper jedoch greifen in das Immunsystem ein und ermöglichen es diesem, maligne Zellen gezielt zu erkennen und zu beseitigen. Die meisten existierenden Antikörperformate vermitteln ihre Wirkung über die Aktivierung von NK- oder T-Zellen. Voraussetzung für die Effektivität einer solchen Therapie ist somit, dass diese Immunzellen in ausreichender Anzahl vorhanden sowie funktionsfähig und durch die Antikörper aktivierbar sind. Tumorpatienten leiden jedoch nachweislich unter einem Defekt des Immunsystems [74]. Auch bei Lymphompatienten ist eine Beeinträchtigung der Immunfunktion nachgewiesen worden [75, 76]. Hinzu kommt der Einfluss der zytotoxischen Tumortherapie, die alle rasch teilenden Gewebe des Körpers angreift und damit auch zu einer Leukozytopenie und einer mitunter lang anhaltenden Immunsuppression führt [77]. Ziel der vorliegenden Studie war es, zu evaluieren, inwiefern das Immunsystem von Patienten mit NHL für eine auf immunologische Abwehr ausgerichtete Therapie, speziell die Therapie mit bispezifischen Antikörpern, geeignet ist.

### **4.1 Zellzahl und Zelluntergruppen**

Die Zahl der Leukozyten ist ein wichtiger Parameter für die Kompetenz des Immunsystems und möglicherweise kritisch für die Anwendbarkeit der BsAb bei Tumorpatienten. Dabei ist die Anzahl der Lymphozyten, zu denen T- und NK-Zellen zählen, von besonderer Bedeutung für den Einsatz aktueller Antikörperformate. Bisherige Studien beschreiben deutliche Pathologien der Lymphozyten bei NHL-Patienten. Anderson et al. und Jones et al. untersuchten Patienten, die noch keine Therapie erhalten hatten, und stellten je nach histologischem Subtyp bei 11 bis 42 % der Patienten eine Lymphozytopenie (in der Studie definiert als Lymphozytenzahl  $<1000/\mu\text{l}$ ) fest [76]. Ähnliche Werte wurden in der vorliegenden Studie ermittelt: In der untersuchten Patientengruppe hatten (nach Ausschluss der Patienten mit einer chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL)) 72 % der Patienten Lymphozytenzahlen  $<1500/\mu\text{l}$  und 52 % Werte  $<1000/\mu\text{l}$ . Die prognostische Bedeutung einer

derartig erniedrigten Lymphozytenzahl ist durch Studien herausgearbeitet worden. So ist eine Lymphozytopenie bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen schon länger als unabhängiger prognostischer Faktor anerkannt [78]. Ähnliche Ergebnisse wurden nun auch für Patienten mit soliden Tumoren und für Patienten mit NHL erhoben [79]. Cox et al. identifizierten die absolute Lymphozytenzahl sogar als unabhängigen prognostischen Faktor bei Patienten mit diffus-großzelligem B-Zell-NHL und schlugen unter Einbeziehung dieses Parameters einen angepassten prognostischen Index vor, der die Prognose der Patienten sehr viel besser traf als der etablierte Prognosescore (IPI) [80]. Auch für Patienten mit follikulärem Lymphom und Multiplem Myelom scheint die Lymphozytenzahl prognostischen Wert zu haben [81, 82]. Diese Ergebnisse decken sich mit der Erkenntnis der vorliegenden Studie, dass das Ausmaß der Lymphopenie mit dem Krankheitsstatus korreliert: Patienten mit Progress oder stabilem Krankheitsverlauf hatten signifikant weniger Lymphozyten als Patienten in partieller oder kompletter Remission. Krankheitsubtyp und Vortherapie hatten hingegen keinen Einfluss auf die Lymphozytenzahl

Bei Unterteilung der Lymphozyten in ihre Untergruppen- T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen- fiel auf, dass die Lymphopenie der untersuchten Patienten mit einer signifikant verminderten Anzahl von T-Lymphozyten sowie von B-Lymphozyten einherging, während die Zahl der NK-Zellen sich nicht signifikant von denen gesunder Probanden unterschied.

Die auffälligsten Werte in der vorliegenden Studie fanden sich bei den T-Lymphozyten. 70 % der untersuchten Patienten wiesen in diesem Kompartiment Zellzahlen unterhalb der Norm auf und unterschieden sich damit signifikant von den Kontrollen. Analog zur Gesamtzahl der Lymphozyten fanden sich auch hier bei Patienten mit progredienter Erkrankung signifikant weniger Zellen als bei solchen in Remission. Anderson et al. fanden bei Patienten mit einem aggressiven Lymphom ebenfalls signifikant niedrigere T-Lymphozytenzahlen im Vergleich zu gesunden Kontrollen [76]. Patienten mit follikulärem Lymphom wiesen in der zitierten Studie vor Therapiebeginn hingegen normale Zellzahlen auf. Ein solcher Zusammenhang mit dem histologischen Subtyp konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Die Gesamtzahl der T-Lymphozyten setzt sich wiederum aus zwei Untergruppen zusammen, den  $CD4^+$  und den  $CD8^+$  T-Zellen. Auch hier zeigten sich deutliche Auffälligkeiten. 33 % der Patienten hatten eine verminderte Anzahl von  $CD8^+$  Lymphozyten,

es fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zu gesunden Kontrollen. Die CD8<sup>+</sup> Zellen machten bei den Patienten zudem mit über 50 % den größeren Teil der T-Lymphozyten aus.

CD4<sup>+</sup> Zellen hingegen waren bei den Patienten signifikant vermindert und scheinen somit verantwortlich zu sein für die verminderte Zahl an T-Lymphozyten insgesamt: 74 % der Patienten zeigten Werte unterhalb der Norm. Ihr prozentualer Anteil an den T-Lymphozyten war ebenfalls signifikant vermindert, während sie bei gesunden Spendern mit über 60 % die größere T-Zell-Untergruppe bildeten. Daraus ergab sich ein bei Patienten ebenfalls signifikant vermindertes CD4/CD8-Verhältnis (CD4/CD8-Ratio) von im Mittel 1,1 (Gesunde:1,9). 44 % der Patienten zeigten eine Ratio unterhalb der Norm. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer anderen Studie mit 55 NHL-Patienten, welche ebenfalls von einer verminderten Anzahl an T-Zellen berichtet. Auch hier war die Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen erniedrigt, während die CD8<sup>+</sup> Zellzahl im normalem Bereich lag [83]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit 44 Patienten mit B-Zell NHL berichtet analog zu der vorliegenden Studie von einer bei Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung verminderten Anzahl an CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen sowie einer dadurch verminderten CD4/CD8-Ratio [84].

Mit fortschreitender Erkrankung kam es nach den vorliegenden Ergebnissen zu einer signifikanten Verminderung sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4/CD8-Ratio blieb dabei konstant, da beide Zellkompartimente in gleichem Ausmaß betroffen waren. Der histologische Lymphom-Subtyp hatte keinen Einfluss auf das Verhältnis der CD4/CD8 Zellen. Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von Janowska-Wieczorek et al. [83]. Eine andere Studie untersucht ebenfalls die Bedeutung der T-Zell-Untergruppen bei Patienten mit NHL [84]. Die Studie zeigt einen klaren Zusammenhang zwischen der Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen und dem prognostischen Index. Je mehr Punkte im IPI die Patienten hatten, d.h. je schlechter ihre Prognose war, desto weniger CD4<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut besaßen sie. Analog zu der vorliegenden Studie war auch hier das Krankheitsstadium der einzige Faktor, der auf die Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen einen Einfluss hatte. Dieselbe Studie zeigt einen klaren Zusammenhang auf zwischen der Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und dem Therapieansprechen sowie dem Gesamtüberleben.

Eine innerhalb der letzten 12 Monate verabreichte Chemotherapie beeinflusste das Verhältnis der Zelluntergruppen zueinander nach den vorliegenden Ergebnissen nicht. Eine andere Studie, die sich mit dem Einfluss der Chemotherapie auf die Immunstaten von Patienten beschäftigt, berichtet im Gegensatz dazu von einem starken Einfluss der Therapie auf die Zahl der T-Lymphozyten [89], mit einer Abnahme sowohl der CD8<sup>+</sup> als auch der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten; jedoch war der Effekt bei den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ausgeprägter.



Dadurch veränderte sich auch das CD4/CD8- Verhältnis, das vor Therapiebeginn bei 1,56 und im Anschluss daran nur noch bei 0,66 lag.

Auch im Bereich der B-Lymphozyten zeigten die meisten Patienten pathologische Werte: 67 % der Patienten hatten B-Zellzahlen unterhalb der Norm und zwar unabhängig von Krankheitsstatus oder Vortherapie. Im Gegensatz dazu berichteten Herrmann et al. von erhöhten B-Lymphozyten-Zahlen im Blut aleukämischer Patienten mit NHL zu Diagnosebeginn [90]. Diese Untersuchung fand jedoch bei untherapierten Patienten statt, während eine Vielzahl der Patienten in der vorliegenden Studie gemäß dem heutigen Standard mit Rituximab therapiert worden war- dieser Antikörper führt zu einem raschen Verlust auch der peripheren B-Lymphozyten. Eine Regeneration der Zellpopulation beginnt in der Regel erst nach 6 Monaten [91]. Die ist eine mögliche Erklärung für die in der untersuchten Patientengruppe vorliegende B-Lymphopenie.

Im Gegensatz zu den T- und B-Lymphozyten zeigten sich die NK-Zellen als relativ resistente Zellpopulation. Nur 19 % der untersuchten Patienten zeigten NK-Zellzahlen unterhalb der Norm, 1 Patient mit B-CLL hatte sogar erhöhte Zellwerte. Die NK-Zellzahl war auch nicht abhängig von Histologie, Krankheitsstatus oder Vortherapie- Patienten unter Chemotherapie zeigten sogar tendentiell höhere NK-Zellwerte. Analog dazu berichteten Mackall et al., dass die NK-Zellen als einzige Lymphozyten-Subpopulation keine signifikante Abnahme unter intensiver zytotoxischer Therapie zeigen [89]. Die Zahl der NK-Zellen scheint allerdings durchaus wichtig für die Krankheitsprognose zu sein. So berichten Plonquet et al., dass bei Vergleich der Lymphozytenuntergruppen die NK-Zellzahl als einzige mit dem Krankheitsverlauf der Patienten korreliert [92]. Ein solcher Zusammenhang mit dem Krankheitsstatus konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Patienten mit NHL Abnormalitäten in mehreren Zellkompartimenten aufweisen. Die deutlichsten Unterschiede fanden sich bei den für die Therapie mit BsAb notwendigen T-Lymphozyten. Diese zeigten in der vorliegenden Patientengruppe Zellzahlverminderungen, die mit fortschreitender Erkrankung stärker ausgeprägt waren. Eine prognostische Relevanz der T-Lymphozytenzahl, insbesondere der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für den Verlauf der Erkrankung (wie bereits für die Gesamt-Lymphozytenzahl nachgewiesen), ist sehr wahrscheinlich und kürzlich durch eine Studie bestätigt worden [84]. Auch bei der Untersuchung von Tumorgewebe konnte gezeigt

werden, dass niedrige T-Zellzahlen sowohl im CD4- als auch im CD8-Kompartiment eine schlechtere Prognose bedeuten [93-95]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass ähnliches für Zellen im peripheren Blut gilt.

Inwieweit der Mangel an T-Lymphozyten die Therapie mit CD3-abhängigen BsAb negativ beeinflusst, ist noch nicht abzusehen. Dehghanie et al. konnten zeigen, dass ein Mangel an CD4<sup>+</sup> Zellen auch mit einem schlechteren Therapieansprechen auf Chemotherapie verbunden ist [84]. Ob gleiches für die Therapie mit BsAb gilt, wird sich in klinischen Studien zeigen müssen. Es ist jedoch wichtig, BsAb zu entwickeln, die auch bei einem niedrigen Effektor:Target-Verhältnis ihre Wirkung entfalten können. [96, 97]. Das in der vorliegenden Studie festgestellte, veränderte Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen dürfte keinen negativen Einfluss auf die Antikörper-Therapie haben, da beide Zellpopulationen in gleichem Maße durch BsAb aktiviert werden [98].

Auch für die Klasse der NK-Zell-aktivierenden BsAb ist die Anzahl an Effektorzellen wichtig. Zwar zeigten sich die NK-Zellen in der vorliegenden Studie als relativ robuste Zellpopulation, jedoch ist ihre Zahl ohnehin deutlich geringer als die der T-Lymphozyten. Einige der Patienten hatten weniger als 60 NK-Zellen/ $\mu$ l Blut. Plonquet et al. berichteten ebenfalls von NHL-Patienten mit stark erniedrigten NK-Zellzahlen [92]. Ein Vorteil jedoch ist die Resistenz der NK-Zell-Population gegenüber konventionellen Therapieschemata: Als einzige Zellpopulation zeigen sie keine Beeinträchtigung nach einer Chemotherapie [89], in der vorliegenden Studie waren in der Chemotherapie-Gruppe sogar tendenziell höhere Zellzahlen zu verzeichnen. Guven et al. verglichen die NK-Zell-Expansion einer Patientin vor und nach Chemotherapie mit Fludarabin und stellten ebenfalls eine bessere Expansion im Anschluss an die Therapie fest [99]. Auch nach einer Stammzelltransplantation erholen sich die Killerzellen relativ schnell und als erste Zellpopulation [100]. Möglicherweise wird man in Zukunft also aufgrund dieser Voraussetzungen Empfehlungen aussprechen können, in welcher Situation welcher der beiden Antikörper sinnvoller einzusetzen ist. Weitere Untersuchungen sind dazu nötig. Die Anfertigung eines prätherapeutischen Immunstatus sollte selbstverständlich sein, um etwaige Auffälligkeiten in den Zellkompartimenten zu erkennen.

## 4.2 Der CD107a-Assay zur Beurteilung der Zellfunktion

Zur Beurteilung der Zellaktivität wurde der CD107a-Assay verwendet, der auf dem Nachweis des CD107a-Antigens auf der Membran zytotoxischer Granula beruht. Nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern lässt sich so in der FACS-Messung bestimmen, welcher Prozentsatz der Zellen degranuliert, d.h. zytotoxisch aktiv geworden ist. Bisherige Studien weisen den Effekt bispezifischer Antikörper in der Regel dadurch nach, dass sie das Ausmaß an abgetöteten Zellen bestimmen. Hierfür genutzte Methoden sind z.B. der Chromium-Release-Assay, der LDH- oder der CFSE-Assay. Eine direkte Beurteilung der Effektorzellen gelingt damit nicht, beispielsweise erhält man keine Auskunft darüber, wie viele der Zellen aktiviert wurden. Der CD107-Assay hingegen ermöglicht die Betrachtung der Effektorzellpopulation und erlaubt eine Quantifizierung der zytotoxischen Zellantwort. Dieser Assay ist sowohl für NK- als auch für T-Zellen etabliert worden [101-103]. Betts et al. stellten zudem im direkten Vergleich eine genaue Korrelation der Ergebnisse des CD107-Assays mit denen anderer Zytotoxizitätsassays fest [101].

Die Wahl des CD107a-Assays berücksichtigt in besonderem Maße die Wirkweise der bispezifischen Antikörper. Sowohl T-Lymphozyten als auch Natürliche Killerzellen können nach Identifizierung einer Zielzelle über 2 verschiedene Wege zytotoxisch aktiv werden. Zum einen kann die Apoptose der Zielzelle über sogenannte Todesrezeptoren aus der Gruppe der TNF-Rezeptor-Familie, beispielsweise den CD95/CD95Ligand oder den Fas/FasLigand eingeleitet werden [104, 105]. Hierbei formieren Rezeptor und Ligand den „todes-induzierenden Signalkomplex“, DISC (*death inducing signaling complex*). Folge ist die Aktivierung intrazellulärer Caspasen, welche im organisierten Zelltod endet. Eine andere Möglichkeit ist die Freisetzung zytotoxischer Granula aus den Effektorzellen, welche Perforin, Granzyme A und B, Serglycin und weitere Moleküle enthalten [105, 106]. Diese Substanzen dringen auf noch nicht vollständig verstandene Weise in die Zielzelle ein und bewirken die Initiierung der Caspase-Kaskade, die Aktivierung DNA-degradierender Proteine sowie die Aktivierung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2- Proteinfamilie. Die Bedeutung dieser Vorgänge bei der Abwehr maligner Zellen ist mit Hilfe von Experimenten an knock-out-Mäusen nachgewiesen worden: Tiere, denen Perforin fehlte, entwickelten schon frühzeitig B-Zell-Lymphome [50]. Für die vorliegende Studie ist besonders relevant, dass die T-Zellen bei Einsatz des CD19XCD3 BsAb die CD19<sup>+</sup>Zielzellen auf dem Perforin/Granzyme-Weg angreifen [107, 108]. Todesrezeptoren scheinen hier keine Rolle zu spielen. Auch andere Studien bestätigen die Hochregulation von Granzyme B und in geringerem Ausmaß von

Perforin durch einen solchen BsAb [109, 110]. Auch NK-Zellen nutzen hauptsächlich den Perforin/Granzyme-Weg zur Eliminierung ihrer Zielzellen [111]. In Gegenwart von bispezifischen BsAb, die an CD16 binden, kommt es zu einer deutlich vermehrten Freisetzung zytotoxischer Granula [112]. Der CD107-Assay ermöglicht die Überwachung eben dieses Weges der Effektorzellfunktion und eignet sich daher besonders zur Beurteilung der zytotoxischen Fähigkeiten von NK- und T-Zellen, insbesondere auch unter dem Einfluss der BsAb.

### **4.3 Aktivierbarkeit der T- und NK-Zellen von Patienten mit NHL**

NK-Zellen stellen einen wichtigen Teil der Immunabwehr gegen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen dar. Ihre Bedeutung in der Tumorabwehr zeigt sich in Experimenten mit immundefizienten Mäusen, denen NK-Zellen fehlen. Diese Tiere entwickeln frühzeitig maligne Tumoren [50]. Im Gegensatz zu T-Zellen können NK-Zellen antigenunspezifisch und ohne vorherige Aktivierung abnorme Zellen mit verminderter MHC I-Expression erkennen und unmittelbar deren Apoptose einleiten. Sie sind damit unverzichtbarer Teil des angeborenen Immunsystems.

Der Kenntnisstand zur Funktionabilität der NK-Zellen bei Patienten mit malignen Lymphomen ist widersprüchlich. Mehrere Studien berichten von einer im Gegensatz zu gesunden Kontrollen stark verminderten zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen bei Patienten mit B-CLL [113, 114]. Ziegler et al. berichteten von einer kaum nachweisbaren Zellaktivität in 9 von 10 Blutproben von CLL-Patienten 6h nach Blutentnahme und diskutieren einen möglichen Zusammenhang mit der erhöhten Inzidenz sekundärer Malignome bei diesen Patienten [114]. Katrinakis et al. beobachteten ebenfalls eine stark verminderte NK-Zell-Aktivität bei 34 CLL-Patienten in Gegenwart von K562-Zellen [113]. Diese Gruppe konnte zeigen, dass NK-Zellen zwar an die Tumorzellen binden konnten, jedoch keine ausreichenden Zytokinmengen freisetzten, um ihre Zielzellen zu beeinflussen. In einer anderen Studie wurden 62 Patienten mit unbehandelten NHL untersucht, von denen ca. 50 % eine verminderte NK-Zell-Aktivität gegenüber K562-Zellen zeigten [115]. Eine Korrelation der Aktivitätswerte mit dem histologischen Lymphom-Subtypus oder dem Krankheitsstadium bestand nicht, Patienten mit disseminierter Erkrankung hatten sogar tendentiell höhere Zytotoxizitätswerte. Auch Konjevic et al. bestimmten die NK-Zell-Aktivität im Blut von unbehandelten Patienten mit NHL und stellten eine verminderte Aktivität fest. Allerdings

beobachteten sie eine Abnahme des zytotoxischen Potentials mit höherem Malignitätsgrad und fortschreitendem klinischen Stadium [116].

Eine solche verminderte Zellaktivität würde die Erfolgsaussichten einer Therapie mit NK-Zell-abhängigen Antikörpern einschränken, welche auf eine funktionierende Effektorzellen angewiesen sind. Es existieren jedoch auch Studien, die eine normale NK-Zell-Funktion zumindest bei einem Teil der NHL-Untertypen propagieren. So untersuchten Einhorn et al. Patienten mit Multiplem Myelom und stellten keine Unterschiede in der NK-Zell-Aktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest [117]. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine weitere Studie mit Myelom-Patienten [88]. Schließlich untersuchten Caldera et al. NK-Zellen aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut von 15 Patienten mit NHL und stellten in beiden Zellpopulationen eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen normale Zellaktivität fest [118].

Die widersprüchliche Kenntnislage macht es schwierig, abzuschätzen, ob Patienten mit verschiedenen NHL-Subtypen zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten NK-Zellen besitzen, die für eine Immuntherapie aktiv genug sind. Daher wurden in der vorliegenden Studie die zytotoxischen Fähigkeiten der NK-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Ausgangsbedingungen hinsichtlich Subtypus, klinischem Verlauf und Vortherapie bestimmt.

Um das zytotoxische Potential der NK-Zellen zu untersuchen, wurden K562-Zellen eingesetzt. Bei K562-Zellen, einer humanen Leukämiezellreihe, handelt es sich um Zellen, denen das MHC I-Oberflächenmolekül fehlt. Die Aktivierung von NK-Zellen folgt einem komplexen Muster und findet nur dann statt, wenn aktivierende Stimuli gegenüber inhibitorischen Reizen überwiegen [119]. MHC I-Moleküle auf der Oberfläche gesunder Zellen stellen einen starken inhibitorischen Reiz dar und verhindern normalerweise die NK-Zell-Aktivierung. Fehlen sie, beispielsweise durch Entartung oder Infektion einer Zelle, so resultiert daraus ein starker Anreiz für die NK-Zelle, zu degranulieren und somit die Apoptose ihrer Zielzelle einzuleiten. Dies wurde auch in den Ergebnissen dieser Studie sichtbar. Nach 6 h Inkubation mit den K562-Zellen degranulierten in der gesunden Kontrolle 28.5 % der NK-Zellen. Eine ebenso starke Reaktion konnte bei den NK-Zellen der Patienten beobachtet werden. Auch eine weitere Einteilung der Patienten in Gruppen nach histologischem Subtyp oder klinischem Status erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Damit ergibt sich in dieser Studie keinerlei Hinweis auf eine bei Patienten verminderte NK-Zellaktivität, die einer Immunotherapie im Wege stehen würde.

Einen Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Studienergebnisse könnten Unterschiede im Versuchsaufbau liefern. In der vorliegenden Studie wurden alle NK-Zellen

über Nacht, d.h. für mindestens 12 h in IL-2 inkubiert. Ziegler et al. berichteten, dass sich bei den Zellen von CLL- Patienten in einem Assay, der nach 18 statt nach 6 Stunden durchgeführt wurde, eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität zeigte. Die Aktivitätslevel lagen jedoch weiterhin unter dem gesunder Kontrollen. Des Weiteren berichten einige der genannten Studien, dass sich eine geringe NK-Zell-Aktivität im Blut von Patienten durch Einsatz von IL-2 oder IFN- $\alpha$  steigern ließ, dies jedoch immer nur prozentual zu der vorher bestehenden Aktivität. Die Zellen gesunder Kontrollen erreichten also nach Stimulation mit entsprechenden Substanzen weiterhin höhere Werte als die von Patienten gewonnenen Zellen [113, 115]. Auch in Studien, die primär eine normale NK-Zell-Funktion bei Patienten festgestellt hatten, ließ sich durch diese Substanzen das zytotoxische Potential weiter steigern [117, 118]. Es ist somit nicht auszuschließen, dass NK-Zellen im Blut von Tumorpatienten *in vivo* eine eingeschränkte Zellfunktion haben, die *in vitro* durch Zytokine und durch längere Inkubation in Kulturmedium partiell reversibel ist. Die Tatsache jedoch, dass in der vorliegenden Studie NK-Zellen von NHL-Patienten nach Inkubation mit IL-2 gleichwertige Zytotoxizitätslevel zeigten wie die Zellen gesunder Probanden, spricht gegen eine *in vivo* vorhandene ausgeprägte Funktionseinschränkung.

Auch die T-Lymphozyten sind wichtiger Bestandteil der körpereigenen Abwehr maligner Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden als die potentesten Killerzellen des Immunsystems angesehen. Im Gegensatz zu Natürlichen Killerzellen differenzieren sie sich erst nach Antigenkontakt zu hochspezifischen Effektorzellen und spielen dann eine große Rolle bei der lokalen Kontrolle von Tumoren [120]. Knock-out-Mäuse, denen T-Lymphozyten fehlen, entwickeln eine Vielzahl verschiedener Adenokarzinome [50]. Im Gegensatz zu der Funktion der NK-Zellen lässt sich die T-Zell-Funktion ansatzweise *in vivo* mittels Testung der Hautreaktion auf bestimmte Antigene ermitteln. Schon früh berichteten Studien über verminderte kutane Reaktionen auf Teststoffe als Zeichen einer eingeschränkten T-Zell-Funktion bei Patienten mit NHL [75, 76]. Jones et al. stellten dabei fest, dass die Funktionseinschränkung bei Patienten mit diffusem NHL deutlicher ausgeprägt war als bei Patienten mit nodulärem NHL [75]. Auch später folgende *In vitro*-Studien berichteten von einer bei Lymphompatienten verminderten T-Zell-Antwort auf das pflanzlichen Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) [87, 121, 122]. Anichini et al. fanden zudem sowohl im Blut als auch in Lymphknoten von Patienten mit B-Zell-NHL eine gestörte Differenzierung von T-Lymphozyten mit einer verminderten Expression von Granzyme B und Perforin, welche für die T-Zell-Funktion unerlässlich sind [123].

Um die Funktion der T-Zellen von NHL-Patienten und gesunden Kontrollen zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Studie das Superantigen SEB genutzt. In beiden Gruppen zeigte sich eine mäßige Reaktion der T-Zellen auf dieses Antigen; 8.1 % bzw. 5.4 % der Zellen waren degranuliert. Es konnte also nach Inkubation der T-Zellen in IL-2-haltigem Medium keinerlei Unterscheid mehr zwischen der Aktivierbarkeit der Zellen von gesunden Kontrollen und Patienten festgestellt werden. Es spielte keine Rolle, an welchem NHL-Typ der Patient erkrankt war, wie weit die Erkrankung fortgeschritten war und welche Therapie bisher erfolgt war. Somit ist auch hier die Grundlage für die Immunotherapie gegeben. Selbstverständlich ist analog zu den Überlegungen bei den NK-Zellen nicht auszuschließen, dass *in vivo* Bedingungen vorherrschen, die eine normale T-Zellfunktion verhindern und die sich *ex vivo* rückgängig machen lassen. So berichteten Anderson et al., dass allein das Waschen und Kultivieren der Lymphozyten zu einer signifikant höheren Ansprechbarkeit der Zellen auf PHA führte [76]. Eine andere Gruppe stellte bei einer Untersuchung der Lymphozyten von Patienten mit Hodgkin-Lymphomen fest, dass sich eine zuvor eingeschränkte Aktivierbarkeit durch Inkubation in fetalem Serum rückgängig machen ließ [124]. Die Gruppe um Anichini schließlich berichtete, dass die Inkubation der T-Lymphozyten mit den Zytokinen IL-2 und IL-15 zu einer Expansion zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte, welche in der Lage waren, Tumorzellen zu töten [123]. In wieweit *In vitro*-Ergebnisse Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* zulassen, ist auch hier nicht eindeutig beurteilbar. Allerdings weist die Tatsache, dass kein Unterschied in der Stimulierbarkeit der Zellpopulationen *in vitro* besteht, darauf hin, dass auch *in vivo* keine schwere Funktionseinschränkung bestand.

#### 4.4 Aktivierbarkeit durch Bispezifische Antikörper

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass sich sowohl NK- als auch T-Zellen unabhängig von Faktoren wie Krankheitssubtyp, -stadium oder Vortherapie aktivieren lassen, erfolgte eine direkte Anwendung des Antikörpers unter Verwendung von Effektorzellen aus Patientenblut. Zu den bispezifischen Antikörperformaten, die auf der Rekrutierung von T- und NK-Zellen gegen Tumorzellen basieren, ist bisher eine Reihe von Studien veröffentlicht worden. Ein Manko fast aller Untersuchungen ist jedoch, dass in der Regel Effektorzellen gesunder Probanden benutzt wurden, um die Eigenschaften der Antikörper und ihre Auswirkungen auf die Immunzellen zu studieren. Da Tumorpatienten und speziell

Lymphompatienten jedoch eine Reihe von Abnormalitäten des Immunsystems aufweisen, kann die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Effektorzellen von Patienten nicht einfach angenommen werden. Nur einige wenige Arbeitsgruppen setzten jedoch in ihren Experimenten T-Zellen aus dem peripheren Blut von NHL-Patienten ein. NK-Zellen von Patienten wurden in dieser Hinsicht noch gar nicht untersucht.

Bisher gibt es nur wenige Arbeiten zu den Eigenschaften von NK-Zell-abhängigen BsAb. In der Regel wurden diese BsAb so konzipiert, dass sie mit einem Arm an CD16A (Fcγ RIII) binden, den stärksten aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen. Eines der ersten Zielantigene war der Her2/neu-Rezeptor auf Zellen von Mamma- und Ovarialzellkarzinomen. Erste klinische Studien mit diesem Antikörperformat zeigten eine starke Aktivierung des Immunsystems, die zu einer dosislimitierenden Toxizität führte [125]. McCall et al. entwickelten diesen BsAb weiter und erreichten eine Lyse von über 50 % der Targetzellen durch periphere Lymphozyten gesunder Spender bei Effektor:Target-Ratios von 50:1 [126]. Zur Anwendung bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen wurde ein CD30XCD16 BsAb entwickelt, welcher *in vitro* und in Mausmodellen zu einer effizienten Lyse von CD30<sup>+</sup> Tumorzellen führte [127, 128]. Erste Anwendungen bei therapierefraktären Patienten zeigten eine klinische Antwort (stabile Erkrankung bis hin zu einer kompletten Remission) bei der Hälfte der Patienten [129]. Für die Anwendung bei Patienten mit NHL wurden CD19XCD16 BsAb entwickelt. Kipriyanov et al. untersuchten die Wirksamkeit eines CD19XCD16 BsAb im Vergleich zu einem CD19XCD3 BsAb und berichteten, dass beide Antikörper in Gegenwart von gesunden Effektorzellen zu einer ähnlich effizienten Lyse CD19-positiver Tumorzellen führten [130]. Beide Antikörper waren zudem in der Lage, das Lymphomwachstum in transfizierten Mäusen zurückzudrängen. Ähnliche Ergebnisse erhoben auch Schlenzka et al. [131]. Bruenke et al. entwickelten einen CD19XCD16 BsAb, mit dessen Hilfe Lymphomzelllinien sowie Tumorzellen von Patienten effizient angegriffen wurden [132]. Diese Gruppe verwendete NK-Zellen von gesunden Spendern sowie mononukleäre Zellen von 3 pädiatrischen ALL-Patienten nach Stammzelltransplantation. Alle Zellen waren in der Lage, mit Hilfe des BsAbs Lymphomzellen zu lysieren.

Da der CD19XCD16 BsAb noch nicht zur klinischen Anwendung bei Patienten gekommen ist, gibt es keine Informationen darüber, inwieweit sich NK-Zellen von NHL-Patienten durch den Antikörper aktivieren lassen. In der vorliegenden Studie wurden daher NK-Zellen von gesunden Probanden und Patienten in Gegenwart von CD19<sup>+</sup> Raji-Lymphomzellen mit dem CD19XCD16 BsAb inkubiert. In beiden Gruppen ließ sich daraufhin eine starke Zellaktivierung nachweisen: In der gesunden NK-Zellpopulation waren



im Mittel 24.9 % der Zellen degranuliert, in der Patientenpopulation waren es sogar 30.7 % und damit dreimal mehr Zellen als bei Inkubation mit den Lymphomzellen allein. Dabei spielte keine Rolle, welcher histologische Subtyp vorlag, in welchem Krankheitsstadium sich die Patienten befanden und ob sie intensiv vortherapiert waren. Der bispezifische Antikörper in Kombination mit den Targetzellen stellt demnach einen ebenso starken Aktivierungsreiz dar wie die K562-Zellen, welche eine ausgeprägte NK-Zell-Aktivierung hervorrufen. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein bispezifischer Antikörper basierend auf der Einbindung von NK-Zellen prinzipiell bei NHL-Patienten einsetzbar ist. NK-Zellen von Patienten mit NHL sind *in vitro* ebenso gut dazu in der Lage, Zielzellen mit Hilfe der Antikörper zu eliminieren wie die Zellen gesunder Spender.

Weitaus verbreiteter als ausführende Effektorzelle bei dem Einsatz von bispezifischen Antikörpern ist die T-Zelle [133]. Schon in den 90er Jahren wurden die ersten BsAb für die Anwendung bei NHL entwickelt, die zum einen an den T-Zell-aktivierenden Rezeptor CD3 binden und zum anderen an das CD19-Antigen auf B-Lymphozyten. Die Fähigkeit verschiedener Formate dieses BsAb, *in vitro* eine effiziente Lyse von Tumorzellen durch CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Probanden herbeizuführen, wurde von mehreren Gruppen beschrieben [98, 130, 134]. Neuere Studien zeigen, dass dieser Antikörper dazu in der Lage ist, T-Zellen spezifisch und wiederholt zu aktivieren, ohne dass dabei CD19-negative Zellen beeinträchtigt werden [135]. Auch *in vivo* in Experimenten mit immundefizienten Mäusen konnte mittels des Antikörpers und humaner Effektorzellen das Tumorwachstum gebremst und das Überleben der Tiere verlängert werden [136, 137]. In Schimpansen führte das Antikörperformat von Schlereth et al. zu einer raschen T-Zell-Aktivierung und peripheren B-Zell-Depletion bei moderaten Nebenwirkungen. Das zur Zeit am weitesten entwickelte bispezifische Antikörperformat, das auf der Aktivierung von T-Zellen beruht, ist der sogenannte BiTE (*bispecific T-cell-engager*) [138]. Der BiTE-Antikörper Blinatumomab (MT103) erwies sich *in vitro* als um ein vielfaches potenter als bis dahin entwickelte bispezifische Antikörperformate, weshalb er in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt werden kann [139]. Ein weiterer Vorteil der BiTEs ist ihre kurze Serumhalbwertszeit, die eine gute Dosiskontrolle ermöglicht. Erste Einsätze von Blinatumomab in klinischen Studien zeigten gute Erfolge [140]. In der Therapie der B-Zell Akuten lymphatischen Leukämie (B-ALL) erfolgte bereits der Einsatz in einer Phase II Studie. Hier führte die Therapie mit dem bispezifischen Antikörper bei Patienten mit

minimaler Resterkrankung zu einer raschen B-Zell-Depletion, einer Ansprechrate von 80% sowie zu einem rückfallfreien Überleben von 61% der Patienten nach 33 Monaten [141, 142]. Trotz der Vielfalt an Studien zu den verschiedenen bispezifischen CD19XCD3 Antikörperformaten gibt es nur vereinzelte Studien, bei denen T-Zellen von Lymphompatienten als Effektorzellen eingesetzt wurden. Beispielsweise isolierten Haagen et al. MNCs von Patienten mit NHL oder ALL in Remission oder Relaps und kultivierten diese für drei Wochen in IL-2/PHA- oder CD3mAb-haltigem Medium [143]. Anschließend beobachteten sie eine zytotoxische Aktivität von 5 % gegenüber B-Zellen, die sich durch Zugabe des BsAb auf 70 % steigern ließ. Die gleiche Gruppe nutzte Lymphozyten von vereinzelt NHL-Patienten in anderen Experimenten und stellte eine potente Aktivierung der Zellen durch BsAb fest [98, 144]. Löffler et al. führten eine größere Studie mit B-CLL-Patienten durch, um zu evaluieren, inwieweit T-Zellen dieser Patienten durch den CD19XCD3 BsAb aktivierbar waren [145]. Um das Verhältnis von Immuneffektorzellen zu Tumorzellen (Effektor:Target-Ratio) im Körper von Patienten nachzuahmen, wurden mononukleäre Zellen mit dem Antikörper inkubiert, ohne die T-Zellen vorher anzureichern. Insgesamt zeigte sich in 22/25 der Proben eine effektive Aktivierung der T-Lymphozyten, messbar an einer Elimination von B-Zellen. In 17 Proben war dazu nicht einmal eine zusätzliche Stimulation der T-Zellen notwendig; nur 5 Proben benötigten eine Zugabe von IL-2. Selbst Patienten mit multiplen Chemotherapien in der Vorgeschichte zeigten eine Aktivierbarkeit der T-Zellen durch die Antikörper. Aufgrund der Datenlage lässt sich nicht vorhersagen, ob für Patienten mit unterschiedlichen NHL-Entitäten, unterschiedlichem klinischen Status und nach unterschiedlichen Vortherapien der T-Zell-abhängige BsAb eine therapeutische Option darstellt. Daher wurde in der vorliegenden Studie auch für T-Zellen untersucht, in wieweit sie durch den Antikörper aktivierbar waren.

Sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Lymphompatienten führte die Zugabe des BsAb in Gegenwart der CD19<sup>+</sup> Raji-Zellen zu einer Degranulation von über 20 % der T-Zellen. Im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit Lymphomzellen stellte dies eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität um das siebenfache und damit einen deutlich stärkeren Reiz dar als das Superantigen SEB. BsAb in Gegenwart von Zielzellen stellen also einen starken Aktivierungsreiz für T-Lymphozyten - unabhängig von ihrer Antigen-spezifität - dar, und die Zellen von Patienten reagieren darauf genauso potent wie die Zellen gesunder Kontrollen. Wie auch bei den NK-Zellen spielte keine Rolle, ob die Patienten an einem indolenten oder aggressiven Lymphom litten, wie weit die Krankheit fortgeschritten war und welche Therapie sie erhalten hatten. Daraus lässt sich die mögliche Anwendbarkeit des

Antikörpers bei einer Vielzahl von Patienten ableiten. Auch bei diesem Antikörper sind damit keine Einschränkungen in der klinischen Wirksamkeit aufgrund einer eingeschränkten Zellfunktion zu erwarten.

Die Tatsache, dass sich T-Zellen von NHL-Patienten durch CD19XCD3 BsAb aktivieren ließen, wird durch die Ergebnisse laufender oder abgeschlossener klinischer Studien mit diesen Antikörpern gestützt. Der BiTE-Antikörper Blinatumomab bewirkte in einer klinischen Phase I-Studie mit NHL-Patienten schon in geringen Dosen ein Verschwinden der Tumorzellen aus dem peripheren Blut [146]. Mit Einsatz höherer Dosen stieg auch die Tumorantwort - alle sieben mit der höchsten Dosis behandelten Patienten zeigten eine partielle oder komplette Remission. Ebenso wie bei den Patienten in der vorliegenden Studie lagen unterschiedliche Subtypen sowie ein unterschiedliches Ausmaß an Vortherapie vor. Analog den Ergebnissen der vorliegenden Studie scheint die Vorgeschichte keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der T-Zellen und damit der Wirksamkeit der Antikörpertherapie zu haben.

Während die Mehrheit der Effektorzellen von Patienten nach einem bestimmten Muster reagierten, gab es drei Patienten, deren Zellen eine eingeschränkte Aktivierbarkeit zeigten. Ein Patient zeigte eine stark verminderte Reaktion der NK- als auch der T-Zellen auf die Zugabe des jeweiligen BsAb in Gegenwart der Lymphomzellen. Dieser Patient erhielt eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid, einem Medikament, welches normalerweise die NK-Zell-Aktivität steigert [147]. Zwei andere Patienten zeigten eine normale NK-Zellfunktion, aber eine verminderte Aktivität der T-Zellen. Eine Erklärung für diese Einbußen ist nicht ersichtlich. Zwar erhielt einer der beiden Patienten eine Rituximab-Erhaltungstherapie, jedoch war dies auch bei anderen Patienten der Fall, die alle eine normale Zellfunktion hatten.

#### **4.5 Einfluss des BsAb bei fehlenden Targetzellen**

Soll ein neues Medikament in die klinische Testphase übergehen, so ist wichtig, vorher abzuschätzen, in wieweit Nebenwirkungen zu erwarten sind, die die Dosierung des Wirkstoffes begrenzen und die klinische Anwendung vielleicht sogar ausschließen. Für den sicheren Einsatz von Therapeutika, welche in das Immunsystem eingreifen, ist Voraussetzung, dass es sich dabei um Substanzen handelt, die nicht zu einer generellen Immunreaktion mit massiver Zytokinfreisetzung führen, denn dabei wäre die Gefahr der

Hypotension und des kardiovaskulären Versagens hoch. Dies gilt auch für den Einsatz der bispezifischen Antikörper. Diese binden mit einem Arm an aktivierende Rezeptoren potenter Immuneffektorzellen. Wäre eine darauf folgende Aktivierung dieser Zellen nicht zielgerichtet sondern generalisiert, hätte dies fatale Folgen für den Organismus. Es ist daher für die Praxis essentiell, dass eine Aktivierung der Zellen durch den BsAb nur dann eintritt, wenn auch der zweite Arm des Antikörpers an sein Zielantigen auf der Tumorzelle gebunden hat.

Um zu evaluieren, inwieweit die Antikörper per se zu einer Aktivierung der Zellen führen, wurden NK- und T-Zellen gesunder Spender mit dem jeweiligen BsAb inkubiert, ohne CD19<sup>+</sup> Targetzellen hinzuzugeben. Eine Aktivierung der Zellen war folglich nicht zu erwarten, da nur ein Arm der Antikörper an seinen Rezeptor gebunden hatte. NK-Zellen zeigten dementsprechend keine Reaktion auf den BsAb; für ihre Aktivierung war die Vernetzung zwischen Target- und Effektorzelle durch den Antikörper essentiell. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Gruppe um Bruenke et al. [132]. Bei Einsatz dieses Antikörpers ist daher nicht mit systemischen Reaktionen durch die generalisierte Aktivierung von NK-Zellen zu rechnen. Klinische Daten gibt es hierzu jedoch noch nicht.

T-Zellen zeigten hingegen eine signifikant höhere Aktivierung in Gegenwart des Antikörpers als in der Probe ohne Zugabe weiterer Agentien. Dies ist wahrscheinlich der Tatsache zuzuschreiben, dass in den Proben autologe B-Lymphozyten vorhanden waren, die durch den Antikörper mit den T-Zellen quervernetzt wurden und so zu einer Aktivierung der Zellen führten. Für andere CD3-abhängige Antikörper-Formate wurde berichtet, dass selbst hohe Konzentrationen des Antikörpers bei fehlenden Target-Zellen keine Reaktion auslösen [110, 148, 149]. Auch die Ergebnisse des Einsatzes von Blinatumomab in ersten klinischen Studien deuten nicht auf eine Tumorunabhängige T-Zell-Aktivierung durch den Antikörper hin [140]. Beobachtete Nebenwirkungen beinhalteten in der Regel Grippe-ähnliche Symptome sowie eine Leuko- und Lymphopenie. Vereinzelt kommt es jedoch auch zu Zytokin-Freisetzungssyndromen, insbesondere bei hoher Tumorlast [150, 151]. Diese Fälle treten jedoch vereinzelt auf und lassen sich in der Regel gut behandeln. Die klinischen Daten stützen insgesamt die Annahme, dass die systemische Applikation des CD19XCD3 BsAb weitestgehend sicher ist, jedoch sollten weitere Experimente zur Klärung dieser Frage beitragen.

#### 4.6 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Studie nachgewiesen werden: (1) Patienten mit NHL weisen abhängig von Krankheitsstadium abnorme Zellzahlen auf, die bei dem Einsatz der BsAbs berücksichtigt werden müssen, (2) die Effektorzellen von Lymphompatienten weisen nach Stimulation mit IL-2 eine ebenso hohe zytotoxische Aktivität auf wie die Zellen gesunder Probanden, (3) CD19XCD3 und CD19XCD16 BsAb führen in Gegenwart CD19<sup>+</sup> Zellen zu einer starken Degranulation von NK- und T-Zellen sowohl gesunder als auch erkrankter Probanden, dabei ist (4) das zytotoxische Potential der Zellen unabhängig von Faktoren wie NHL-Subtypus, Krankheitsstadium oder Vortherapie, (5) einige wenige Patienten zeigen hyporesponsive Zellen, (6) der BsAb allein führt zu einer fehlenden bzw. nur gering ausgeprägten Zellaktivierung.

Was bedeutet das für den Einsatz der BsAb in der Klinik? Die absolute Zellzahl im Blut der Patienten ist sicherlich ein wichtiger Punkt, wenn es um die Einsetzbarkeit der BsAb generell geht und darum, welchen BsAb man bevorzugt zu welchem Zeitpunkt in der Erkrankung verwendet. In der vorliegenden Studie zeigten sich die T-Lymphozyten als mit fortschreitender Erkrankung besonders beeinträchtigte Zelluntergruppe, während die NK-Zellpopulation im Schnitt normale Werte zeigte. Allerdings ist die absolute Zahl der T-Lymphozyten ohnehin von vornherein höher als die Zahl der NK-Zellen, zumal an der Wirkung des BsAb sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt sind [98]. NK-Zellen wiederum zeigen sich als resistente Zellgruppe im Anschluss an Chemotherapie und Stammzelltransplantation. Eine klare Anwendungsempfehlung lässt sich daher aus den Ergebnissen nicht ableiten. Vermutlich ist eine individuelle Erhebung des Zellstatus bei jedem Patienten unerlässlich, um die Erfolgsaussichten einer zellbasierten Therapie abzuschätzen. Zu den Herausforderungen der Antikörper-Herstellung wird zudem die Weiterentwicklung von Formaten gehören, die bei einer niedrigen Effektor:Target-Ratio effektiv sind. Auch die Kombination mit anderen Therapiestrategien wie der Effektorzellexpansion *ex vivo* mit anschließender autologer Transfusion oder der Transfusion von Lymphozyten gesunder Spender könnte zukünftig an Bedeutung erlangen. Hierdurch könnten niedrige Zellzahlen *in vivo* ausgeglichen und die Wirksamkeit der Therapie verbessert werden.

Neben der Zahl der vorhandenen Effektorzellen ist ihre zytotoxische Funktion entscheidend für den Erfolg einer Immunotherapie mit BsAb. Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es bezüglich der Funktion der Zellen keine Einschränkung hinsichtlich der Anwendbarkeit der Antikörpertherapie in der sehr inhomogenen Gruppe der

NHL-Patienten gibt. Jedoch können *ex vivo*-Experimente, wie schon mehrfach erwähnt, immer nur einen Anhalt dafür geben, wie Zellen sich innerhalb des Patienten oder auch innerhalb des Tumorgewebes verhalten. Es gibt einige Studien, die das Verhalten von Effektorzellen innerhalb des Tumors untersuchen. So berichteten Radoja et al. von einer stark verminderten zytotoxischen Aktivität CD8<sup>+</sup> tumorinfiltrierender Lymphozyten beruhend auf einer gestörten Freisetzung zytotoxischer Granula [152]. Andere Studien berichten von veränderten Oberflächenrezeptoren auf T- und NK-Zellen in humanem Tumorgewebe mit folglich eingeschränkter Effektorfunktion [153-155]. Mittal et al. beobachteten, dass Lymphomzellen von Patienten mit NHL die Ausbildung regulatorischer CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierten, welche die zytotoxische Funktion CD8<sup>+</sup> Zellen inhibieren [156]. Mittal et al. und Radoja et al. konnten zudem zeigen, dass die Funktionseinschränkung der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten potentiell reversibel ist [152, 156]. Antikörperformate zu entwickeln, die dazu in der Lage sind, diese anergischen Zustände innerhalb des Tumorgewebes zu durchbrechen und eine Aktivierung der Zytotoxizität unabhängig vom immunosuppressiven Umfeld zu induzieren, stellt eine der größten Herausforderungen für die Zukunft dar. Möglicherweise könnte auch eine Coadministration von IL-2 zur Verbesserung der Antikörperwirksamkeit sinnvoll sein. Eine Studie von Hartmann et al. zeigte beispielsweise die erhöhte Wirksamkeit eines CD30XCD16 BsAb bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen unter gleichzeitiger Gabe von IL-2 [129]. Vermutlich lässt sich dies auf andere BsAb-Formate übertragen. Neue Antikörperformate sollten jedoch idealerweise auch ohne Costimulation eine Aktivierung der Zellen erreichen, wie das beispielsweise mit neueren BiTE-Antikörpern gelungen ist [138]. Mit der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass Effektorzellen dann in der Lage sind, genauso effizient ihre Funktion auszuüben wie die Zellen gesunder Menschen. Eine Intensivierung der Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, um Therapieansätze mit bispezifischen Antikörperformaten zu optimieren.

**5. Literaturverzeichnis**

1. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/browse\\_csr.php?section=19&page=sect\\_19\\_table.05.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/browse_csr.php?section=19&page=sect_19_table.05.html). [cited 2011 02/19].
2. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx#](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx#). [cited 2014 03/18].
3. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/browse\\_csr.php?section=19&page=sect\\_19\\_table.07.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/browse_csr.php?section=19&page=sect_19_table.07.html). [cited 2011 02/19].
4. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* Blood, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
5. Mueller, N., *Overview of the epidemiology of malignancy in immune deficiency.* J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. **21 Suppl 1**: p. S5-10.
6. Beral, V., et al., *AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma.* Lancet, 1991. **337**(8745): p. 805-9.
7. Smedby, K.E., et al., *Autoimmune and chronic inflammatory disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma by subtype.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(1): p. 51-60.
8. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma.* N Engl J Med, 1994. **330**(18): p. 1267-71.
9. Itoyama, T., et al., *Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell leukemia/lymphoma: a study of 50 cases from the human T-cell leukemia virus type-1 endemic area, Nagasaki.* Blood, 2001. **97**(11): p. 3612-20.
10. Neri, A., et al., *Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma.* Blood, 1991. **77**(5): p. 1092-5.
11. Giordano, T.P., et al., *Risk of non-Hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus.* JAMA, 2007. **297**(18): p. 2010-7.
12. Chiu, B.C., et al., *The utility of t(14;18) in understanding risk factors for non-Hodgkin lymphoma.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2008(39): p. 69-73.
13. Alexander, D.D., et al., *The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature.* Int J Cancer, 2007. **120 Suppl 12**: p. 1-39.
14. Richardson, D.B., et al., *Positive associations between ionizing radiation and lymphoma mortality among men.* Am J Epidemiol, 2009. **169**(8): p. 969-76.
15. Harris, N.L., et al., *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997.* J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3835-49.
16. Herold, G., in *Innere Medizin*, 2013: Köln. p. 74-75.
17. Hiddemann, W., et al., *Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing.* Blood, 1996. **88**(11): p. 4085-9.
18. Shipp, M.A., *Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease?* Blood, 1994. **83**(5): p. 1165-73.
19. *A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project.* N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 987-94.
20. Guglielmi, C., et al., *Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial.* J Clin Oncol, 1998. **16**(10): p. 3264-9.

21. Pfreundschuh, M., et al., *Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL*. *Blood*, 2004. **104**(3): p. 626-33.
22. Ott, G., et al., *Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3806-12.
23. Buske, C., et al., *The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1504-8.
24. Ott, O.J., et al., *Radiotherapy for stage I-III nodal low-grade non-Hodgkin's lymphoma*. *Strahlenther Onkol*, 2003. **179**(10): p. 694-701.
25. Ardeschna, K.M., et al., *Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2003. **362**(9383): p. 516-22.
26. Hiddemann, W., et al., *Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3725-32.
27. Schulz, H., et al., *Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(9): p. 706-14.
28. Rohatiner, A.Z., et al., *Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(10): p. 2215-23.
29. Vidal, L., et al., *Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: systematic review and meta-analysis of randomized trials*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(4): p. 248-55.
30. Czuczman, M.S., et al., *Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-year follow-up*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(23): p. 4711-6.
31. Forstpointner, R., et al., *The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3064-71.
32. Rohatiner, A.Z., et al., *Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(18): p. 2554-9.
33. Khouri, I.F., et al., *Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality*. *Blood*, 2001. **98**(13): p. 3595-9.
34. Feugier, P., et al., *Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(18): p. 4117-26.
35. Pfreundschuh, M., *Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Young Patients*. *American Journal of Cancer*, 2005. **4**(6): p. 349-357.



36. Glass, B., et al., *Dose-escalated CHOP plus etoposide (MegaCHOEP) followed by repeated stem cell transplantation for primary treatment of aggressive high-risk non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3058-64.
37. Philip, T., et al., *Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 1995. **333**(23): p. 1540-5.
38. Levine, J.E., et al., *A comparison of allogeneic and autologous bone marrow transplantation for lymphoblastic lymphoma*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2476-82.
39. Weide, R., et al., *Retreatment with bendamustine-containing regimens in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia and indolent B-cell lymphomas achieves high response rates and some long lasting remissions*. Leuk Lymphoma, 2012. Epub ahead of print.
40. Horn, J., et al., *Treatment option of bendamustine in combination with rituximab in elderly and frail patients with aggressive B-non-Hodgkin lymphoma: rational, efficacy, and tolerance*. Ann Hematol, 2012. **91**(10): p. 1579-86.
41. Mato, A.R., T. Feldman, and A. Goy, *Proteasome inhibition and combination therapy for non-Hodgkin's lymphoma: from bench to bedside*. Oncologist, 2012. **17**(5): p. 694-707.
42. Kahl, B.S., B.D. Cheson, and J.W. Friedberg, *Clinical Roundtable Monograph: current treatment options for NHL patients refractory to standard therapy: recent data in single-agent and combination therapy*. Clin Adv Hematol Oncol, 2010. **8**(5): p. 1-16.
43. Dutia M, D., Chee K, et al, *Preliminary results of a phase II study of lenalidomide and rituximab in relapsed/refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 2009. **114**. Abstract 1679.
44. Flinn IW, B.J., Furman RR, et al. , *Evidence of clinical activity in a phase I study of CAL-101, and oral PI10 isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies*. Blood, 2009. **114**.Abstract 922.
45. Waters, J.S., et al., *Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(9): p. 1812-23.
46. Pro, B., et al., *Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Br J Haematol, 2008. **143**(3): p. 355-60.
47. Cheson, B.D., *What is new in lymphoma?* CA Cancer J Clin, 2004. **54**(5): p. 260-72.
48. Delmonte, A., M. Ghielmini, and C. Sessa, *Beyond monoclonal antibodies: new therapeutic agents in non-Hodgkin's lymphomas*. Oncologist, 2009. **14**(5): p. 511-25.
49. Tay, K., K. Dunleavy, and W.H. Wilson, *Novel agents for B-cell non-Hodgkin lymphoma: science and the promise*. Blood Rev, 2010. **24**(2): p. 69-82.
50. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1137-46.
51. Janeway, C.A., in *Immunologie*. 2009, Spektrum Verlag: Heidelberg. p. 849-854.
52. Blattman, J.N. and P.D. Greenberg, *Cancer immunotherapy: a treatment for the masses*. Science, 2004. **305**(5681): p. 200-5.
53. Villamor, N., E. Montserrat, and D. Colomer, *Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy*. Semin Oncol, 2003. **30**(4): p. 424-33.
54. Janeway, C.A., in *Immunologie*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg. p. 86-106.
55. Janeway, C.A., in *Immunologie*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg. p. 516-522.

56. Weiner, L.M., M.V. Dhodapkar, and S. Ferrone, *Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy*. Lancet, 2009. **373**(9668): p. 1033-40.
57. Dhodapkar, K.M. and M.V. Dhodapkar, *Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6243-4.
58. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20*. Blood, 1994. **83**(2): p. 435-45.
59. Maloney, D.G., B. Smith, and A. Rose, *Rituximab: mechanism of action and resistance*. Semin Oncol, 2002. **29**(1 Suppl 2): p. 2-9.
60. Demidem, A., et al., *Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs*. Cancer Biother Radiopharm, 1997. **12**(3): p. 177-86.
61. Weng, W.K. and R. Levy, *Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3940-7.
62. Mounier, N., et al., *Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4279-84.
63. Cang, S., et al., *Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 64.
64. Stevens, P.L., O. Oluwole, and N. Reddy, *Advances and application of radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma*. Am J Blood Res, 2012. **2**(2): p. 86-97.
65. Chames, P. and D. Baty, *Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?* MAbs, 2009. **1**(6): p. 539-47.
66. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 220-33.
67. Siberil, S., et al., *Molecular aspects of human FcgammaR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences*. Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 111-8.
68. Preithner, S., et al., *High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G*. Mol Immunol, 2006. **43**(8): p. 1183-93.
69. Fischer, N. and O. Leger, *Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies*. Pathobiology, 2007. **74**(1): p. 3-14.
70. Scheuermann, R.H. and E. Racila, *CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy*. Leuk Lymphoma, 1995. **18**(5-6): p. 385-97.
71. Jentsch-Ullrich, K., et al., *Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study*. Clin Immunol, 2005. **116**(2): p. 192-7.
72. Kipriyanov, S.M., et al., *Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics*. J Mol Biol, 1999. **293**(1): p. 41-56.
73. Le Gall, F., et al., *Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(4): p. 357-66.
74. Harris, J. and D. Copeland, *Impaired immunoresponsiveness in tumor patients*. Ann N Y Acad Sci, 1974. **230**: p. 56-85.
75. Jones, S.E., et al., *Immunodeficiency in patients with non-Hodgkin lymphomas*. Blood, 1977. **49**(3): p. 335-44.
76. Anderson, T.C., et al., *Immunocompetence and malignant lymphoma: immunologic status before therapy*. Cancer, 1981. **48**(12): p. 2702-9.

77. Kovacs, G.T., et al., *Late immune recovery in children treated for malignant diseases*. *Pathol Oncol Res*, 2008. **14**(4): p. 391-7.
78. Hasenclever, D. and V. Diehl, *A prognostic score for advanced Hodgkin's disease*. *International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(21): p. 1506-14.
79. Ray-Coquard, I., et al., *Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5383-91.
80. Cox, M.C., et al., *Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 2008. **49**(9): p. 1745-51.
81. Siddiqui, M., et al., *Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas*. *Br J Haematol*, 2006. **134**(6): p. 596-601.
82. Ege, H., et al., *Prediction of survival using absolute lymphocyte count for newly diagnosed patients with multiple myeloma: a retrospective study*. *Br J Haematol*, 2008. **141**(6): p. 792-8.
83. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Deficiency of mature B and T lymphocyte subsets in the blood of non-Hodgkin lymphoma patients*. *Am J Hematol*, 1987. **26**(2): p. 125-34.
84. Dehghani, M., et al., *Prognostic significance of T cell subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients*. *Med Oncol*, 2012. **29**(4): p. 2364-71.
85. Kay, N.E., M.M. Oken, and R.T. Perri, *The influential T cell in B-cell neoplasms*. *J Clin Oncol*, 1983. **1**(12): p. 810-6.
86. Herrmann, F., et al., *Imbalance of T cell subpopulations in patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B cell type*. *Clin Exp Immunol*, 1982. **49**(1): p. 157-62.
87. Scrivener, S., et al., *Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(3): p. 383-9.
88. De Rossi, G., et al., *Surface markers and cytotoxic activities of lymphocytes in monoclonal gammopathy of undetermined significance and untreated multiple myeloma. Increased phytohemagglutinin-induced cellular cytotoxicity and inverted helper/suppressor cell ratio are features common to both diseases*. *Cancer Immunol Immunother*, 1987. **25**(2): p. 133-6.
89. Mackall, C.L., et al., *Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer*. *Blood*, 1994. **84**(7): p. 2221-8.
90. Herrmann, F., et al., *Evaluation of the circulating and splenic lymphocyte subpopulations in patients with non-Hodgkin lymphomas and Hodgkin's disease using monoclonal antibodies*. *Blut*, 1983. **47**(1): p. 41-51.
91. Maloney, D.G., et al., *IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma*. *Blood*, 1997. **90**(6): p. 2188-95.
92. Plonquet, A., et al., *Peripheral blood natural killer cell count is associated with clinical outcome in patients with aaIPI 2-3 diffuse large B-cell lymphoma*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(7): p. 1209-15.
93. Wahlin, B.E., et al., *CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 388-97.
94. Gattlinger, C., et al., *Imbalance of helper and suppressor T lymphocytes in malignant non-Hodgkin lymphomas: an in situ morphometric analysis*. *Int J Cancer*, 1984. **33**(6): p. 751-7.
95. Ansell, S.M., et al., *Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(3): p. 720-6.

96. Hoffmann, P., et al., *Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. Int J Cancer, 2005. **115**(1): p. 98-104.
97. Kufer, P., R. Lutterbuse, and P.A. Baeuerle, *A revival of bispecific antibodies*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 238-44.
98. Haagen, I.A., et al., *Unprimed CD4+ and CD8+ T cells can be rapidly activated by a CD3 x CD19 bispecific antibody to proliferate and become cytotoxic*. Cancer Immunol Immunother, 1994. **39**(6): p. 391-6.
99. Guven, H., et al., *Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy*. Leukemia, 2003. **17**(10): p. 1973-80.
100. Eyrich, M., et al., *A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors*. Br J Haematol, 2001. **114**(2): p. 422-32.
101. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
102. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1377-82.
103. Uhrberg, M., *The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells*. Leukemia, 2005. **19**(5): p. 707-9.
104. Krammer, P.H., *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
105. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
106. Metkar, S.S., et al., *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 417-28.
107. Gruen, M., K. Bommert, and R.C. Bargou, *T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(7): p. 625-32.
108. Porakishvili, N., et al., *Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway*. Haematologica, 2004. **89**(4): p. 435-43.
109. Haas, C., et al., *Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110*. Immunobiology, 2009. **214**(6): p. 441-53.
110. Brischwein, K., et al., *MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors*. Mol Immunol, 2006. **43**(8): p. 1129-43.
111. Hallett, W.H. and W.J. Murphy, *Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(1): p. 12-21.
112. Gleason, M.K., et al., *Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(12): p. 2674-84.
113. Katrinakis, G., et al., *Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha*. Acta Haematol, 1996. **96**(1): p. 16-23.

114. Ziegler, H.W., N.E. Kay, and J.M. Zarling, *Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Int J Cancer*, 1981. **27**(3): p. 321-7.
115. Healy, F., R.C. Rees, and B.W. Hancock, *An assessment of natural cell-mediated cytotoxicity in patients with malignant lymphoma*. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1985. **21**(7): p. 775-83.
116. Konjevic, G., et al., *The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease*. *Br J Haematol*, 1999. **104**(1): p. 144-51.
117. Einhorn, S., et al., *Influence of human interferon-alpha therapy on cytotoxic functions of blood lymphocytes. Studies on lectin-dependent cellular cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and natural killer cell activity*. *Cancer Immunol Immunother*, 1983. **16**(2): p. 77-80.
118. Caldera, L.H., et al., *Bone marrow and peripheral blood natural killer cell activity in lymphomas. Its response to IL-2*. *Clin Exp Immunol*, 1992. **88**(1): p. 143-8.
119. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(2): p. 173-83.
120. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
121. Mangge, H., et al., *Cytofluorimetric analysis of mitogen-activated peripheral blood lymphocytes of non-leukemic lymphoma patients reveals an abnormal disease-related expression pattern of activation antigens*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990. **116**(6): p. 575-80.
122. Prieto, A., et al., *Diminished DNA synthesis in T cells from B chronic lymphocytic leukemia after phytohemagglutinin, anti-CD3, and phorbol myristate acetate mitogenic signals*. *Exp Hematol*, 1993. **21**(12): p. 1563-9.
123. Anichini, A., et al., *Skewed T-cell differentiation in patients with indolent non-Hodgkin lymphoma reversed by ex vivo T-cell culture with gammac cytokines*. *Blood*, 2006. **107**(2): p. 602-9.
124. Fuks, Z., et al., *Reversal of cell surface abnormalities of T lymphocytes in hodgkin's disease after in vitro incubation in fetal sera*. *J Immunol*, 1976. **117**(4): p. 1331-5.
125. Weiner, L.M., et al., *Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII*. *Cancer Res*, 1995. **55**(20): p. 4586-93.
126. McCall, A.M., et al., *Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity*. *Mol Immunol*, 1999. **36**(7): p. 433-45.
127. Hombach, A., et al., *A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells in vitro and in vivo*. *Int J Cancer*, 1993. **55**(5): p. 830-6.
128. Arndt, M.A., et al., *A bispecific diabody that mediates natural killer cell cytotoxicity against xenotransplanted human Hodgkin's tumors*. *Blood*, 1999. **94**(8): p. 2562-8.
129. Hartmann, F., et al., *Anti-CD16/CD30 bispecific antibody treatment for Hodgkin's disease: role of infusion schedule and costimulation with cytokines*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(7): p. 1873-81.
130. Kipriyanov, S.M., et al., *Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 137-44.
131. Schlenzka, J., et al., *Combined effect of recombinant CD19 x CD16 diabody and thalidomide in a preclinical model of human B cell lymphoma*. *Anticancer Drugs*, 2004. **15**(9): p. 915-9.

132. Bruenke, J., et al., *Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and Fcγ<sub>3</sub> (CD16)*. Br J Haematol, 2005. **130**(2): p. 218-28.
133. Muller, D. and R.E. Kontermann, *Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives*. BioDrugs, 2010. **24**(2): p. 89-98.
134. Kipriyanov, S.M., et al., *Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells*. Int J Cancer, 1998. **77**(5): p. 763-72.
135. Reusch, U., et al., *Effect of tetravalent bispecific CD19xCD3 recombinant antibody construct and CD28 costimulation on lysis of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells*. Int J Cancer, 2004. **112**(3): p. 509-18.
136. Cochlovius, B., et al., *Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 x CD19 diabody and T cells*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 888-95.
137. Dreier, T., et al., *T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4397-402.
138. Baeuerle, P.A. and C. Reinhardt, *Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 4941-4.
139. Molhoj, M., et al., *CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis*. Mol Immunol, 2007. **44**(8): p. 1935-43.
140. Nagorsen, D., et al., *Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(6): p. 886-91.
141. Klinger, M., et al., *Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab*. Blood, 2012. **119**(26): p. 6226-33.
142. Topp, M.S., et al., *Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5185-7.
143. Haagen, I.A., et al., *Killing of autologous B-lineage malignancy using CD3 x CD19 bispecific monoclonal antibody in end stage leukemia and lymphoma*. Blood, 1994. **84**(2): p. 556-63.
144. Haagen, I.A., et al., *The efficacy of CD3 x CD19 bispecific monoclonal antibody (BsAb) in a clonogenic assay: the effect of repeated addition of BsAb and interleukin-2*. Blood, 1995. **85**(11): p. 3208-12.
145. Loffler, A., et al., *Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct*. Leukemia, 2003. **17**(5): p. 900-9.
146. Bargou, R., et al., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. Science, 2008. **321**(5891): p. 974-7.
147. Hayashi, T., et al., *Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application*. Br J Haematol, 2005. **128**(2): p. 192-203.
148. Brischwein, K., et al., *Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class*. J Immunother, 2007. **30**(8): p. 798-807.
149. Mack, M., et al., *Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3965-70.

150. Teachey, D.T., et al., *Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine directed therapy*. Blood, 2013.
151. Portell, C.A., C.M. Wenzell, and A.S. Advani, *Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Clin Pharmacol, 2013. **5**(Suppl 1): p. 5-11.
152. Radoja, S., et al., *CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5042-51.
153. Nakagomi, H., et al., *Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma*. Cancer Res, 1993. **53**(23): p. 5610-2.
154. Le Maux Chansac, B., et al., *NK cells infiltrating a MHC class I-deficient lung adenocarcinoma display impaired cytotoxic activity toward autologous tumor cells associated with altered NK cell-triggering receptors*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5790-8.
155. Reichert, T.E., et al., *Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(10): p. 3137-45.
156. Mittal, S., et al., *Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2008. **111**(11): p. 5359-70.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Haas für die Überlassung des Themas und die Anbahnung des Projektes, sowie Herrn Prof. Germing für die Klärung universitärer Fragen.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Neumann sowie Herrn Prof. Uhrberg und seiner Abteilung für die Betreuung während der Durchführung der Experimente und der Anfertigung der Publikation, insbesondere Frau Dr. Kathrin Schönberg für die geduldige Unterstützung im Labor und die fortwährende Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Daniela Brännert für die bereitwillige Unterstützung nicht nur bei der Postergestaltung. Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Little und Herrn Dr. Reusch für die Überlassung des Antikörpers sowie die fortwährende Diskussionsbereitschaft. Frau Götzi danke ich für die Durchführung der Blutentnahmen. Allen Patienten, die für die Studie Blut gespendet haben, sei herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und sich zu jedem Zeitpunkt für mich eingesetzt und mich unterstützt hat. Auch meinen Freunden möchte ich danken. Ohne ihre Unterstützung und die meiner Familie wäre die Arbeit nie fertig geworden.



**Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

---

---