

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
Hämatologie und Onkologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Reduktion und Kinetik der peripheren B-Zellen  
nach Behandlung mit dem HLA-DR-Antikörper 1D09C3  
bei Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Armin Tuchscherer  
aus Köln

promoviert am 13. März 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, 2013



Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. rer. medic. Timo Schinköthe und der medizinisch technischen Assistentin Frau Adriane Pütter von mir selbst ausgeführt worden. Ebenso wurden die aufgeführten Studienergebnisse von mir selbst ausgewertet. Bezüglich der statistischen Auswertung erhielt ich Beratung und Unterstützung von Dipl.-Inform. Hildegard Christ aus dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie der Universität zu Köln sowie von Dr. med. Carmen Schweighofer.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek und Herrn Privatdozent Dr. med. Peter Staib, dass sie mir die Möglichkeit boten, in der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln eine Forschungstätigkeit durchführen zu können.

Des Weiteren möchte ich Herrn Professor Dr. rer. medic. Timo Schinköthe für die Einführung in die Technik der Durchflusszytometrie danken und vor allem Dr. med. Carmen Schweighofer für die sehr gute Betreuung vom Beginn bis zum Abschluss der Arbeit.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Doktoranten des Labors für molekulare Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln. Besonderer Dank gebührt dabei Frau Adriane Pütter für die gemeinsame Meisterung der technischen Herausforderungen. Aus dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie der Universität zu Köln stand mir in mehreren Gesprächen Frau Dipl.-Inform. Hildegard Christ zur Seite. Die Beratung und Unterstützung der statistischen Auswertung der Studienergebnisse war für mich von großer Bedeutung. „Last but not least“ möchte ich meiner Kommilitonin Dr. Maike Porath, sowie meiner Mutter Klara Tuchscherer für das Korrekturlesen inklusive der Verbesserungsvorschläge danken.

Ich wünsche den Genannten alles Gute

Für Jessica, Franca, Silas und Maren

„Glücklich allein ist die Seele, die liebt.“

Johann Wolfgang von Goethe

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>- 12 -</b>
1.1	DIE WENDE IM KAMPF GEGEN KREBS?	- 12 -
1.2	LYMPHATISCHE NEOPLASIEN	- 14 -
1.2.1	Überblick	- 14 -
1.2.2	Immunologische Grundlagen	- 15 -
1.2.2.1	Hämatopoese	- 15 -
1.2.2.2	Unspezifisches Immunsystem	- 17 -
1.2.2.3	Spezifisches Immunsystem	- 19 -
1.2.3	Hodgkin und B-Zell-Lymphome	- 22 -
1.2.4	Chronische lymphatische Leukämie	- 24 -
1.3	MONOKLONALE ANTIKÖRPER	- 25 -
1.3.1	Bedeutung in der Medizin	- 25 -
1.3.2	Das Beispiel Rituximab in der Lymphomtherapie	- 27 -
1.4	DER HLA-DR ANTIKÖRPER 1D09C3	- 29 -
1.4.1	Entwicklung	- 29 -
1.4.2	Vorklinische Tests	- 30 -
1.4.3	Phase I Studie mit 1D09C3	- 32 -
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	- 33 -
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>- 35 -</b>
2.1	VERSUCHSDESIGN	- 35 -
2.2	MATERIAL	- 36 -
2.2.1	Antikörper	- 36 -
2.2.1.1	Protokoll 1	- 36 -
2.2.1.2	Protokoll 2	- 37 -
2.2.1.3	Testantikörper	- 37 -
2.2.2	Reagenzien und Gefäße zur Probenaufbereitung	- 38 -
2.2.3	Geräte und Software	- 39 -
2.3	METHODEN	- 40 -
2.3.1	Probengewinnung	- 40 -
2.3.2	Durchflusszytometrie	- 41 -
2.3.2.1	Die Bedeutung in der Medizin	- 41 -

2.3.2.2	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	- 42 -
2.3.2.3	Eingesetzte Fluorochrome und Antikörper	- 44 -
2.3.2.4	Datenverarbeitung und -darstellung	- 46 -
2.3.2.5	Probenaufbereitung	- 48 -
2.3.2.6	Absolutzählung	- 48 -
2.3.2.7	Messung nach Protokoll 1	- 49 -
2.3.2.8	Messung nach Protokoll 2	- 51 -
2.3.2.9	Analysetechniken	- 53 -
2.3.2.10	Auswertung der ermittelten Werte	- 57 -
<b>2.4</b>	<b>STATISTISCHE METHODEN</b>	<b>- 58 -</b>
2.4.1	Ermittlung der Absolutwerte der Zellpopulationen	- 58 -
2.4.2	Vergleich TruCOUNT®- und Zentrallaborwerte	- 59 -
2.4.3	Vergleich Zellreduktion Subpopulationen	- 59 -
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>- 60 -</b>
<b>3.1</b>	<b>PATIENTENCHARAKTERISTIKA UND STUDIENVERLAUF</b>	<b>- 60 -</b>
3.1.1	Klinische Charakteristika der Studienpatienten	- 60 -
3.1.2	Zusammenfassung der erreichten Testdosis, Verträglichkeit und des Therapieansprechens	- 61 -
<b>3.2</b>	<b>VERFÜGBARE BLUTPROBEN UND ETABLIERUNG DES TRUCOUNT®-VERFAHRENS</b>	<b>- 63 -</b>
3.2.1	Probenmaterial und Beobachtungszeitraum	- 63 -
3.2.2	Etablierung und Validierung des TruCOUNT®-Verfahrens	- 66 -
<b>3.3</b>	<b>LEUKOZYTEN UND IHRE SUBPOPULATIONEN VOR UND NACH 1D09C3-THERAPIE</b>	<b>- 69 -</b>
3.3.1	Exemplarischer Verlauf des Patienten C103	- 69 -
3.3.2	Reduktion von Leukozyten und deren Subpopulationen aller Patienten	- 77 -
3.3.3	Zeitliche Kinetik der Leukozyten und der Subpopulationen	- 83 -
3.3.4	Dosisabhängige Entwicklung der Leukozytensubpopulationen	- 88 -
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>- 94 -</b>
<b>4.1</b>	<b>BESONDERHEITEN IM PATIENTENKOLLEKTIV UND IM STUDIENDESIGN</b>	<b>- 94 -</b>
<b>4.2</b>	<b>HLA-DR ALS ZIELSTRUKTUR BEI LYMPHOPROLIFERATIVEN B-ZELL-NEOPLASIEN</b>	<b>- 94 -</b>
<b>4.3</b>	<b>ANALYSE DER ALLGEMEINEN SICHERHEIT UND VERTRÄGLICHKEIT VON 1D09C3</b>	<b>- 96 -</b>
<b>4.4</b>	<b>POTENTIELLE FEHLMESSUNGEN AUFGRUND METHODISCHER VERFAHREN</b>	<b>- 97 -</b>
<b>4.5</b>	<b>BEWERTUNG DER EFFEKTIVITÄT VON 1D09C3</b>	<b>- 99 -</b>
<b>4.6</b>	<b>BESONDERE ASPEKTE IN DER UNTERSUCHUNG VON 1D09C3</b>	<b>- 104 -</b>
4.6.1	Alternativhypothesen zur Apoptose bei 1D09C3	- 104 -

4.6.2	Gründe für den Studienabbruch	- 107 -
4.6.3	Durchführbarkeit des angewandten Therapiemonitoring	- 108 -
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>- 110 -</b>
<b>6</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>- 112 -</b>
<b>7</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>- 122 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABVD	Polychemotherapie (Adriamycin, Bleomycin, Vincristin und Dacarbazin)
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AML	Akute myeloische Leukämie
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin
APC-Cy7	Fluoreszenzfarbstoff Tandemkonjugat aus APC und Cyanin-7
BR	Therapieschema mit Bendamustin und Rituximab
bzw.	beziehungsweise
CD + Nummer	Cluster of Differentiation, s. Tab. 2, Kapitel 1.2.2.1
CHOP	Polychemotherapie, bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CR	komplette Remission, complete remission
d. h.	das heißt
DLT	Dosis limitierende Toxizität
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
ECD	Fluoreszenzfarbstoff „Energy coupled dye“, PE-TexasRed
EDTA	Antikoagulanzen Ethylendiamintetraacetat
EPICS <sup>®</sup>	Electronically Programable Individual Cell Sorter
Fab	Antigenbindungsstelle, engl. Fragment antigen binding
FACS <sup>®</sup>	Fluorescence activated cell sorting
FC	Therapieschema von Fludarabin mit Cyclophosphamid
FCR	Therapieschema FC ergänzt um Rituximab
FITC	Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
HAHA	Human Anti-Human Antibodies, humane Anti-Mensch Antikörper
HL	Hodgkin Lymphom
HLA	Humanes Leukozyten Antigen, syn. MHC
Inc.	englisch für Aktiengesellschaft/Firma
i. v.	intravenous
JNK-Kinase	intrazelluläre Signalkinase (c-Jun-N-terminale Kinase)

LPS	Lipopolysaccharid
m/sec.	Meter pro Sekunde
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
MHC	Major-Histocompatibility-Complex, Haupthistokompatibilitätsantigen syn. HLA
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MTD	maximal tolerable Dosis
NCAM	Neural cell adhesion molecule, Adhäsionsmolekül
NGF	Nerve Growth Factor, Nervenwachstumsfaktor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
ORR	Overall Response rate, gesamte Ansprechrate
Pat.	Patient
PC5	Fluoreszenzfarbstoff Tandemkonjugat aus PE und CY5
PD	progressive disease, Zunahme der Krankheit
PE	Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin
PE-Cy7	Fluoreszenzfarbstoff Tandemkonjugat aus PE und Cyanin-7
PerCP-Cy 5.5	Fluoreszenzfarbstoff Peridin- Chlorophyll-a-Proteinkomplex
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Kap.	siehe Kapitel
SD	stable disease, stabiler Krankheitsverlauf
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
vs.	versus, gegen
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter, 10 <sup>-6</sup> Liter
µm	Mikrometer, 10 <sup>-6</sup> Meter
7-AAD	Farbstoff 7-Aminoactinomycin

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Wende im Kampf gegen Krebs?

Krebs ist in den Industrienationen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesart. Bei einer für das Jahr 2006 geschätzten jährlichen Inzidenz von ca. 427.000 Menschen in Deutschland sterben über 210.000 Patienten jedes Jahr [5]. Das amerikanische National Cancer Institute (Bethesda, Maryland) hat die Mortalität von Krebserkrankungen von 1950 bis 2005 in Nordamerika verglichen. In dieser Statistik liegt die Sterblichkeitsrate im Jahre 1950 bei 195 pro Jahr und 100.000 Einwohnern und veränderte sich bis 2005 nur geringfügig auf 184 von 100.000 Einwohnern. In derselben Statistik wurde die 5-Jahres-Überlebenszeit verglichen. Diese lag gemittelt über alle Entitäten 1950-1954 bei 35% und stieg deutlich auf 68% in der Jahresspanne 1996-2004 [40]. Aus diesen Zahlen ist zu entnehmen, dass die onkologische Therapie zwar Fortschritte in Bezug des zeitlichen Überlebens macht, jedoch die Gesamtmortalität nahezu unverändert bleibt. Selbst die Verlängerung der Überlebenszeit ist nicht gesichert allein auf eine verbesserte Therapie zurück zu führen. Ein Teil davon bewirkt vermutlich der so genannte Lead-Time-Bias, der eine scheinbare Überlebenszeitverlängerung beschreibt, bei einer Vorverlegung des Diagnosezeitpunkts.

Insbesondere bei Betrachtung einzelner Krebsentitäten ist jedoch zu erkennen, dass auch die Mortalitätsraten sich zugunsten der Patienten verändern. Krebs ist eine Alterserkrankung. Durch die aktuelle demographische Entwicklung bei einer steigenden Lebenserwartung befinden sich mehr Menschen in einem Altersbereich mit sehr hohem Krebsrisiko. Dadurch steigen die absoluten Zahlen an Neuerkrankungen und Krankenstand. Dass dennoch die relative Krebsmortalität tendenziell sinkt, ist unter diesem Gesichtspunkt als ein positives Signal zu werten [9]. Entsprechend des jährlichen Berichts des amerikanischen National Cancer Instituts, war für das Berichtsjahr 2008 in Nordamerika erstmalig auch eine Abnahme der absoluten Zahl der Todesfälle durch Krebs erkennbar. Die Autoren des Berichts gehen davon aus, dass dieser langersehnte Trend auf eine Verbesserung der medizinischen Prävention, Diagnostik und Therapie zurück zu führen ist [43].

Dennoch konnten im Rahmen der therapeutischen Möglichkeiten bisher nur Teilerfolge erzielt werden, ein genereller Durchbruch erscheint noch weit entfernt. Die derzeitige Heilungsrate bei allen Krebserkrankungen, welche einem rezidivfreiem Überleben von mindestens 5 Jahren entspricht, liegt in Europa im Durchschnitt bei lediglich 30-40% [27].

Vor allem die Erforschung molekularer Grundlagen der Krebsentstehung ist ein derzeitiger großer Hoffnungsträger für eine zukünftig zielgerichtete Therapie von Krebs („targeted therapy“). Ein Vertreter dieser zielgerichteten Therapie ist das Forschungsobjekt der folgenden Arbeit – der monoklonale Antikörper. Dessen Herstellung gelang erstmalig in den späten 70er Jahren des letzten Jahrhunderts und begründete damit einen Wandel in der diagnostischen und therapeutischen Medizin [49]. Im April 2008 waren in den USA 21 monoklonale Antikörper zugelassen, wobei neun von diesen eine Zulassung in der onkologischen Therapie haben [66]. Über 100 weitere befinden sich zur Zeit in klinischer Prüfung und von diesen werden voraussichtlich mehrere in den nächsten Monaten bis Jahren der Therapie zur Verfügung stehen [72]. Bereits jetzt sind monoklonale Antikörper mit teils ansehnlichen Erfolgen ein fester Bestandteil in der Therapie verschiedener Erkrankungen geworden. Die nächsten Jahre werden zeigen, welchen Stellenwert die Antikörper und andere „targeted drugs“ in der Onkologie erlangen werden. Die Hoffnung ist jedoch groß, dass es sich im Zusammenspiel dieser medizinischen Erkenntnisse und Entwicklungen um die Wende im Kampf gegen den Krebs handelt.

## 1.2 Lymphatische Neoplasien

### 1.2.1 Überblick

Die pathogenetische Ursache lymphatischer Krebserkrankungen oder Neoplasien ist das bösartige und klonale Wachstum (Proliferation) einer dem lymphatischen System entstammenden Körperzelle. Entsprechend dieser Ursprungszelle, werden reifzellige lymphatische Tumore nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 in B- und T-Zell/Natürliche-Killerzell-Neoplasien, sowie in das Hodgkin Lymphom unterteilt [13]. Reifzellige lymphatische Neoplasien vom B-Zell-Typ und deren Behandlung stellen einen thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Die nach alter REAL Klassifikation [39] im klinischen Alltag noch gebräuchliche Unterscheidung des Hodgkin-Lymphoms von den sogenannten „Non-Hodgkin-Lymphome“ (NHL) mit indolenten und aggressiven Formen ist in der aktuellen WHO-Klassifikation nicht mehr enthalten. Zum vereinfachten klinischen Verständnis wird die Einteilung in dieser Arbeit jedoch noch verwendet. Zu der Gruppe der reifen B-Zell Neoplasien zählt neben dem Multiplen Myelom auch die Chronische lymphatische Leukämie (CLL) als wichtige Entität. Dabei wiesen beispielsweise die NHL in den vergangenen Jahrzehnten mit weltweiten jährlichen Zuwachsraten von 4,2% die deutlichste Inzidenzsteigerung aller hämatologischen Neoplasien auf und stellen somit eine zunehmende therapeutische Herausforderung dar [20].

Mit seinen zellulären und organischen Bestandteilen (Knochenmark, Lymphe, Lymphknoten und –gefäße und Milz) stellt das lymphatische System integrale Bestandteile des Immunsystems. Im Nachfolgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit relevanten zellulären und molekularen Grundlagen des Immunsystems und lymphatischer Tumorerkrankungen erläutert.

## 1.2.2 Immunologische Grundlagen

Das menschliche Immunsystem stellt aus evolutionärer Sichtweise eine Antwort gegen potentiell bedrohliche Infektionserreger dar. Darüber hinaus ist es in der Lage fehlerhaft veränderte Körperzellen zu zerstören. In der Krebsforschung wird zunehmend die Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung und Bekämpfung von malignen Neoplasien erkannt. Insbesondere wird große Hoffnung in die Entwicklung neuer, dem Immunsystem entlehnter Therapieansätze gesetzt, wie z. B. die Behandlung von Malignomen mit monoklonalen Antikörpern.

### 1.2.2.1 Hämatopoese

Ausgehend von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen werden postnatal im Knochenmark die Erythrozyten, Leukozyten und die Thrombozyten gebildet. Das rote Knochenmark eines Erwachsenen umfasst etwa 1,7 Liter und enthält  $10^{12}$  hämatopoetische Vorläuferzellen (davon sind  $10^6$ - $10^7$  Stammzellen). Es produziert ca.  $1,75 \times 10^{11}$  Erythrozyten und  $7 \times 10^{10}$  Leukozyten pro Tag [67]. Diese Kapazität kann bei Bedarf um ein Vielfaches erhöht werden. Die durchschnittliche Reifungsdauer der Leukozyten beträgt bei den Monozyten ca. 6 Tage, bei den Lymphozyten ca. 10 Tage und bei den Granulozyten ca. 12 Tage. Die Leukozyten haben einen Referenzbereich von 4.000-10.000 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut. Davon haben die neutrophilen Granulozyten mit 50-80% den größten Anteil, dem folgen die einzelnen Subpopulationen der Lymphozyten mit 25-40% und die Monozyten mit 2-8%. Es zirkulieren jedoch nur 4% der Lymphozyten im peripheren Blut, die restlichen befinden sich in den lymphatischen Organen [17]. Tabelle 1 zeigt die relative Verteilung der in den nachfolgenden Kapiteln näher beschriebenen Lymphozyten-Subpopulationen im Blut [37].

<b>Population</b>	<b>Relativer Anteil an Lymphozyten (%)</b>	<b>Absoluter Anteil an Lymphozyten (Zellen/<math>\mu</math>l)</b>
<b>Lymphozyten</b>		1.600-2.400
<b>B-Zellen (CD19+)</b>	11-16	200-400
<b>T-Zellen (CD3+)</b>	67-76	1100-1700
<b>T-Helfer-Zellen (CD4+)</b>	38-46	700-1100
<b>Zytotoxische T-Zellen (CD8+)</b>	31-40	500-900
<b>NK-Zellen (CD16/56+)</b>	10-19	200-400

Tab. 1, Anteil der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen im Blut, Angaben aus [37]

Die Oberflächenmoleküle der Leukozyten und anderer vorwiegend am Immunsystem beteiligter Zellen werden nach der CD-Klassifikation (Cluster of Differentiation) beziffert. Die Auflistung der 8. HLDA-Konferenz (Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens) in Adelaide/Australien vom Dezember 2004 beinhaltet 350 Antigene [92]. Man hat herausgefunden, dass sowohl unterschiedliche Kombinationen als auch variable Intensitäten, mit welcher solche Antigene auf der Zelloberfläche exprimiert werden, charakteristisch für bestimmte Zellen, wie z. B. oben genannte Lymphozyten-Subpopulationen, sind. Im Rahmen einer sogenannten „Immunphänotypisierung“ mittels Durchflusszytometrie können so verschiedene Zelltypen nachgewiesen und quantifiziert werden. Nachfolgende Tabelle 2 beschreibt die Funktion und das Vorkommen der Antigene, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

<b>Antigen</b>	<b>Expression</b>	<b>Funktion</b>
<b>CD3</b>	T-Zellen	T-Zell-Rezeptor assoziiert, Signaltransduktion
<b>CD4</b>	T-Zellen, Monozyten, myeloische Vorläuferzellen	Korezeptor für MHC-II-Moleküle, HIV-Rezeptor
<b>CD8</b>	zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen	Korezeptor für MHC-I-Moleküle
<b>CD14</b>	Monozyten, schwach Granulozyten	Lipopolysaccharid-Rezeptor (LPS)
<b>CD16</b>	NK-Zellen, Makrophagen	Fcγ-Rezeptor IIIa
<b>CD19</b>	Pan-B-Zellantigen	B-Zell-Aktivierung und Differenzierung
<b>CD20</b>	B-Zellen	B-Zell-Aktivierung und Reifung
<b>CD45</b>	Pan-Leukozyten-Antigen	Tyrosinphosphatase
<b>CD56</b>	NK-Zellen, T-Zellen	Adhäsionsmolekül NCAM

Tab. 2, Funktion und Vorkommen der verwendeten CD-Antigene

### 1.2.2.2 Unspezifisches Immunsystem

Das Immunsystem kann vereinfacht in einen angeborenen (unspezifischen) und in einen erworbenen (spezifischen) Teil unterschieden werden. Beide Bereiche beinhalten humorale und zelluläre Komponenten. Obwohl die meisten Aktivitäten des Immunsystems synergistisch beide Anteile enthalten, wird im Folgenden diese übersichtliche Gliederung verwendet. Das unspezifische Immunsystem ist die entwicklungsgeschichtlich ältere Abwehrmaßnahme. Sie erfolgt als erste und sehr schnelle Reaktion, unabhängig von dem jeweils eindringenden Erreger. Es findet lediglich eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd statt. Einen ersten Schutz stellen die physikalischen und chemischen Barrieren des Menschen dar. Den größten humoralen Anteil stellt das Komplementsystem dar. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von über 30 Plasmaproteinen, welche

kaskadenförmig aktiviert werden. Es werden ein klassischer antikörperabhängiger und ein alternativer direkter Aktivierungsweg unterschieden. Als Zieleffekt steht am Ende beider Kaskaden die direkte Zellyse durch Porenbildung. Der zelluläre Anteil des unspezifischen Immunsystems wird durch die phagozytierenden Zellen wie Granulozyten und Makrophagen, sowie durch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dargestellt.

#### 1.2.2.2.1 Granulozyten

Es werden neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterschieden. In ihrem Zytoplasma befinden sich Vesikel (Granula), welche z. B. Histamin enthalten und freigesetzt werden können. Andere lysosomale Vesikel beinhalten aggressive Enzyme, die zur Zersetzung der phagozytierten Strukturen benötigt werden. Ihre Lebensdauer beträgt etwa 2-3 Tage, der Abbau erfolgt im mononukleären Phagozytensystem (MPS, vorwiegend Makrophagen). Die neutrophilen Granulozyten stellen mit ca. 90% die größte Teilpopulation dar. Sie sind die ersten Zellen die im Rahmen einer Entzündungsreaktion durch Zytokine aktiviert das Blut verlassen und in das betroffene Gewebe einwandern. Eosinophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten und sind ebenso wie basophile Granulozyten an allergischen Reaktionen beteiligt. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems haben zur Eliminierung von Fremdstrukturen und zur allgemeinen Aktivierung verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche und im Zytosol. An diesen können zum Beispiel Antikörper oder Komplementfaktoren binden und dadurch Zielstrukturen aufgenommen werden.

#### 1.2.2.2.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten haben im Blut nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden, da sie sich im Gewebe rasch weiter differenzieren. Sobald Monozyten das Blut verlassen, werden sie Makrophagen genannt. Es gibt mehrere separate Bezeichnungen für ortständige Makrophagen, wie z. B. die Alveolärmakrophagen, die Kupffer-Sternzellen der Leber oder die Mikrogliazellen im ZNS. Die Makrophagen sind bei Entzündungsgeschehen nach den neutrophilen Granulozyten die zeitlich folgenden phagozytierenden Zellen. Diese eliminieren die restlichen Erreger, Abfallprodukte, apoptotische Zellen sowie die Granulozyten selbst. Monozyten und Makrophagen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC), welche im Rahmen einer spezifischen Immunantwort eine Aktivierung von T-Zellen bewirken. Als

Rezeptor für das Lipopolysaccharid von Bakterien ist das Oberflächenmolekül CD14 in hoher Dichte auf peripheren Monozyten vorhanden. Aufgrund des Verhältnisses von Größe und Granulation können Monozyten jedoch auch ohne einen Marker (z. B. Antikörper gegen CD14) in der Durchflusszytometrie erfasst werden.

#### 1.2.2.2.3 NK-Zellen

Die erst 1975 entdeckten Natürlichen Killerzellen können als „Grenzgänger“ zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem bezeichnet werden [47]. Aufgrund einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark werden sie den Lymphozyten zugeordnet. Ihre Halbwertszeit liegt zwischen 7 und 10 Tagen. Natürliche Killerzellen suchen die Oberflächen von Zellen nach MHC-Klasse-I-Molekülen ab und prüfen eine Rezeptorbindung. Dabei führt eine Veränderung in der Anzahl oder in der Struktur von MHC-Antigenen zu einer Bindung an einen spezifischen Rezeptor. Vor allem die Entartung der Zelle geht oftmals mit einer veränderten MHC-Expression einher. Nach einer Aktivierung schüttet die NK-Zelle zytotoxisches Granula aus, welche in die Zielzelle eindringen und einen Apoptosevorgang auslösen. NK-Zellen exprimieren unter anderem das Adhäsionsmolekül CD56 und den als CD16 bezeichneten Rezeptor für den Fc-Teil von Immunglobulinen des Typs IgG. Bei Bindung eines Antikörpers mit einer verbundenen Zielzelle an CD16 kommt es zu einer weiteren Aktivierung der NK-Zelle mit Zytokinausschüttung. Dadurch wird im Rahmen der ADCC-Reaktion (Antibody dependent cellular cytotoxicity) eine Apoptose ausgelöst. Da die NK-Zellen lediglich etwas größer als T-/B-Lymphozyten sind, werden in der Durchflusszytometrie Antikörper gegen CD56 und CD16 als Marker zur Bestimmung und Quantifizierung verwendet.

#### 1.2.2.3 **Spezifisches Immunsystem**

Das erworbene Immunsystem bewirkt ein spezifisches Erkennen von Antigenen, welches in der Regel synergistisch und parallel zu den unspezifischen Mechanismen erfolgt. Für die Bindung an Fremdstoffen stehen Rezeptoren zur Verfügung, welche bis zu  $10^{15}$  verschiedene Antigene erkennen können. Die Induktion einer effektiven spezifischen Immunantwort benötigt ca. 7-10 Tage. Nach diesem Erstkontakt werden Gedächtniszellen gebildet, welche bei einem erneuten Kontakt deutlich schneller reagieren können. Zu dem

erworbenen Immunsystem zählt man die Antigenpräsentierenden Zellen, die B- und T-Lymphozyten sowie die von reifen B-Zellen sezernierten Antikörper.

#### 1.2.2.3.1 Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Es handelt sich hierbei um phagozytierende Zellen, welche die aufgenommenen Stoffe zerlegen und kleine Bruchstücke davon auf ihrer Oberfläche mittels MHC-Klasse-II-Molekülen binden können. Nach der Phagozytose wandern die APCs in die Lymphknoten und in andere sekundäre lymphatische Organe und präsentieren dort die Antigene an T-Helfer-Zellen. Zu diesen professionellen antigenpräsentierenden Zellen gehören die dendritischen Zellen, die Monozyten und Makrophagen sowie die B-Lymphozyten.

#### 1.2.2.3.2 T-Zellen

Die T-Lymphozyten wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark zur Ausreifung in den mediastinal gelegenen Thymus. In diesem primären lymphatischen Organ wird der T-Zell-Rezeptor Antigen-spezifisch ausgebildet. Es werden die T-Lymphozyten mittels Selektion eliminiert, welche autoaggressiv gegen Selbst-Antigene gerichtet sind. Des Weiteren erfolgt die Differenzierung zur T-Helfer-Zelle oder zur zytotoxischen T-Zelle. Sie verlassen nach ca. vier Wochen Ausreifung als naive T-Zellen ohne einen bisherigen Antigenkontakt den Thymus um sich vorwiegend in sekundäre lymphatische Organe aufzuhalten.

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) gehört genetisch zur Familie der Immunglobuline und ist entsprechend ähnlich aufgebaut. Als Unterscheidung kann er jedoch nur solche Antigene binden, die durch ein körpereigenes MHC-Molekül präsentiert werden. Der variable Teil des Rezeptors wird ähnlich wie bei dem B-Zell-Rezeptor und den Antikörpern mittels genetischen Rekombinationen hergestellt. Dadurch entsteht eine Variabilität des T-Zell-Rezeptors mit  $10^{15}$  verschiedenen Bindungsmöglichkeiten an Antigene. Jeder Rezeptor ist daher einzigartig in seiner Spezifität für ein bestimmtes Epitop eines Moleküls. Das Oberflächenantigen CD3 ist eine Molekülgruppe, welche eng mit dem TCR in Verbindung steht. Zusammen erfüllen sie die Funktion der Bindung an MHC-Moleküle sowie die Signaltransduktion ins Zellinnere.

Es werden zwei MHC-Moleküle unterschieden und als Klasse I und II bezeichnet. Auf allen nukleären Körperzellen befindet sich das MHC-Klasse-I-Molekül. An diesem werden Peptide gebunden, die von zytoplasmatischen Proteinen stammen. Diese werden zuvor intrazellulär

durch Proteasome in Fragmente zerlegt, die aus 8-20 Aminosäuren bestehen. Es werden neben normalen Zellproteinen auch solche abgebaut, die von intrazellulären Bakterien und Viren oder von maligne entarteten Zellen stammen. Spezifische zytotoxische T-Zellen besitzen als Antigen das CD8-Molekül zur Erkennung von MHC-Klasse-I an ihrer Oberfläche. Aktivierte zytotoxische T-Zellen können unter anderem mittels Perforinen einen Apoptosevorgang in der gebundenen Zielzelle auslösen und bewirken so deren Elimination. Die MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen befinden sich nur auf den professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Es werden exogen aufgenommene Proteine intrazellulär in sogenannten „Endosomen“ verdaut und als Peptide an das Molekül gebunden. Die Präsentation erfolgt an T-Helfer-Zellen, die neben dem TCR als Co-Rezeptor das Oberflächenantigen CD4 tragen. Aktivierte T-Helfer-Zellen differenzieren sich weiter in so genannte TH1- oder TH2-Zellen und proliferieren in viele Zellklone. Die TH1-Zellen verstärken dabei mittels Zytokine eine zelluläre Immunantwort und die TH2-Zellen stimulieren in den für das Antigen spezifischen B-Zellen eine Antikörperproduktion.

#### 1.2.2.3.3 B-Zellen

Die Entwicklung der B-Lymphozyten erfolgt beim Menschen postnatal im Knochenmark. Sie wandern von dort in die sekundären lymphatischen Organen und können mit ihrem B-Zell-Rezeptor (BCR) ebenso wie die T-Zellen spezifisch an Antigene binden. Diese müssen jedoch nicht wie bei T-Zellen auf MHC-Molekülen präsentiert werden, sondern es können auch lösliche Antigene erkannt und über Endozytose aufgenommen werden. Nach einem Erstkontakt bilden die aktivierten B-Lymphozyten Zell-Klone und differenzieren sich zu Effektorzellen und Gedächtniszellen. Dabei benötigen sie zur vollständigen Differenzierung Signale von passenden T-Helfer-Zellen. Da die B-Zellen selbst antigenpräsentierende Zellen sind, können sie über präsentierte Bruchstücke der aufgenommenen Antigene direkt ihre benötigten T-Zellen aktivieren. Die als Plasmazellen bezeichneten reifen B-Zellen sezernieren Antikörper als lösliche B-Zell-Rezeptoren und gewährleisten im Rahmen der spezifischen Immunreaktion dadurch den humoralen Anteil.

Der B-Zell-Rezeptor (BCR) erlangt seine hohe Spezifität für Antigene analog zu dem T-Zell-Rezeptor durch somatische Immunglobulinen-Rekombination. Im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor durchläuft der BCR noch eine weitere Spezifizierung. Im Rahmen der Aktivierung von B-Zellen entstehen weitere Mutationen der Antigenbindungsstelle. Diese Hypermutationen selektieren die B-Zellen, welche die höchste Affinität zum Antigen

entwickeln. Die anderen B-Zellen werden mittels Apoptose negativ selektiert. Durch diesen weiteren Reifungsprozess wird die spezifische Immunreaktion im Verlauf wirkungsvoller.

Die Plasmazellen produzieren als primäre B-Zell-Antwort das Immunglobulin IgM. Diese Antikörper haben jedoch nur eine geringe Affinität zum Antigen. Der Antikörper IgM liegt jedoch als Pentamer vor und kann daher sehr gut an repetitive Strukturen wie das Lipopolysaccharid oder Kapselstrukturen von Bakterien binden. Im Rahmen einer Keimzentrumreaktion entwickeln sich die B-Zellen mit Hilfe von T-Helfer-Zellen in den Lymphfollikeln weiter. Sie können nun durch den so genannten Immunglobulin-Switch Antikörper anderer Klassen produzieren. Das Immunglobulin IgG kommt mit 80% der Antikörper am Häufigsten im Serum vor. Es werden vier Subtypen (IgG1-4) unterschieden, welche sich durch verschiedene Erregerspektren unterscheiden. So sind beispielsweise IgG1 und IgG3 stärker gegen Bakterien wirksam und können effektiv eine Komplementreaktion auslösen. Das Immunglobulin IgG2 wirkt hingegen spezifischer auf Viren. Als weitere humane Antikörper sind IgE, IgA und IgD zu nennen, auf welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Bei den B-Lymphozyten ist das Oberflächenmolekül CD19 spezifisch und ab der Pro-B-Zelle bis zur vollständigen Differenzierung nachweisbar. Die Funktion liegt in der Modulation der Signalübertragung vom BCR ins Zytoplasma. Das weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antigen ist das CD20, ein mit dem Zytoskelett verbundener Ionenkanal. Die Nachweiseigenschaften sind dem CD19 ähnlich, jedoch kommt das Molekül erst ab dem Entwicklungsstadium der Prä-B-II-Zelle vor. Es existieren viele weitere Antigene, mit denen einzelne Entwicklungsstufen oder Erkrankungen nachgewiesen werden können. Dazu gehört zum Beispiel das T-Zell-assoziierte Differenzierungsantigen CD5, welches auf entarteten B-Zellen der CLL vorkommt.

### **1.2.3 Hodgkin und B-Zell-Lymphome**

Das Hodgkin-Lymphom hat eine jährliche Inzidenz in Europa von 2,2 pro 100.000 Personen [23]. In der Histologie des entnommenen Lymphknotens können mikroskopisch die pathognomonischen Sternberg-Reed-Zellen erkannt werden. Diese malignen Zellen stammen den B-Lymphozyten ab und sind im Lymphom umgeben von einer großen Anzahl an reaktiven CD4-T-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Fibroblasten. In dem Lymphom kann in bis zu 50% der Fälle das Epstein Barr Virus nachgewiesen werden, beim mischzelligen Typ und in den Entwicklungsländern liegt eine EBV Assoziation noch häufiger

vor [8]. Die vollkommene Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist jedoch noch nicht geklärt. Das 5-Jahres-Überleben liegt heutzutage durch die angewandte Polychemotherapie, z. B. nach dem ABVD Schema, bei über 85% [18]. Die Komplexität der Therapie des Morbus Hodgkin und die daraus resultierenden Heilungserfolge verdeutlichen die Notwendigkeit, Patienten selteneren Erkrankungen in bundesweite Protokolle (z. B. der Deutschen Hodgkin Studiengruppe) einzuschließen. Nur so kann eine optimale Therapie möglichst individuell nach Maßgaben einer evidenzbasierten Medizin ermittelt werden.

Die jährliche Inzidenz der Non-Hodgkin-Lymphome ist vom Subtyp abhängig und liegt nach alter Klassifikation für alle NHL (B- und T-Zell Typ) bei ca. 20 Erkrankungen pro 100.000 Personen [20]. Die Ätiologie der NHL ist ebenfalls weitgehend unklar. Es tritt jedoch gehäuft nach einer Strahlungs- oder Zytostatikatherapie und vor allem bei HIV-Infektionen mit einer deutlich erhöhten Inzidenz auf. Bei einigen Formen konnten charakteristische genetische Veränderungen in den Tumorzellen festgestellt werden (z. B. Translokation zwischen Chromosom 11 und 14 beim Mantelzell-Lymphom mit Überexpression des Cyclin D1 Gens [21]), es ist jedoch umstritten, ob sie allein kausal erklärend für die Erkrankungsentstehung sind. Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung steigt analog zu den meisten anderen malignen Erkrankungen mit zunehmendem Lebensalter. Eine klinisch gebräuchliche Unterscheidung von NHL ist nach aggressiven (schnell wachsend, hoch maligne) und nach indolenten (langsam wachsend, niedrig maligne) Formen zu treffen. Der wichtigste Vertreter der niedrig malignen Gruppe vom B-Zell Typ ist das folliculäre Lymphom mit einer langsamen Progredienz und einem Anteil von ca. 25% der Non-Hodgkin-Lymphome [76]. Bei den meisten Patienten liegt ein fortgeschrittenes Stadium vor, bei denen eine zytostatischer Therapie nach palliativen Gesichtspunkten zur Lebensverlängerung und Symptomkontrolle erfolgt [22]. In Kombination unter Einbeziehung von Rituximab können Ansprechraten von 80% und komplette Remissionen von 40% erzielt werden [57]. Als wichtigster Vertreter der aggressiven NHL ist das diffuse großzellige B-Zell Lymphom zu nennen, welches ca. 21% der Non-Hodgkin-Lymphome ausmacht [76]. Die seit 1976 eingesetzte Polychemotherapie CHOP [59], heutzutage in Kombination mit dem seit einigen Jahren verfügbaren CD20-Antikörper Rituximab („Immunochemotherapie“) ist als ein Goldstandard für die aggressiven B-Zell Lymphome anzusehen [26]. Bei Patienten in der Altersgruppe von 18-60 Jahren mit maximal einem Risikofaktor wurden bei den hochaggressiven Lymphomen mit R-CHOP ein 3-Jahres-rezidivfreies Überleben von 79% und ein Gesamtüberleben nach drei Jahren von sogar 93% erzielt [69]. Bei älteren Patienten (61-80 Jahre) liegt das 3-Jahres-rezidivfreie Überleben nach R-CHOP bei 66,5% und das Gesamtüberleben nach drei Jahren bei 78,1% [68].

#### 1.2.4 Chronische lymphatische Leukämie

Die CLL gehört zur Untergruppe der niedrig malignen B-Zell-Lymphome. Sie ist in der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 3,8 pro 100.000 Personen und einer zunehmenden Inzidenz im höheren Lebensalter die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter und bildet einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit [19]. Es handelt sich um eine klonale Proliferation von immuninkompetenten B-Lymphozyten. Die Ätiologie ist unbekannt, es wird jedoch unter anderem eine genetische Prädisposition vermutet. Im Gegensatz zum Hodgkin und den meisten NHL, kann die Diagnose über das periphere Blut gestellt werden, wobei mehr als 5.000/ $\mu$ l klonale B-Lymphozyten mit einem typischen Antigenmuster in der Immunphänotypisierung vorliegen müssen [34, 35]. Die CLL kann nach Binet in drei verschiedene Stadien eingeteilt werden, woraus neben einer Therapieindikation auch eine prognostische Einschätzung des Krankheitsverlaufes erfolgt. So wird bei dem oftmaligen Zufallsbefund eines Stadium Binet A eine mittlere Lebenserwartung von 8,3 Jahren beobachtet. Dagegen besteht bei Stadium Binet C mit verstärkter Knochenmarkinsuffizienz eine deutlich verminderte mittlere Lebenserwartung von 3,8 Jahren [7]. Eine Therapie erfolgt im Stadium Binet C und bei symptomatischen oder progredienten Verläufen der Stadien A und B, wobei die Deutsche CLL Studiengruppe (DCLLSG) alters- und risikoadaptierte Therapieprotokolle empfiehlt [34]. Eine Heilung der Erkrankung ist nur durch eine allogene Stammzelltransplantation möglich. Die anderen therapeutischen Optionen sind als palliative Maßnahmen einer chronischen Erkrankung anzusehen. Die am längsten eingesetzte zytostatische Substanz ist das Alkylanz Chlorambucil, welches seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts vorwiegend mit Prednisolon verabreicht wird. Aktueller Standard für die Erstlinientherapie bei Patienten ohne relevante Begleiterkrankungen ist das Purinanalogon Fludarabin, in Kombination mit dem Alkylanz Cyclophosphamid und dem Antikörper Rituximab (FCR) [46]. Mit diesem Therapieschema einer Immunochemotherapie konnte bei 87% der Patienten erstmals ein Überlebensvorteil für behandelte CLL Patienten im Vergleich zu einem Gesamtüberleben nach drei Jahren von 83% bei alleinigen Chemotherapie mit FC erreicht werden [36].

Sowohl für Hodgkin- als auch Non-Hodgkin Lymphome und die CLL ist die Auswahl der Folge-Therapie im Falle eines frühzeitigen Progresses oder Rezidivs schwierig und wird individuell gestellt. Obwohl mit oben erwähnten Kombinationsschemata in der Erstlinientherapie mittlerweile hohe Ansprechraten erzielt werden, ist die Aussicht auf eine langfristige Remission nach einem frühzeitigen Progress oder Rezidiv bei praktisch allen

Lymphom-Entitäten und der CLL äußerst reduziert. Verschiedenste Faktoren, wie z. B. biologisches Alter, Komorbidität, Verträglichkeit der Ersttherapie und erkrankungsspezifische prognostische Faktoren (z. B. genetische oder Serum-Marker) müssen hier berücksichtigt werden [33]. Bei einer längeren Remission nach Erstlinientherapie kann beispielsweise diese wiederholt werden. Im Falle der NHL und CLL stehen als weitere Möglichkeiten z. B. Bendamustin als Mono- oder Kombinationstherapie mit Rituximab oder der monoklonale CD52-Antikörper Alemtuzumab zur Verfügung. Als neueres orales Medikament ist das Thalidomid-Analogon Lenalidomid zu nennen, welches in mehreren Studien eine vielversprechende Wirksamkeit in der CLL zeigte [31]. Die Problematik in der Rezidivtherapie zeigt deutlich, dass effektive neue Medikamente für Lymphome und CLL benötigt werden. Im Rahmen dieser Bemühungen befinden sich viele neuartige Substanzen aus der Gruppe der zielgerichteten Therapien in präklinischen und klinischen Untersuchungen.

### **1.3 Monoklonale Antikörper**

#### **1.3.1 Bedeutung in der Medizin**

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Reagenzglas ist für die heutige Medizin sehr bedeutend. Das Prinzip der so genannten Hybridom-Technik ist von Köhler und Milstein 1975 publiziert worden [49], wofür sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten [83]. Bei dieser Technik wird zuerst eine Maus mit dem gewünschten Zielantigen immunisiert. In der Maus werden als Immunreaktion B-Lymphozyten gebildet, welche dieses Antigen erkennen können. Es folgt eine Entnahme der Milz, in welcher sich besonders viele B-Zellen aufhalten. Die entsprechenden B-Zellen werden isoliert und mit Plasmazellen aus einem Plasmazytom fusioniert. Dadurch entstehen Hybridomzelllinien, welche gegen das gewünschte Antigen Antikörper bilden und ein unbegrenztes Wachstum im Reagenzglas ermöglichen. Die produzierten monoklonalen Antikörper können regelmäßig aus dem Kulturüberstand ab pipettiert und aufgereinigt werden. Da diese Antikörper ursprünglich aus einer Mäusezelle entstammen, werden sie als murine Antikörper bezeichnet. Sie haben den Nachteil, dass sie bei einer therapeutischen Anwendung im Menschen dadurch oftmals als unerwünschte Nebenwirkungen allergische Reaktionen auslösen. Des Weiteren werden die Antikörper einer fremden Spezies oftmals durch humane „Anti-Maus“-Antikörper schnell eliminiert [81].

Den ersten murinen monoklonalen Antikörpern folgten technische Weiterentwicklungen mit chimären Antikörpern. Bei diesen Immunglobulinen ist mittels rekombinanter DNA-

Technologie ein Großteil der Struktur bereits menschlichen Ursprungs, das antigenbindende Fab-Fragment ist jedoch von der Maus [44]. Als nächste Stufe kamen die humanisierten Antikörper, bei welchen lediglich die hypervariable Regionen des Fab-Fragmentes murinen Ursprungs sind. Die neueste Entwicklung in diesem Bereich sind die humanen Antikörper, die vollständig menschlichen Ursprungs sind.

In der Terminologie der therapeutischen Wirkstoffnamen ist die Herkunft zu erkennen. Alle monoklonale Antikörper enden mit dem Suffix –mab und die murinen Immunglobuline enden auf –omab. Dabei war der Antikörper Muromonab-CD3 mit dem Handelsnamen OKT3<sup>®</sup> der weltweit erste mit der Zulassung im Jahr 1986 [1]. Der Name war noch nicht konform mit der beschriebenen Klassifikation, die erst danach entstanden ist. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper des Typs IgG2a, welcher an das Oberflächenmolekül CD3 auf T-Lymphozyten bindet und bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen eingesetzt werden kann. Die chimären Antikörper dagegen enden auf –ximab, exemplarisch wird der bereits 1997 zugelassene Antikörper Rituximab genannt. Dieser bindet an den CD20-Rezeptor auf B-Lymphozyten und hat bei B-Zell lymphoproliferativen Erkrankungen eine große Bedeutung erlangt. In der Weiterentwicklung folgten die humanisierten monoklonalen Antikörper mit der Endung –zumab. Im Dezember 1997 erfolgt für das Präparat Daclizumab erstmalig eine Zulassung aus dieser Gruppe [86]. Der IgG1 Antikörper bindet an den Interleukin-2-Rezeptor (CD25) auf T-Lymphozyten und wird bei einer Nierentransplantation zur Verhinderung von akuten Abstoßungsreaktionen angewendet. Des Weiteren kann Daclizumab mit dem radioaktiven Stoff Yttrium<sup>90</sup> markiert werden und zeigt als Radioimmuntherapie bei Patienten mit einer T-Zell-Leukämie ein klinisches Ansprechen [86]. Zur kompletten Vermeidung von Reaktionen mit Anti-Maus-Antikörpern wurden vollständig humane Antikörper entwickelt, dessen Wirkstoffnamen auf das Suffix –umab enden. Der erste Vertreter dieser Klasse ist der seit Ende 2002 zugelassene Antikörper Adalimumab [54]. Es handelt sich hierbei auch um den Antikörper-Subtyp IgG1, welcher gegen den Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) wirkt und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird.

Zur Herstellung von humanen Antikörpern ist die Hybridomtechnik nicht mehr geeignet. Zum einen verbietet sich die Beimpfung von Probanden und zum anderen könnten auch kaum Antikörper gebildet werden, die gegen körpereigene Strukturen wirken. Daher wird zumeist mit Hilfe der so genannten Phagen-Display-Technologie gearbeitet, welche mittels Gentechnik komplett humane Antikörper produzieren kann. Im ersten Schritt wird hierbei aus humanen Plasmazellen DNA entnommen, welche für die Antikörperproduktion notwendig ist.

Diese wird in Phagen (Viren die Bakterien befallen) kloniert, die auf ihrer Oberfläche die verschiedenen Fab-Fragmente exprimieren. So entstehen Genbibliotheken, welche ein milliardenfaches Repertoire analog zum menschlichen Körper beinhalten. Darüber hinaus können Genabschnitte eingefügt und so gezielt das gewünschte Fab-Fragment synthetisiert werden. In dem so genannten Biopanning werden fest fixierte Antigene, an welche die zu gewinnenden Antikörper binden sollen, mit den Phagen inkubiert. Die gebundenen Phagen können isoliert und die entsprechenden Antikörpergene sequenziert werden. Mehrere Firmen bieten inzwischen für nahezu jedes Antigen die Herstellung von rekombinaten Antikörper an.

Monoklonale Antikörper werden in vielen Bereichen angewendet. Zum Einsatz kommen sie in der analytischen Grundlagenforschung, beim Drug-Monitoring, zur Tumordiagnose und -überwachung (z. B. Tumormarker) und in der mikrobiologischen Diagnostik. Im Rahmen des experimentellen Teils dieser Arbeit wird auch verdeutlicht, dass sie zur Differenzierung der Zellpopulationen und für Rückschlüsse auf Immunreaktionen sehr bedeutsam sind. Wie bereits bei den oben genannten Beispielen erkennbar, gewinnen die monoklonalen Antikörper zunehmende Bedeutung in der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen. In der Onkologie ist das Ziel die Zerstörung von Tumorzellen und es gibt verschiedene Ansätze, wie monoklonale Antikörper das ermöglichen können. Es können Oberflächenstrukturen als Antigene ausgewählt werden, die zum einen möglichst spezifisch auf den Tumorzellen exprimiert werden und zum anderen eine Apoptose auslösende Rezeptorfunktion haben. Des Weiteren können die Antikörper mit einem Zellgift oder mit einem Radionukleotid gekoppelt werden. Der erste monoklonale Antikörper mit einem Radionukleotid ist das in den USA 2002 zugelassene Medikament Ibritumomab tiuxetan [88], eine europäische Zulassung erfolgte im Jahr 2004. Es handelt sich hierbei um einen murinen Antikörper des Typs IgG1, der an CD20 von B-Lymphozyten bindet. Als Konjugat ist das radioaktive Isotop <sup>90</sup>Yttrium oder <sup>111</sup>Indium gebunden, wodurch die Zielzellen und die direkte Umgebung über längere Zeit einer hochenergetischen  $\beta$ -Strahlung ausgesetzt wird.

### **1.3.2 Das Beispiel Rituximab in der Lymphomtherapie**

Der chimäre monoklonale Antikörper Rituximab wurde im Jahr 1997 zugelassen und war der erste therapeutische Antikörper bei Krebserkrankungen. Die Antigenbindungsstellen interagieren mit dem CD20-Rezeptor auf B-Lymphozyten. Dadurch werden Ionenkanäle blockiert und die Zelllyse mittels Apoptose ausgelöst. Als weiterer Mechanismus wird

Komplement aktiviert und zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) durch NK-Zellen und Monozyten induziert [77].

Rituximab wird vorwiegend bei B-Zell Neoplasien eingesetzt, bei denen es mehrfach die Therapiestandards revolutioniert hat. Meist wird es in Kombination mit einer Polychemotherapie (z. B. mit CHOP) verabreicht. In der RICOVER 60 Studie wurde bei 1.222 Patienten mit einem aggressiven Non-Hodgkin Lymphom das alleinige CHOP-Schema und die Kombination mit Rituximab (R-CHOP) verglichen. Dabei erzielte die 6-wöchige R-CHOP Therapie ein 3-Jahres-rezidivfreies Überleben von 66,5% und die alleinige CHOP-Therapie über 6 Wochen das signifikant schlechtere Ergebnis von 47,2% [68]. Des Weiteren kann Rituximab beim follikulärem NHL neben der Erstlinientherapie auch als Erhaltungstherapie eingesetzt werden und verringert dadurch die Rezidivrate [55]. Eine Einschränkung der Lebensqualität konnte bei dieser Indikation im Rahmen einer kontrolliert randomisierten Studie mit 122 Patienten nicht festgestellt werden [89]. Wie oben bereits beschrieben wird Rituximab auch bei der Chronischen lymphatischen Leukämie eingesetzt. Die randomisierte Studie CLL8 der Deutschen CLL Studiengruppe verglich an 817 Patienten mit bisher unbehandelter CLL den bisherigen Standard von Fludarabin und Cyclophosphamid (FC) mit der Kombination von FC und Rituximab. Dabei erzielte die Immunochemotherapie mit Rituximab ein progressionsfreies Überleben nach drei Jahren von 65% im Gegensatz zur reinen Chemotherapie von 45% und verbesserte erstmalig das Gesamtüberleben [36].

Mit Rituximab kommt es bei ca. 77% der Patienten zu unerwünschten Nebenwirkungen (Fieber, Schüttelfrost, Hautausschläge, Atembeschwerden), davon haben ca. 10% ein schwerwiegendes Erscheinungsbild [16]. Diese Reaktion wird vermutlich durch freigesetzte Zytokine der zerfallenden Tumormasse hervorgerufen werden und kann in ihrer Häufigkeit und Bedrohung durch eine antiallergische Prämedikation verringert werden. Des Weiteren wird neben der zunächst erwünschten Elimination der entarteten B-Zellen insbesondere bei Anwendung als Kombinationstherapie häufig das gesamte Knochenmark supprimiert und somit die Anfälligkeit für Infektet erhöht. In einigen Fällen kam es zu der zumeist tödlich verlaufenden Virusinfektion PML (progressiven multifokalen Leukenzephalopathie) [28].

## 1.4 Der HLA-DR Antikörper 1D09C3

### 1.4.1 Entwicklung

Der monoklonale humane Antikörper 1D09C3 wurde von der Firma GPC Biotech AG in Martinsried bei München entwickelt und hergestellt. Es handelt sich um einen Antikörper des Typs IgG4. Bei dem Subtyp IgG4 wird aufgrund der fehlenden Komplementaktivierung eine Verringerung der infusionsbedingten Nebenwirkungen erwartet. Das Fab-Fragment von 1D09C3 ist gegen ein Epitop auf dem Oberflächenmolekül HLA-DR gerichtet. Der Begriff HLA steht für das Humane Leukozytenantigen System und ist gleichzusetzen mit den MHC-Molekülen. Bei HLA-DR handelt es sich um eine Unterform von MHC II, welches sich auf antigenpräsentierenden Zellen findet.

Die Herstellung von 1D09C3 erfolgte in Phagen-Displays und die Bindungsstelle wurde in der Genbibliothek HuCAL<sup>®</sup> (Human Combinatorial Antibody Library [48]) der Firma MorphoSys AG in Martinsried erstellt. Die Genehmigung als europäisches Arzneimittel für 1D09C3 erfolgte im August 2003. Die erste Phase I Studie startete im Frühjahr 2005 im Onkologischen Institut der italienischen Schweiz (IOSI, Bellinzona, Leitung Professor Michele Ghilmini). Ein weiteres Studienzentrum wurde im Sommer 2005 in Mailand am „Istituto Nazionale dei Tumori“ unter Leitung von Herrn Professor Luca Gianni eröffnet. Im November 2005 erhielt GPC Biotech seitens des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) die Genehmigung für eine Phase I Studie in Deutschland. Diese dritte europäische Phase I Studie von 1D09C3 an der Universitätsklinik Köln unter Leitung von Herrn Professor Michael Hallek konnte im Februar 2006 den ersten Patienten einschließen. Dabei wurde mit der wöchentlichen Gabe von 1D09C3 ein anderes Verabreichungsschema untersucht, als in den beiden anderen Zentren mit einer zweiwöchentlichen Infusion. Im Februar 2006 wurde 1D09C3 der Orphan Drug Status für das Hodgkin Lymphom, der CLL und dem Multiplen Myelom verliehen. Dieser Status wird an Medikamente für seltene Erkrankungen vergeben und beinhaltet neben verschiedenen Unterstützungen eine europäische Marktexklusivität von bis zu 10 Jahren. Es folgte im Dezember 2006 ein Zwischenbericht der laufenden Studien, welcher eine gute Verträglichkeit und Sicherheit von 1D09C3 beschrieb [91]. Im Frühjahr 2008 wurde die interne Entwicklung von 1D09C3 seitens GPC Biotech beendet. Ursächlich waren generelle Bedenken für die Gruppe der IgG4-Antikörper. In einer immunologischen Untersuchung konnte ein dynamischer Austausch des Fab-Arms von IgG4-Antikörpern mit anderen IgG4-Antikörpern *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [50] [12] [84]. Dieser vermutlich physiologische Effekt zur Verbesserung der Immunantwort bedeutet bei

therapeutischen Antikörpern eine Instabilität mit einem nicht abschätzbaren Risiko, weder in der Effektivität noch in Bezug auf unerwünschte Wirkungen. Durch einen Austausch von einem Fab-Arm des therapeutischen Antikörpers an der Hinge-Region mit endogenen IgG4-Antikörpern entstehen somit zunächst Halbmoleküle und dann neue bispezifische Antikörper. Aufgrund dieser Publikation entschied GPC-Biotech AG zunächst keine weiteren Ressourcen in 1D09C3 zu investieren. Es erfolgte der Abschlussbericht im April 2009. In einer späteren *in vitro* Untersuchung konnte das beschriebene Austauschpotential auch an 1D09C3 gezeigt werden [38] (s. a. Kap. 4.6.1).

#### **1.4.2 Vorklinische Tests**

1D09C3 zeigt eine hohe Affinität für HLA-DR und bewirkt eine direkte Apoptose bei den Zielzellen [62]. Dabei scheint der Zelltod unabhängig von klassischen durch Caspasen aktivierender Apoptose erfolgen. In weiterführenden Studien konnten *in vitro* unter anderem eine mitochondriale Depolarisierung und Aktivierung der JNK-Apoptosewege nachgewiesen werden [15]. Der Antikörper zeigte in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Tests potente Aktivität gegen maligne entartete B-Zellen [14]. Nach einer Zeitspanne von lediglich 30 Minuten nach der Infusion konnte eine Reduzierung der peripheren B-Zellen um 90% verzeichnet werden. In einem Versuch erfolgte eine Inkubation mit CLL-Zellen von 10 Patienten. Es konnte eine Letalität in 65-70% der Zellen erreicht werden, wobei nach 4 Stunden eine effektive Wirkung eintrat und nach 24 Stunden die höchste Letalität vorlag. In einem Maus-Modell mit xenotransplantierten humanen NHL-Zellen (Granta, 519 NHL Zelllinie) konnte gezeigt werden, dass 1D09C3 effektiv die Tumorprogression verringert und das Überleben signifikant verlängert (s. auch Abb. 1) [62]. Weitere Maus-Modelle mit Hodgkin-Lymphom, CLL, Haarzell-Leukämie und Multiplem Myelom bestätigten diese Wirkung auf maligne B-Zellen. In einem anderen Mausmodell im metastasierten Endstadium konnte gezeigt werden, dass bei hohen Dosen von 1D09C3 (1 mg/d je Maus für 4 Tage) noch bis zu 33% der Tiere signifikant auf die Therapie ansprachen [15]. In einer weiteren Untersuchung wurde die Wirksamkeit von 1D09C3 in Kombination mit Rituximab getestet. In dem Maus-Modell mit humanen NHL-Zellen konnte gezeigt werden, dass bei einzelner Gabe die Wirkung der beiden Antikörper vergleichbar war und bei gemeinsamer Verabreichung eine deutliche synergistische Aktivität erzielt werden kann. Die Zeitspanne bis zum Rezidiv und die Langzeit-Überlebensrate (Heilungsrate) war in dieser Kombination durchweg höher als bei den beiden Antikörpern alleine [3].

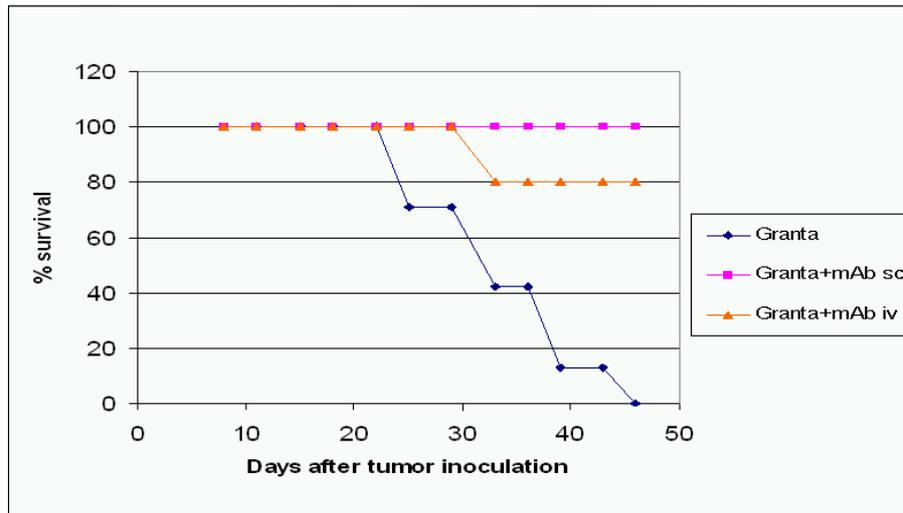


Abb. 1, 1D09C3 Vgl. von i.v., s.c. und Kontrolle im Maus Modell mit Granta 519, aus [62]

Die Toxikologie von 1D09C3 wurde an Makaken getestet. Diese Affen zeigten in vergleichenden Zellversuchen mit humanen Zellen ähnliche zytotoxische Effekte auf 1D09C3 und erwiesen sich daher als valides Tiermodell. Es zeigte sich neben einer guten Verträglichkeit ein Abfall an peripheren B-Lymphozyten und NK-Zellen nach 30 Minuten, welche sich bei Dosen bis zu 10 mg/kg innerhalb einer Woche komplett erholten. Der Antikörper wies eine schnelle Clearance aus dem Blut auf, bei einigen Mausmodellen lag die Halbwertszeit bei unter 3 Stunden. Des Weiteren wurde eine vorübergehende Reduzierung an Thrombozyten und Fibrinogen beobachtet, eine Verlängerung von der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) und eine Erhöhung der D-Dimere. Diese Laborparameter weisen auf eine Verbrauchskoagulation hin, welche jedoch nur flüchtig, dosisabhängig und komplett reversibel war. Es konnte keine klinische Relevanz zum Beispiel in Form von Blutungen nachgewiesen werden. Ab einer Dosis von 10 mg/kg traten Übelkeit/Erbrechen und eine Erhöhung von dem Komplementfaktor C3a auf. Des Weiteren konnten ab einer Dosis von 3 mg/kg in den letzten zwei Zyklen Antikörper gegen das Fab-Fragment von 1D09C3 nachgewiesen werden [3].

### 1.4.3 Phase I Studie mit 1D09C3

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden als wissenschaftliche Begleitstudien im Rahmen der deutschlandweit ersten klinischen Prüfung des monoklonalen Antikörpers 1D09C3 in einer monozentrischen, einarmigen und offenen Phase I Studie in Köln durchgeführt (Studienleiter war Professor Dr. Michael Hallek, Direktor der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln).

Prüfziele der Studie waren die Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD), sowie die Erfassung der Verträglichkeit und Sicherheit bei eskalierten Dosen von 1D09C3 (dosis-limitierende Toxizität, DLT). Das Interventionsschema umfasste eine einmal wöchentliche intravenöse (i.v.) Gabe von 1D09C3 unter stationären Bedingungen über vier Wochen (4 Gaben insgesamt). Die Steigerung der Antikörperdosierung erfolgte ausgehend von einer Start-Dosisstufe mit 0.25 mg/kg Körpergewicht ab der zweiten Dosisstufe mit einer Verdoppelung der Dosierung nach jeweils 3 behandelten Patienten. Bei Auftreten von gravierenden unerwünschten Nebenwirkungen sollten drei weitere Patienten in die entsprechenden Dosisstufe eingeschlossen („3+3-Schema“) [70]. Falls zwei von sechs mit gleicher Dosierung behandelte Patienten eine dosis-limitierende Toxizität (DLT) zeigten, sollte die Eskalation gestoppt und die MTD und zukünftige Phase-II Dosis als die darunter liegende Dosis definiert werden. Es war zunächst eine maximale Dosiseskulation von 1D09C3 bis 10 mg/kg Körpergewicht vorgesehen. Neben dem primären Prüfziel der Bestimmung der MTD waren die Evaluierung der DLT, die Erfassung und Bewertung von unerwünschten Nebenwirkungen, sowie die Bestimmung von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern sekundäre Prüfziele der klinischen Prüfung. Zielgruppe der Studie waren geplante 28-43 Patienten älter als 18 Jahre mit der Diagnose einer rezidierten oder therapierefraktäre B-Zell lymphoproliferative Erkrankung. Diese Gruppe der Neoplasien beinhaltete Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, die Chronische lymphatische Leukämie sowie das Multiple Myelom. Vortherapien der Grunderkrankung sollten mindestens vier Wochen zurückliegen. Die Behandlung im Rahmen der Studie beinhaltete dreimonatliche Nachsorge-Untersuchungen nach Beendigung der 1D09C3 Therapie für maximal ein Jahr [2].

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Therapie vieler fortgeschrittenen malignen Neoplasien, einschließlich lymphatischer Tumorerkrankungen, erzielt oftmals weder eine Heilung noch eine deutliche Verlängerung im Überleben der Patienten. Daher ist die Suche nach einer Erweiterung und Verbesserung der therapeutischen Optionen ein weltweites definiertes Ziel. Zahlreiche potentielle neue Medikamente befinden sich aktuell in präklinischen und klinischen Studien.

Die vorliegende Promotionsarbeit untersucht die pharmakodynamischen Auswirkungen des neuartigen humanisierten monoklonalen Antikörpers 1D09C3 im Rahmen einer Phase I Studie für Patienten mit rezidivierten und/oder therapie-refraktären reifzelligem lymphatischen B-Zell Neoplasien. 1D09C3 bindet an das Oberflächenmolekül HLA-DR und zeigte eine B-Zell-spezifische pro-apoptotische Wirkung in präklinischen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es die Wirkungsweise von 1D09C3 auf maligne und nicht-maligne Zellen des Immunsystems im Patienten nachzuverfolgen. Aufgrund der relativ einfachen Zugänglichkeit und Messbarkeit von Lymphozyten im peripheren Blut im Vergleich zum Lymphknoten, boten die Blutproben der Studienpatienten eine Modelloption, die Wirkung von 1D09C3 auf maligne und nicht-maligne Zellen *in vivo* zu studieren. Dabei wurden folgende Aspekte untersucht:

- a) die minimale und maximale quantitative Veränderung (Reduktion oder Anstieg) maligner und nicht maligner Zellen im peripheren Blut vor und nach 1D09C3 Therapie
- b) die zeitliche Kinetik eines Anstiegs oder Abfalls maligner und nicht-maligner Zellen im peripheren Blut vor und nach 1D09C3 Therapie
- c) Korrelation der Ergebnisse in a) und b) mit unterschiedlichen Dosisstufen von 1D09C3 und klinischen Parametern (z. B. Ausgangswert der Lymphozyten).

Im Rahmen der oben genannten Phase I Studie wurden insgesamt 14 Patienten mit CLL, Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom behandelt. Jeder Patient erhielt vier Infusionen von 1D09C3 innerhalb von vier Wochen. In definierten Zeitabständen vor und nach 1D09C3-Gabe wurden bis zu 36 Blutentnahmen pro Patient durchgeführt. Mit jeder Blutprobe wurde eine Immunphänotypisierung zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Leukozyten Subpopulationen durchgeführt. Dabei wurde die Technik der Durchflusszytometrie eingesetzt, welche eine semiquantitative spezifische Messung zellulärer Eigenschaften über Oberflächenantigene in kurzer Zeit ermöglicht. Für die Messung absoluter Zellzahlen pro analysiertes Blutvolumen mittels Durchflusszytometrie wurde hierbei ein spezielles Protokoll

der Absolutzählung mit Hilfe künstlicher Mikropartikel etabliert. Für die nachfolgend berichteten Ergebnisse wurden Immunphänotypisierungen von insgesamt 430 Blutproben in 14 Patienten bis zu sechs Wochen nach Therapieende analysiert, interpretiert und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse geben Aufschluss über die zielgerichtete Wirkung von 1D09C3 gegen entartete B-Lymphozyten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsdesign

Zur Untersuchung der Zellkinetik mittels Durchflusszytometrie wurden den Patienten bis zu 36 venöse Blutproben zu definierten Zeitpunkten entnommen (s. Kap. 2.3.1). Die Probenaufbereitung und Analyse erfolgte im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Köln. Die Blutproben der ersten beiden Patienten wurden mit einem Vier-Farben-Zytometer EPICS XL<sup>®</sup> der Firma Beckman-Coulter analysiert. Für die Zelldifferenzierung wurden 10 diagnostische Antikörper in drei Versuchsansätzen verwendet. Durch die Analyse von eindimensionalen Histogrammen und Punktwolkendarstellungen (Dot-Plots) konnte ein prozentuales Verhältnis der Zellpopulationen ermittelt werden. Parallel dazu wurde seitens des Zentrallabors der Universitätsklinik Köln die absolute Leukozytenanzahl der einzelnen Blutproben erfasst. Unter Verwendung dieser Werte konnte die absolute Anzahl der einzelnen Zellpopulationen errechnet werden. Die Experimente der ersten beiden Patienten werden im Folgenden als Protokoll 1 bezeichnet.

Diese Arbeitsschritte wurde bei den weiteren 12 Patienten optimiert und zur Unterscheidung Protokoll 2 genannt. Im Rahmen dessen wurde ein Sechs-Farben-Zytometer BD FACSCanto<sup>®</sup> der Firma Becton Dickinson eingesetzt. So bestand die Möglichkeit mit sechs diagnostischen Antikörpern in einem Versuchsansatz die gleiche Zielsetzung zu verwirklichen. Des Weiteren konnten durch die Verwendung von TruCOUNT<sup>®</sup>-Beads die in einem definierten Blutvolumen befindliche absolute Zahl an Zellen jeder Zellsubpopulation in einem Arbeitsschritt errechnet werden. Die Analysen dieser Ergebnisse erfolgten mittels Dot-Plot Diagrammen. Die Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen wurden statistisch ausgewertet und grafisch veranschaulicht.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten diagnostischen Antikörper aufgelistet. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper vom Typ IgG1. Die variablen Domänen der Antikörper (Antigenbindungsstellen) sind gegen die in der ersten Spalte angegebenen Oberflächenmoleküle von Leukozyten gerichtet, welche nach der CD-Klassifikation (Cluster of Differentiation, s. auch Kap. 1.2.2.1) eingeteilt werden [92]. Die zweite Spalte steht für die fluoreszierende chemische Gruppe, mit welcher der Antikörper gekoppelt ist (s. auch Kap. 2.3.2.2).

#### 2.2.1.1 Protokoll 1

Antigen	Fluorochrom	Hersteller
CD3	FITC	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
CD3	PC5	
CD4	FITC	
CD8	PE	
CD14	PE	
CD16	PC5	
CD19	PC5	
CD20	FITC	
CD45	ECD	
CD56	PE	

Tab. 3, verwendete Antikörper im Protokoll 1

### 2.2.1.2 Protokoll 2

Antigen	Fluorochrom	Hersteller
CD3	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD4	PC5	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
CD4	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD8	PE	
CD16	PC5	
CD19	PC5	
CD45	PC5	

Tab. 4, verwendete Antikörper im Protokoll 2

### 2.2.1.3 Testantikörper

Die in Tabelle 5 aufgeführten Testantikörper wurden zur Isotypen-Kontrolle und Kalibrierung des Zytometers FACSCanto® verwendet.

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller
Labled mouse IgG	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	FITC	
	PE	
	PE-Cy7	
	PerCP-Cy 5.5	
	APC-Cy7	

Tab. 5, verwendete Testantikörper zur Isotypen-Kontrolle

## 2.2.2 Reagenzien und Gefäße zur Probenaufbereitung

Reagenz/Gefäß	Hersteller
PBS-Puffer, pH 7,4	GIBCO/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lysing Solution IQ-Test 3	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
Flow-Check Fluorospheres	
EasyLyse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
TruCOUNT Tubes	
TruCOUNT Controls	
7-Coulor-Setup	
Zentrifugen Röhrchen Falcon 5 ml	
Entionisiertes Wasser, Destamate BI80E	Heraeus, Hanau
Aqua-Dest für Injektionen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Test-Röhrchen 50 ml	Greiner-Bio-one, Frickenhausen

Tab. 6, verwendete Reagenzien und Gefäße zur Probenaufbereitung

### 2.2.3 Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Flow-Zytometer EPICS-XL 4C	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
Flow-Zytometer BD FACS Canto	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Dispensette für PBS-Puffer	Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex Genie 2	Bender + Hobein AG, Zürich
Roller Mixer Stuart SRTL	Progen Scientific Ltd., South Yorkshire, U.K.
Einkanal-Pipetten 20-, 100 und 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Einkanal-Pipetten 10 µl	Biohit Deutschland GmbH, Rosbach
EXPO 32 ADC Analysis	Beckman-Coulter GmbH, Krefeld
BD FACSDiva 4.1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Excel 2000	Microsoft Corporation, Seattle, USA
SPSS 15.0.1 DE	SPSS Inc. Chicago, USA
Stata	College Station, TX, USA

Tab. 7, verwendete Geräte und Software

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Probengewinnung

Im Rahmen der Phase I Studie mit dem monoklonalen Antikörper 1D09C3 waren 4 intravenöse Medikamentengaben vorgesehen, jeweils am Tag 1, 8, 15 und 22. In festgelegten Zeitabständen wurde den Patienten vor und nach der Infusion venöses Blut entnommen und mit EDTA antikoaguliert. Die Blutproben waren neben einer fortlaufenden Patientenummerierung (C101-C114) mit der Therapiewoche sowie mit der Uhrzeit bzw. dem Tag der Blutabnahme kodiert. In jeder Therapiewoche wurden 8 Blutproben zu den in Tabelle 8 aufgeführten Zeitpunkten entnommen:

Kodierung	Zeitpunkt	Abstand zur Therapie
1-08	8:00 Uhr	2 Stunden davor
1-12	12:30 Uhr	30 Minuten danach
1-13	13:00 Uhr	1 Stunde danach
1-16	16:00 Uhr	4 Stunden danach
1-22	22:00 Uhr	10 Stunden danach
1-d2	Tag 2	1 Tag danach
1-d4	Tag 4	3 Tage danach
1-d6	Tag 6	5 Tage danach

Tab. 8, Zeitpunkte der Blutentnahmen

Dieses Schema wurde auf den folgenden drei Wochen fortgesetzt (mit 2-08 für 8:00 Uhr in der zweiten Woche usw.). Falls die zweistündige Infusion nicht von 10:00 bis 12:00 Uhr

erfolgte, wurden die Entnahmezeiten angepasst. Im Anschluss an die vier Wochen Therapie folgten 6 Wochen Nachbeobachtungszeit. Diese Phase beinhaltete vier Blutabnahmen mit den Kodierungen d29 eine Woche nach der letzten Therapie, d36 nach zwei Wochen, d50 nach vier und d64 nach sechs Wochen. Insgesamt wurden pro Patienten bis zu 36 Blutabnahmen durchgeführt. Die folgende Grafik dient der Veranschaulichung des zeitlichen Therapieschemas (s. Abb. 2).

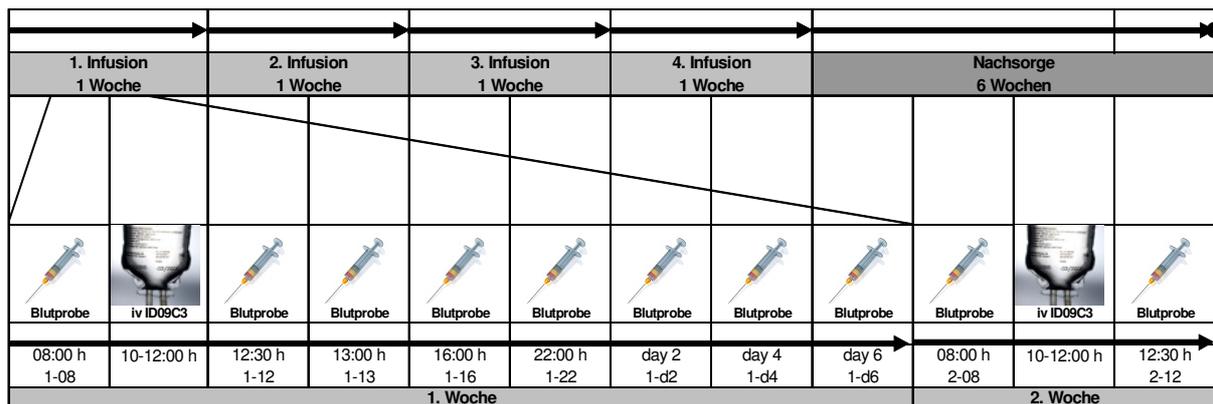


Abb. 2, Therapieschema Phase I Studie 1D09C3

Die Patienten wurden bevorzugt am Tag vor der Therapie stationär aufgenommen und mindestens einen Tag nach Therapie bis zur Blutabnahme x-d2 im Klinikum beobachtet. Die Blutabnahmen am Tag 4 (x-d4) und am Tag 6 (x-d6) sowie die Nachbeobachtungsphase konnten bei komplikationslosem Verlauf ambulant erfolgen. Die Proben wurden mittels eines Eiltransporters schnellstmöglich in das Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie überstellt und innerhalb von 24 Stunden der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

## 2.3.2 Durchflusszytometrie

### 2.3.2.1 Die Bedeutung in der Medizin

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, eine hohe Anzahl von molekularen Parametern in heterogenen Zellgemischen qualitativ und quantitativ zu analysieren. Dem Verfahren liegt heute eine hochentwickelte Technik zugrunde, welche im Vergleich zu früheren Geräten ausgesprochen schnell arbeitet. Durch die Automatisierung mehrerer

Analysen in einem Arbeitsdurchgang sowie die hohe Messgeschwindigkeit der Geräte wurde das Verfahren zunehmend in der Routinediagnostik eingesetzt. Die Durchflusszytometrie wird seit 1983 klinisch eingesetzt, wobei erst die Entwicklung der monoklonalen Antikörper und der günstige Einsatz von leistungsstarken Computern ab 1990 die heutigen diagnostischen Möglichkeiten erbrachten. Der wissenschaftlichen Anwendung stehen seit 1999 Messgeräte zur Verfügung, welche mit drei Lasern 11 Parameter analysieren können. Die Entwicklung des Durchflusszytometer BD LSR<sup>®</sup> II der Firma Becton Dickinson im Jahre 2005 stellt mit 4 Lasern und 20 Parametern eine Maximalvariante dieser Technik dar.

Die Durchflusszytometrie hat in der hämatologischen Diagnostik einen großen Stellenwert erlangt. Neben der automatischen Analyse des „normalen“ Differentialblutbildes ist das Verfahren in der diagnostischen Linientypisierung und in der Verlaufsbeurteilung von Leukämien und einigen Lymphomen sehr bedeutsam. Hierbei wird neben peripher venösem Blut auch Knochenmark als Untersuchungsgut verwendet. Ebenso können Zellen aus Lymphknotenpunktaten und anderen Biopsien nach Aufbereitung in Einzelzellsuspension untersucht werden. Darüber hinaus findet die Durchflusszytometrie vielfältige weitere Anwendungen. So kann z. B. die DNA gefärbt und dargestellt werden, es gibt Marker zur Erkennung von Apoptosevorgängen, das Membranpotential oder der intrazelluläre pH-Wert kann untersucht werden und eine Darstellung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen ist möglich. Die Durchflusszytometrie findet daher neben der klinischen Medizin auch in der Grundlagenforschung weite Anwendung.

### **2.3.2.2 Das Prinzip der Durchflusszytometrie**

In der Durchflusszytometrie werden Zellen und Mikropartikel automatisch gezählt und differenziert. Durch den Einsatz eines optischen Messsystems werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Die Zellen bewegen sich in einem Einzelzell-Flüssigkeitsstrom und passieren einen Laser, so dass das gestreute Licht von mehreren Detektoren erfasst werden kann (s. Abb. 3). In einem hämatologischen Routinelabor kann so eine heterogene Zellpopulation, in der Regel Leukozyten, schnell und quantitativ auf Basis der einzelnen Zelle untersucht werden. Die Analyse ist im Vergleich zu einfachen Blutbildanalyse-Geräten multiparametrisch, d. h. es werden neben der Zellgröße auch z. B. Oberflächenmerkmale erfasst. Dadurch ist eine Immunphänotypisierung mit einer Differenzierung der Leukozyten und vor allem der Lymphozyten möglich.

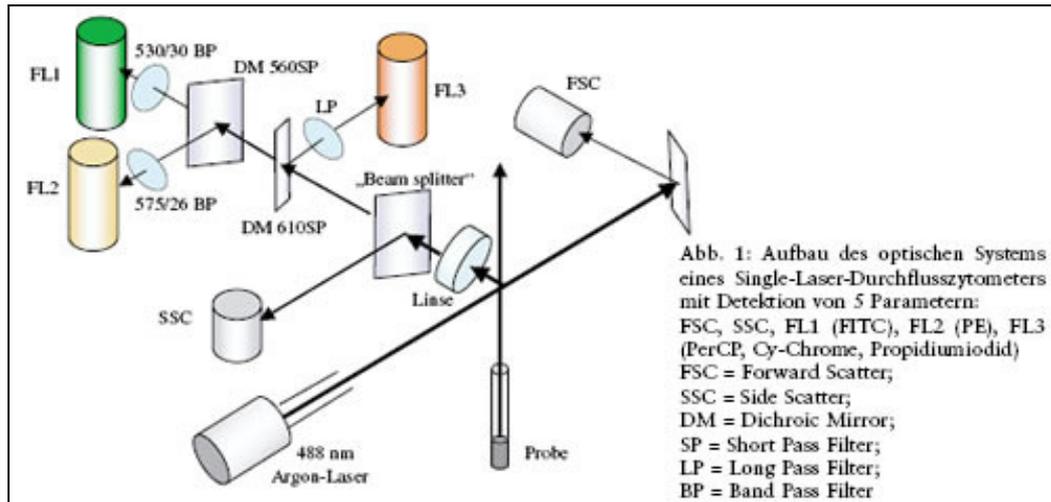


Abb. 3, Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers, aus [29]

Der vorbereitete Ansatz wird in einer Vorrichtung des Zytometers angesaugt, bzw. technisch exakt beschrieben mit Hilfe von Druck in den Flüssigkeitsstrom bewegt. Es handelt sich hierbei um eine Durchflussküvette mit einem Durchmesser von 50-250 µm. In dieser fließt laminär eine isotone Flüssigkeit (sheat fluid) mit einer Geschwindigkeit von meist 10 m/sec. Durch diese hohe Flussgeschwindigkeit können 100.000 Zellen und mehr innerhalb von Sekunden bis Minuten in Echtzeit analysiert werden. Wichtig ist anzumerken, dass nicht spezifisch einzelne Zellen erfasst werden, sondern Partikel. So ist in der Computerauswertung zu berücksichtigen, dass dies ebenso zusammengeklumpte Zellen oder Zellreste sein können. Die zu untersuchende Probe wird durch ein abgestimmtes Druckverhältnis im Zentrum des Stroms bewegt und trifft dort im rechten Winkel auf eine Lichtquelle. Es handelt sich hierbei in der Regel um ein Laserlicht, welches den Vorteil hat, dass die Lichtwellen parallel verlaufen und eine einzige, monochromatische Wellenlänge beinhaltet. Der Argonlaser mit einer emittierten Lichtwellenlänge von 488 nm wird am häufigsten verwendet, da er sich besonders für die Anregung der gängigen Fluorochrome eignet [29]. Die Lichtphotonen des Lasers treffen von der Seite auf die Zelle. In dem Moment wird zum einen das Licht gestreut und zum anderen wird es durch die Absorption und Anregung der Fluorochrome re-emittiert. Bei dem Streulicht (Light Scatter) können zwei Parameter erfasst werden. Das Licht, welches durch die Zelle um 360° gestreut wird, also entlang der Achse des Laserstrahls, wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) bezeichnet. Dieser Parameter ist ungefähr proportional zur Größe der gemessenen Zelle.

Das so genannte Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) wird im 90°-Winkel der Zelle gemessen. Dieses entsteht durch Reflexion an Strukturen innerhalb der Zellen und korreliert daher mit der Zellgranularität.

### **2.3.2.3 Eingesetzte Fluorochrome und Antikörper**

Die verwendeten Antikörper sind ihrerseits mit einem fluoreszierenden Stoff (Fluorochrome) markiert. Deren Emissionswellenlänge kann spezifisch detektiert werden und dadurch einem bestimmten Oberflächenmolekül zugeordnet werden. Für die Immunphänotypisierung, d. h. die weitere Differenzierung der Lymphozyten, benötigt man das zweite Lichtereignis, welches durch die Fluorochrome hervorgerufen wird. Diese absorbieren das Laserlicht und re-emittieren ein Licht in einer für das jeweilige Fluorochrom spezifischen Wellenlänge. Dadurch können die zu untersuchenden Zielzellen von negativen nicht markierten Zellen unterschieden werden. Das mehrfarbige Licht wird in der Regel rechtwinklig mit dem Seitwärtsstreulicht aufgenommen und die entsprechenden Wellenlängen separat detektiert. Die häufigsten Farbstoffe bei Verwendung eines Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm sind das grüne Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und das gelb-rote Phycoerythrin (PE), welches bei 564 nm das Licht absorbiert. Die Emissionen erfolgen in höheren Wellenlängen, für FITC bei 520 nm und für PE bei 575 nm. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer EPICS XL<sup>®</sup>-C4 der Firma Beckman-Coulter verwendet für den Argonlaser zwei weitere Fluoreszenzfarbstoffe. Dabei handelt es sich um PE-TexasRed (ECD), welches ein Tandemkonjugat von PE mit dem Farbstoff TexasRed ist. Das Absorptionsmaximum liegt durch das PE ebenso bei 564 nm. Die Fluoreszenzenergie wird auf das TexasRed übertragen, welches ein Emissionsmaximum mit einer längeren Wellenlänge von 615 nm erzeugt. Der weitere Farbstoff ist PE-Cy5, welcher ebenso ein Tandemkonjugat von PE ist, in diesem Fall mit Cyanin-5. Auch hier findet bei Anregung durch den Argonlaser ein Energietransfer von PE auf den Farbstoff Cyanin-5 statt, welcher ein Emissionsmaximum von 670 nm innehält. Für den Sechs-Farben-Zytometer BD FACSCanto<sup>®</sup> der Firma Becton Dickinson, welcher im Rahmen des Protokolls 2 Anwendung fand, wurden neben FITC und PE zwei weitere Farbstoffe für den Argonlaser verwendet. Das Fluorochrom PerCP-Cy5.5 ist ein Tandemkonjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Cyanin-5.5. Das Absorptionsmaximum liegt bei 490 nm und das Licht wird emittiert mit einem Maximum bei 694 nm. Der weitere Farbstoff ist das PE-Cy7, ein Tandemkonjugat aus PE und Cyanin-7 mit einem Emissionsmaximum von über 750 nm. In dem Durchflusszytometer FACSCanto<sup>®</sup> ist ein weiterer Laser enthalten, ein Helium-Neon-

Laser, welcher Licht in einer Wellenlänge von 633 nm aussendet. Die beiden Fluorochrome, welche von diesem angeregt werden, sind APC und APC-Cy7. Es handelt sich hierbei um Allophycocyanin, welches das Licht bei 650 nm absorbiert. Das Emissionsmaximum liegt bei 660 nm für APC und für das Tandemkonjugat von APC mit Cyanin-7 bei 767 nm (s. Tab. 9).

<b>Argon-Laser mit 488 nm Wellenlänge (blau)</b>		
	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
FITC	495	520
PE	564	575
ECD	564	615
PE-Cy5	564	670
PerCP 5.5	490	694
PE-Cy7	564	750
<b>Helium-Neon-Laser mit 633 nm Wellenlänge (rot)</b>		
	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
APC	650	660
APC-Cy7	650	767

Tab. 9, Wellenlängen der verwendeten Fluorochrome

Bei der Verwendung von mehreren Fluorochrome ist jedoch zu berücksichtigen, dass die jeweilige Emission in einem Wellenlängenspektrum erfolgt. Es kommt zu einer Überlappung der Emissionen, welche neben der Verwendung von Filtern durch die so genannte Kompensation erkannt und korrigiert werden sollte. So wird z. B. das schwache Signal der FITC-Fluoreszenz, welches im optischen Kanal der PE-Fluoreszenz gemessen wird, herausgerechnet. Die neueren Durchflusszytometer bieten automatische Programme für die Kompensation an. Bei regelmäßigen technischen Kontrollverfahren bzw. Wartungen sind diese Programme für die klinische Anwendung in der Regel ausreichend.

### 2.3.2.4 Datenverarbeitung und -darstellung

In der Computerdarstellung wird das Streulicht zweidimensional als Dot-Plot dargestellt, wobei jeder Punkt einer Zelle (bzw. einem Partikel) entspricht. Das Vorwärtsstreulicht wird üblicherweise auf der x-Achse und das Seitwärtsstreulicht auf der Ordinate dargestellt (s. Abb. 4). Mit diesen so genannten intrinsischen Parametern kann in klinischen Routinelaboren das Differentialblutbild (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) erstellt werden.

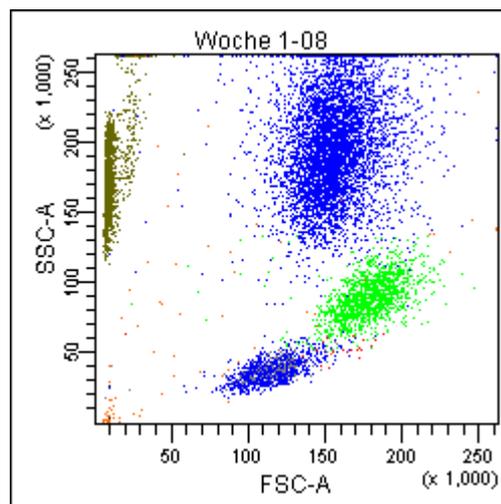


Abb. 4 Dot-Plot Pat. C107, 1-08, SSC vs. FSC

Im Rahmen der multiparametrischen Untersuchung erfolgt neben der Auswertung des Streulichtes auch die computergestützte Analyse der einzeln detektierten Wellenlängen. Die spektral unterschiedlichen Lichtsignale werden hierfür von einem Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt. Es besteht nun die Möglichkeit der Darstellung von einem Parameter in einem Histogramm. Dabei korreliert die Anzeige auf der x-Achse mit der Größe des Parameters und die y-Achse steht für die Anzahl der gezählten Events/Zellen (s. Abb. 5). So können die Zellen mit den verwendeten Antikörper über ihr angebundenes Fluorochrom einzeln dargestellt und ihr Anteil an den gezählten Events ausgerechnet werden.

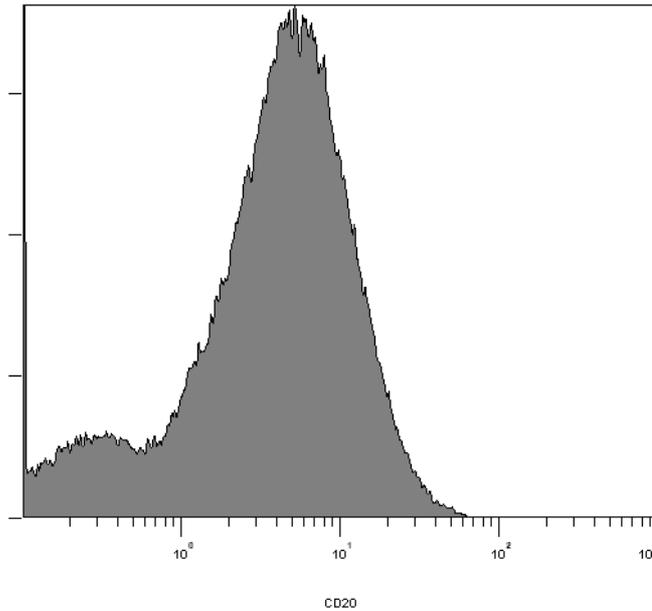


Abb. 5, Histogramm CD20 positive Zellen, EPICS XL®

Als zweite Möglichkeit in der Datenanalyse können auch hierbei Dot-Plots Diagramme mit zwei Parametern verwendet werden. Durch diese Darstellung kann erkannt werden, ob die zwei Messparameter in ihrer Expression miteinander korrelieren oder unabhängig sind. Bei einer Korrelation bilden sich die Events auf einer Diagonalen ab, anderenfalls sind separate Populationen erkennbar. So können z. B. alle CD3-positiven-Zellen (T-Zellen) in einer Abbildung differenziert werden, indem die zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) gegen die T-Helfer-Zellen (CD4-positiv) in der Grafik aufgetragen werden (s. Abb. 6). Durch das so genannte Gating, d. h. das Eingrenzen von Regionen zur Differenzierung in Subpopulationen, können die gemessenen Events ausgezählt und ebenso in Relation zu allen gezählten Zellen gesetzt werden.

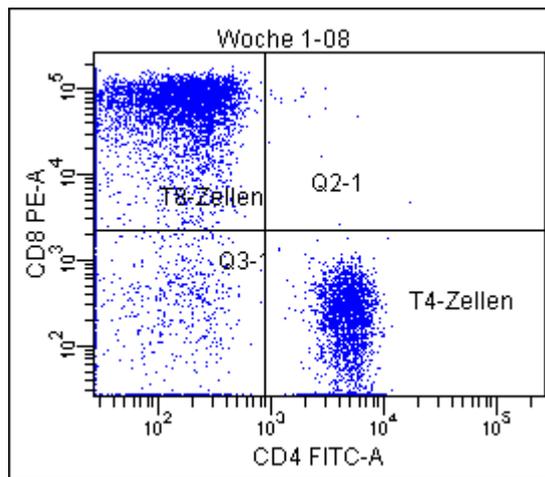


Abb. 6, Dot-Plot Pat. C107, Blutprobe 1-08, alle CD3-positiven Events, CD8 vs. CD4

### 2.3.2.5 Probenaufbereitung

In einer kleinen Menge antikoaguliertem Blut (25-100 µl) erfolgt die Vermengung mit den Fluorochrom-markierten Antikörpern, die gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene gerichtet sind. Dabei werden nur kleine Mengen der Antikörper benötigt (1-20 µl). Eine Inkubation bei Raumtemperatur über ca. 15 Minuten ermöglicht die Bindung der Antikörper an die Zielzellen. Im Anschluss werden zur Untersuchung der Leukozyten die roten Blutkörperchen lysiert. Aufgrund ihrer im Verhältnis zu den Leukozyten geringeren osmotischen Widerstandsfähigkeit werden die Erythrozyten durch einen hypotonen Lysepuffer selektiv aufgelöst. Darauf folgend werden die zerstörten Zellen durch Waschschriffe mit isotoner Pufferlösung und Zentrifugation aus dem Ansatz entfernt. Ein alternatives Verfahren stellt das „Lyse-no-wash-protocol“ dar, in welchem der Zellschrott in der Probe verbleibt und in der späteren Computeranalyse herausgerechnet wird. Dieses Verfahren ist die Methode der Wahl für eine direkte Absolutzählung der Zellen.

### 2.3.2.6 Absolutzählung

Eine klassische Methode zur Konzentrationsbestimmung der Zellpopulationen besteht in dem so genannten „Dual platform“ Verfahren. Hierbei wird die durchflusszytometrische Messung der relativen Anteile von Subpopulation mit dem Einsatz eines Hämatologie Analysators zur Absolutangabe der Population ergänzt. Durch die Verwendung zweier

verschiedener Zähltechniken und unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden besteht jedoch eine relativ große Anfälligkeit für Fehler [11].

Eine andere Methode wird als „Single platform“ bezeichnet und steht für die direkte Absolutzählung durch das Durchflusszytometer. Dabei wird auf eine Zentrifugation mit Waschen der Proben unter Verwendung von „Lyse-no-wash“-Techniken verzichtet. So kann eine schlecht reproduzierbare Volumenveränderung umgangen werden. Die Methode kann durch zwei verschiedene Techniken verwirklicht werden. Zum einen kann ein Durchflusszytometer verwendet werden, das eine volumenkalibrierte Messung beinhaltet und über eine präzise Steuerung und Messung des Probenvolumenflusses die Absolutzählung ermöglicht. Als weitere Technik können dem zu untersuchenden Reagenz Mikropartikel beigefügt werden. Die in dem exakt definierten Volumen der Probe gezählten Zellen können dadurch ins Verhältnis zu den gezählten Mikropartikeln mit bekannter Gesamtanzahl gesetzt werden. Die Firma Becton Dickinson bietet als Zählpartikel die TruCOUNT<sup>®</sup> Tubes an, welche im Rahmen des Protokolls 2 Verwendung fanden. Eine Kontrollmöglichkeit dieses Verfahrens kann mittels TruCOUNT<sup>®</sup>-Kontrollen erfolgen. Dabei handelt es sich um fluoreszierende Mikropartikel, welche in drei Ansätzen mit niedriger, mittlerer und hoher Konzentration in TruCOUNT<sup>®</sup> Röhren mit Vollblut durchflusszytometrisch analysiert werden. Der angegebene Zielbereich wird im Anschluss mit dem Messergebnis verglichen.

### **2.3.2.7 Messung nach Protokoll 1**

Das erste Protokoll wurde für die beiden Patienten mit der Kodierung C101 und C102 angewandt. Die Messungen wurden an einem Vier-Farben-Zytometer EPICS XL<sup>®</sup> der Firma Beckman-Coulter durchgeführt, wobei in einem Analyse-Ansatz 40.000 Zellen differenziert wurden.

Im Rahmen des Protokolls wurden drei Ansätze durchgeführt, wobei jeweils 5ml Falcon<sup>®</sup>-Röhren verwendet wurden. Dazu wurde 100 µl gut vermisches EDTA-Blut mit 4 ml PBS-Puffer versetzt. Darauf folgte eine Sedimentation indem die Mischung 3 Minuten auf 1.300 U/min zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand ab pipettiert und die Antikörper mit einer fluoreszierenden Gruppe nach dem Schema der Tabelle 10 zugefügt.

<b>1. Ansatz</b>		
5 µl	CD3	PC5
10 µl	CD4	FITC
10 µl	CD8	PE
5 µl	CD45	ECD
<b>2. Ansatz</b>		
10 µl	CD3	FITC
5 µl	CD16	PC5
5 µl	CD45	ECD
10 µl	CD56	PE
<b>3. Ansatz</b>		
10 µl	CD14	PE
5 µl	CD19	PC5
10 µl	CD20	FITC
5 µl	CD45	ECD

Tab. 10, Ansätze zur Inkubation nach Protokoll 1

Diese Mischungen wurden im Vortexer gut vermischt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde je 2 ml von der IQ Test 3 Lyse-Lösung in die Röhrcchen hinzugefügt, im Vortexer vermischt und erneut 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte ein Waschschrift, wobei zuerst 3 Minuten auf 1.300 U/min zentrifugiert und dann der Überstand dekantiert wurde. Es wurden 4 ml von dem PBS-Puffer hinzugefügt und im Vortexer gut vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation auf 1.300 U/min für 3 Minuten. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen und im Vortexer gemischt. Die Proben wurden einzeln im Durchflusszytometer gemessen und die

Fluoreszenzsignale mittels Histogramme und Dot-Plots Diagrammen in der Software EXPO 32 ADC Analysis<sup>®</sup> ausgewertet. Die Dateien wurden als List-Mode-Dateien (LMD) archiviert.

### 2.3.2.8 Messung nach Protokoll 2

Das zweite Protokoll wurde für die 12 folgenden Patienten mit der Kodierung C103 bis C114 verwendet. Die Messungen erfolgten an einem Sechs-Farben-Zytometer BD FACSCanto<sup>®</sup> der Firma Becton Dickinson, wobei in einem Experiment 100.000 Zellen differenziert wurden.

Das Protokoll 2 beinhaltet als Lyse-no-wash-protocol einen Versuchsansatz pro Blutprobe (s. Tab. 11). Damit eine Absolutzählung der Leukozyten in einem Arbeitsschritt erfolgen kann, wurden BD TruCOUNT<sup>®</sup> Tubes mit einer definierten Anzahl an Mikropartikel verwendet (s. auch Kap. 2.3.2.6). In diese Röhrchen wurden die im Folgenden genannten diagnostischen Antikörper mit der angegebenen fluoreszierenden Gruppe hineingefügt. Dabei wurde beachtet, dass die Pipettenspitze weder das Kügelchen mit den enthaltenen Mikropartikeln noch den Gitterboden berührt.

Ansatz		
1 µl	CD3	APC
10 µl	CD4	FITC
10 µl	CD8	PE
1 µl	CD16	PE-Cy7
20 µl	CD19	PerCP-Cy 5.5
5 µl	CD45	APC-Cy7

Tab. 11, Ansätze zur Inkubation nach Protokoll 2

Aufgrund der Wichtigkeit des B-Zell-Markers CD20 wurde dieser Antikörper mit Verwendung von 10 µl und 20 µl vergleichend getestet. Dabei erzielten die 20 µl ein Ergebnis, welches näher an dem Referenzwert des Zentrallabors lag. Daraus schlossen wir, dass die 10 µl

vermutlich nicht ausreichen, um an die oftmals hohe Anzahl von CD20-positiven B-Zellen zu binden. Daher wurden 20 µl des CD20-Antikörpers im Rahmen des Protokolls verwendet. Zur Abgrenzung des Hintergrundrauschens durch unspezifische Signale wurden Kontrollantikörper zur Isotypenkontrolle verwendet, welche nur unspezifisch binden. So konnte die Grenze zwischen spezifischer und unspezifischer Färbung gesetzt werden.

Den Antikörpern in den TruCOUNT® Tubes wurden nun 50 µl gut vermisches EDTA-Vollblut der entsprechenden Patientenprobe zugefügt. Aufgrund der Bedeutung einer exakten Blutmenge wurde die so genannte Reverse-Pipettieretechnik verwendet. In diesem Verfahren wird die Pipette bei der Flüssigkeitsaufnahme etwas über den ersten Druckpunkt hinaus gedrückt und danach bis genau zum ersten Druckpunkt ausgestoßen. So ist die Pipettenspitze ab der ersten Probe benetzt und es können Volumenverluste durch Rückstände in der Pipettenspitze verhindert werden. Diese Mischung wurde im Vortexer gut vermengt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde 2 ml von EasyLyse® der Firma Dako hinzugefügt, welche im Verhältnis 1:20 mit AquaDest® der Firma Braun verdünnt wurde. Die ersten Messungen erfolgten unter Verwendung von frisch entionisiertem Wasser aus dem Destamate® der Firma Heraeus. Hierbei traten jedoch Differenzen zwischen den ermittelten Leukozytenzahlen und dem parallel im Zentrallabor erstelltem Blutbild auf. Diese Differenz ist vermutlich aufgrund eines zu niedrigen pH-Wertes des entionisiertem Wasser verursacht worden und trat nach dem Wechsel zu AquaDest® nicht mehr auf. Des Weiteren empfiehlt Becton Dickinson in dem Protokoll für die TruCOUNT® Tubes die Verwendung von 450 µl BD FACS® Lysing Solution. Ein Vergleichstest der beiden Lyse-Lösungen von BD und Dako ergab jedoch eine höhere Übereinstimmung der Leukozyten seitens Dako mit einer Referenzmessung im Zentrallabor. Die Messung im Zentrallabor erfolgte mit dem Blutbildanalysator Sysmex XE 2.100 und ergab bei einem Proband 7,16 G/L Leukozyten. Das Ergebnis mit der BD FACS® Lysing Solution zeigte in dieser Blutprobe einen Leukozytenwert von 5,97 G/L und die Dako EasyLyse® erbrachte einen Leukozytenwert von 6,89 G/L. Die Abweichung zu dem gemessenen Wert des Zentrallabors lag daher unter Verwendung der Lyselösung von BD bei 16,6% und bei der Lyselösung von Dako bei 3,8%. Aufgrund dieses Ergebnisses erfolgte die Lysierung der Erythrozyten im Rahmen des Protokolls mit der dako EasyLyse®.

Nach Hinzufügen der Lyse erfolgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten im Dunkeln. Auch bezüglich der Inkubationszeit wurde ein Vergleich zwischen 15 und 20 Minuten durchgeführt. Dabei zeigte die Inkubation von 20 Minuten ein validiertes Ergebnis bezüglich der Referenzmessung aus dem Zentrallabor. Nach der Lysierung wurde die Probe ca. 5

Sekunden niedrigtourig im Vortexer vermengt und schnellst möglichst im Durchflusszytometer analysiert. Es zeigte sich, dass die Proben für mindestens 2 Stunden reproduzierbare Ergebnisse erbrachten, d. h. die nicht herausgewaschene Lyse bewirkt innerhalb dieses Zeitfensters keine unerwünschte Lysierung der Leukozyten. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Dot-Plots in der Software BD FACSDiva® 4.1. Die Dateien wurden als List-Mode-Dateien in dem „Flow Cytometry Standard Format 3.0“ (FCS) archiviert.

### 2.3.2.9 Analysetechniken

Die durchflusszytometrischen Analysen beinhalteten die qualitative und quantitative Bestimmung von den in Tabelle 12 aufgeführten Zellgruppen. In der zweiten Spalte dieser Tabelle ist die Nachweismethode dargestellt, mittels welcher die Populationen bestimmt wurden.

Zellpopulation	Nachweis
Leukozyten	CD45 gegen SSC
Granulozyten	CD45 gegen SSC
Monozyten	CD45 gegen SSC (CD14+)
Lymphozyten	CD45 gegen SSC
B-Zellen	CD19+ (CD20+)
T-Zellen	CD3+
T4-Zellen	CD3+, CD4+, CD8-
T8-Zellen	CD3+, CD8+, CD4-
NK-Zellen	CD16+, CD3-, CD19- (CD56+)

Tab. 12, Zellpopulationen mit Nachweismethoden

Die Bestimmung von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten erfolgt in einem Dot-Plot mit der Auftragung CD45 gegen das Seitwärtsstreulicht. Dabei werden die Granulozyten mit

der höchsten Granulいたät als obere Population eingegrenzt, die Monozyten als Gruppe mit der größten Zellgröße und die Lymphozyten mit der geringsten Granulierung. Die Summe aus diesen ergibt die Gesamtzahl der Leukozyten. In der Abbildung 7 ist ein solches Dot-Plot mit den entsprechenden Gates dargestellt.

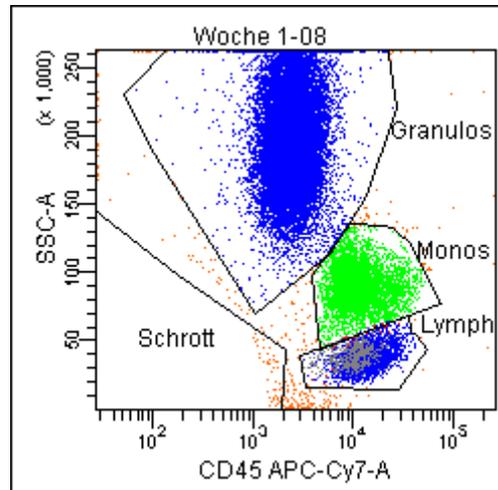


Abb. 7, Patient C107, Dot-Plot CD45 vs. SSC

In einigen Fällen waren in dieser Darstellungsform die Monozyten nur schwerlich von den Lymphozyten abzugrenzen. In dem Protokoll 1 wurde daher ein Histogramm von dem spezifischen Antikörper CD14 verwendet. Da dieser in dem Protokoll 2 nicht eingesetzt wurde, bestand die Möglichkeit, die beiden Gruppen im Dot-Plot CD45 vs. SSC zusammen einzugrenzen. Eine Differenzierung erfolgte nun in dem Dot-Plot CD4 gegen CD3, wobei die Monozyten schwach CD3 negativ und CD4 positiv abzugrenzen sind (siehe Abb. 8).

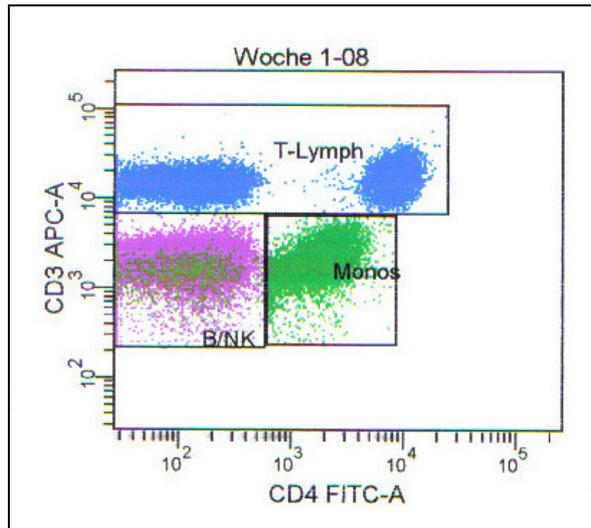


Abb. 8, Patient C113, Dot-Plot CD4 vs. CD3

Anhand dieser Darstellung der Zellpopulationen, dem Dot-Plot CD4 gegen CD3, werden die verbleibenden Gruppen differenziert. Die CD3-positive Gruppe, die T-Zellen, werden zusammengefasst und in einem weiterem Dot-Plot mit CD4 gegen CD8 als T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterschieden (s. Abb. 9).

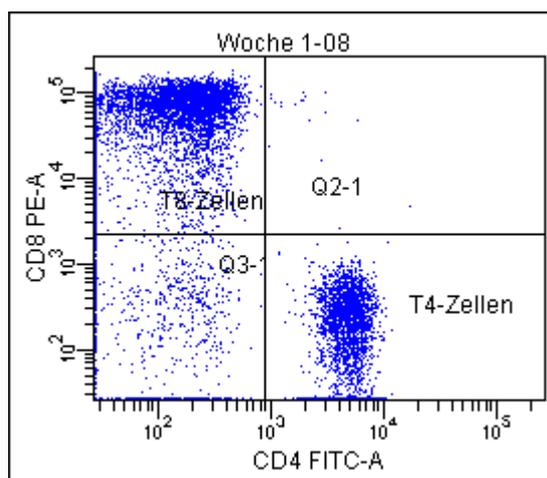


Abb. 9, Patient C107, Dot-Plot CD4 vs. CD8

Die in der Abbildung 8 CD3- und CD4-negativen Zellen sind die verbleibenden B- und NK-Zellen. Diese werden in einem weiteren Dot-Plot mit einer Abgrenzung von CD16 und CD19 differenziert (siehe Abb. 10).

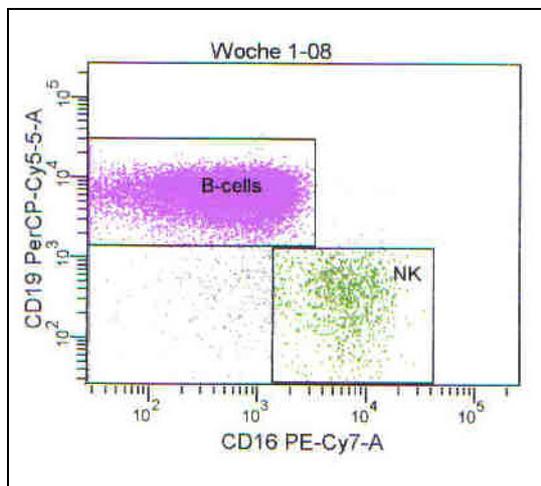


Abb. 10, Patient C113, Dot-Plot CD16 vs. CD19

Die im Rahmen des Protokolls 2 eingesetzten TruCounts waren in einem Dot-Plot mit der Auftragung CD45 gegen CD4 gut abgrenzbar (s. Abb. 11).

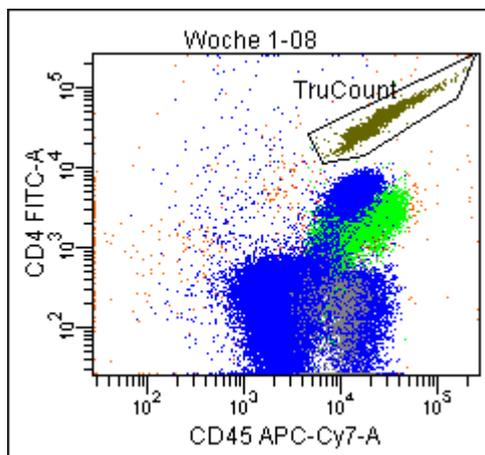


Abb. 11, Patient C107, Dot-Plot CD45 vs. CD4

Die Analyse der prozentuellen Anteile und im Protokoll 2 auch der absoluten Werte erfolgte in der in Abbildung 12 dargestellten Auflistung.

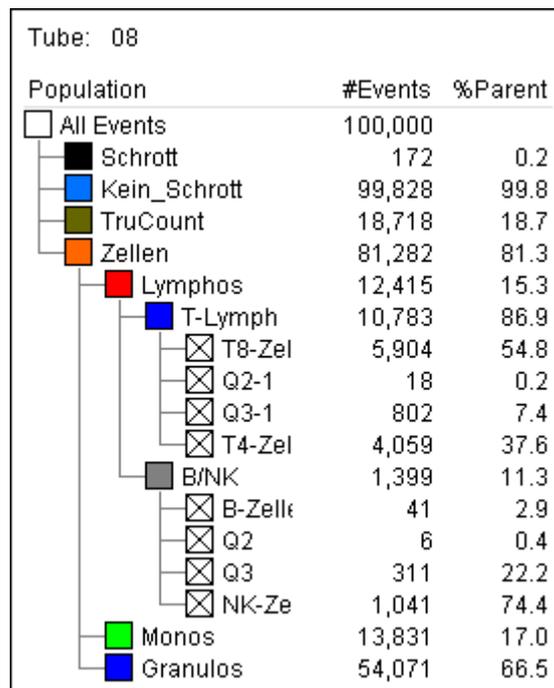


Abb. 12, Patient C107, Analysegrafik der Populationen

### 2.3.2.10 Auswertung der ermittelten Werte

Die ermittelten Werte wurden für jeden Patienten in eine Excel-Tabelle eingepflegt. Dabei wurde im Rahmen des Protokoll 1 durchflusszytometrisch die relativen Anteile der einzelnen Zellpopulationen ermittelt und mit den jeweiligen Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor auch die absoluten Mengen der einzelnen Populationen errechnet. Im Protokoll 2 entfiel dieser Rechenschritt, da die gemessenen Zellen in Relation zu den TruCOUNT®-Beads gesetzt wurden. Die einzelnen TruCOUNT®-Chargen hatten eine definierte Anzahl an Beads in einem Röhrchen. Daher war es wichtig, bei der Verwendung einer neuen Charge, die entsprechende Anzahl in dieser Verhältnisrechnung zu ändern. Die Ermittlung der absoluten Werte im Rahmen des Protokolls 2 in einem Arbeitsschritt konnte in einzelnen Fällen aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Bei diesen Messungen erwiesen sich die Anzahl der TruCOUNT®-Beads als fehlerhaft. Daher wurde auf die Leukozytenangaben des Zentrallabors zurückgegriffen. Das betrifft 44 Messungen, welche in der Tabelle 13 aufgelistet sind und in den Auswertungstabellen entsprechend gekennzeichnet wurden.

Verwendung der Zentrallabor-Werte	
Patient	Blutprobe
C103	4-d4, 4-d6, d29
C104	4-d4, 4-d6
C105	2-d2, 2-d4
C109	4-d4, d36, d50
C110	komplett

Tab. 13, Verwendung der Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor

Der Grund dafür lag vermutlich in der Verwendung von zu saurem destilliertem Wasser im Zeitraum vom 22. bis 26. Juni 2006. Nach Benutzung von kontrolliertem entionisiertem Wasser der Marke Braun sind die Abweichungen nicht mehr aufgetreten. Ein weiteres Problem bei vereinzelt Messungen trat im November 2006 auf. Die dabei eingesetzten TruCOUNT®-Kontrollen zeigten ebenso zu große Abweichungen, welche nach einer Wartung des Durchflusszytometers wieder im Normbereich lagen. Bei diesen insgesamt 44 Fehlern in der Absolutzählung wurden die Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor verwendet, die Ergebnisse der restlichen Analysen zeigten bei diesen Messungen keine Beeinträchtigung durch die genannten Faktoren.

## 2.4 Statistische Methoden

### 2.4.1 Ermittlung der Absolutwerte der Zellpopulationen

Im Rahmen des Protokolls 1 wurden die anteilig in der Durchflusszytometrie ermittelten Subpopulationen der Leukozyten und die im Zentrallabor erfassten gesamten Leukozyten als Grundlage verwendet, mittels eines Dreisatzes absolute Werte der Subpopulationen zu errechnen. Für die Analysen des Protokolls 2 konnte unter Verwendung der bekannten Anzahl der Mikropartikel in der Probe und eines exakt definierten Volumens die absolute Anzahl der gemessenen Zellen ermittelt werden. Dafür wurden die gezählten Mikropartikel mit den gezählten Zellen nach folgendem Rechenschritt ins Verhältnis gesetzt: (Anzahl der

Zellen/Anzahl der Mikropartikel) x (Gesamtmikropartikel/Probenvolumen) = absolute Zellanzahl pro Volumen

#### **2.4.2 Vergleich TruCOUNT®- und Zentrallaborwerte**

Zum Vergleich der Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor und aus der Absolutmessung in der Durchflusszytometrie wurde aus den Differenzen der jeweiligen Werte ein arithmetisches Mittel gebildet:  $(x_1 + x_2 + \dots + x_n)/n = \text{Mittelwert}$ . Des Weiteren wurde aus den Differenzen als Streuungsmaß eine Standardabweichung gebildet. Für die vergleichbaren 311 Werte der beiden Verfahren wurde zunächst der Shapiro-Wilk Test für Normalverteilung durchgeführt. Dieser zeigte weder bei den TruCOUNT®- noch bei den Zentrallaborwerten eine Normalverteilung. Aufgrund dessen wurde zur statistischen Signifikanzmessung als nicht-parametrischer Test der Wilcoxon-Rangsummentest (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) verwendet. Zur Überprüfung einer Korrelation wurde der parameterfreie Rangkorrelationskoeffizient Spearmens Roh angewandt. Des Weiteren wurde der paarige Vorzeichentest (Sign test, matched pairs) verwendet. Die Berechnungen wurden mit dem Programm Stata ausgeführt.

#### **2.4.3 Vergleich Zellreduktion Subpopulationen**

Als Signifikanztest wurde auch hier der Wilcoxon-Test oder der ebenfalls nicht-parametrischer Kruskal-Wallis Test verwendet, da die zugrunde liegenden ebenso wie o.g. Daten nicht normalverteilt sind. Die Berechnung wurde mittels SPSS oder Stata durchgeführt. Als Schwellenwert für die Wahrscheinlichkeit der Widerlegung einer Null-Hypothese wurde ein p-Wert von  $<0,05$  als signifikant definiert. Die jeweiligen Tests sind bei den Berechnungen im Text genannt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientencharakteristika und Studienverlauf

##### 3.1.1 Klinische Charakteristika der Studienpatienten

In der Zeit vom 20. Februar 2006 bis zum 20. Juni 2007 wurden 14 Patienten in diese Phase I Studie eingeschlossen, welche im Folgenden mit der Kodierung C101 bis C114 versehen sind. Die klinischen Angaben zu den untersuchten Patienten sind der folgenden Tabelle 14 zu entnehmen.

Patienten-Nr.	m/w	Alter	Erkrankung	Erkrankungs-status	Erst-diagnose (Jahr)	Vorthera-pien (Anzahl)	1. Gabe 1D09C3
C101	w	57	CLL	refraktär	1991	8	20.02.2006
C102	m	67	CLL	refraktär	1996	4	08.03.2006
C103	m	62	CLL	rezidiert	2001	2	29.05.2006
C104	m	69	CLL	refraktär	1992	5	31.05.2006
C105	m	69	CLL	rezidiert	1997	3	14.06.2006
C106	m	64	NHL <sup>1</sup>	rezidiert	1989	6	03.07.2006
C107	m	75	NHL <sup>2</sup>	refraktär	1997	5	23.08.2006
C108	m	66	CLL	refraktär	2004	5	18.09.2006
C109	w	64	CLL	rezidiert	2001	5	25.10.2006
C110	m	64	CLL	rezidiert	1998	3	22.11.2006
C111	m	45	NHL <sup>1</sup>	rezidiert	2001	5	28.02.2007
C112	w	74	CLL	refraktär	1995	8	13.03.2007
C113	m	73	CLL	refraktär	2006	1	18.04.2007
C114	m	71	HL	refraktär	2006	3	16.05.2007

Tab. 14, Klinische Angaben zu Studienpatienten, <sup>1</sup> NHL vom folliculärem Subtyp, <sup>2</sup> NHL vom diffus großzelligem Subtyp, Abkürzungen: m=männlich, w=weiblich

Von den 14 rekrutierten Patienten waren 3 weiblich (21%) und 11 männlich (79%), das mediane Alter bei Studieneinschluss lag bei 67 Jahren. 10 Patienten hatten eine Chronische lymphatische Leukämie (CLL), 3 ein Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und einer ein Hodgkin-Lymphom. Dabei wurden 8 Patienten als therapierefraktär eingestuft, d. h. es lag kein Ansprechen nach der letzten Standardtherapie vor oder es kam innerhalb von 6 Monaten zu einem Rezidiv. Die weiteren 6 Patienten hatten ein Rezidiv ihrer Erkrankung frühestens 6 Monate nach der letzten Therapie. Die Erstdiagnose war vor minimal 1 bis maximal 17 Jahren gestellt worden (Median: 8,5 Jahre). Die Patienten waren ausgeprägt vorbehandelt, im Median mit 5 Vortherapien (enthält Chemotherapien, Immunochemotherapien und Bestrahlungen).

### **3.1.2 Zusammenfassung der erreichten Testdosis, Verträglichkeit und des Therapieansprechens**

Die Dosissteigerung von 1D09C3 erfolgte analog zum Studienprotokoll entsprechend des „3+3-Schemas“ (s. Kapitel 1.4.3). Die entsprechend verabreichte Dosis pro Patient ist der folgenden Tabelle 15 zu entnehmen.

Patienten Nr.	Dosisstufe (mg/kg/d)	Anzahl 1D09C3	Therapieabbruch	Ansprechen d50	Folge-therapie	Überlebensstatus nach einem Jahr
C101	0,25	4	nein	SD	24.05.2006	verstorben
C102	0,5	4	nein	SD	31.05.2006	lebend
C103	0,5	4	nein	PD	05.08.2006	lebend
C104	0,5	4	nein	SD	08.08.2006	lebend
C105	1	4	nein	PD	18.08.2006	lebend
C106	1	4	nein	PD	keine	verstorben
C107	1	4	nein	PD	keine	verstorben
C108	2	3	ja	SD <sup>1</sup>	09.10.2006	verstorben
C109	2	4	nein	PD	03.03.2007	verstorben
C110	2	4	nein	PD	22.02.2007	lebend
C111	4	2	ja	SD	nicht bekannt	lebend
C112	4	4	nein	PD	keine	verstorben
C113	4	4	nein	PD	25.06.2007	verstorben
C114	8	1	ja	SD	18.07.2007	lebend

Tab. 15, Dosisstufen und Verlaufsangaben nach Therapie, <sup>1</sup> Ansprechen aufgrund vorzeitigen Studienaustritts an d29 beurteilt

Mit der Startdosis 0,25 mg/kg wurde entsprechend dem Protokoll und nach Abstimmung mit den Arzneimittel-Behörden nur 1 Patient behandelt, da diese Dosis einer zusätzlichen aber nicht erforderlichen Sicherheitsstufe vor Beginn mit der aus präklinischen Tiermodellen eigentlich empfohlenen Startdosis von 0,5 mg/kg entsprach. Von den 14 Patienten haben 11 die 4 geplanten Infusionen mit 1D09C3 erhalten (Mittelwert 3,6 Infusionen pro Patient). Von den 3 Patienten mit einer unvollständigen Therapieapplikation sind 2 auf eigenen Wunsch an Tag 22 (C108) und Tag 13 (C111) vorzeitig aus der Studie ausgetreten, bei dem Dritten (C114) wurde die Therapie aufgrund einer dosislimitierenden Toxizität (DLT) nach einmaliger Verabreichung beendet. Die Verlaufsbeobachtung am Tag 50 (bei einem Patient, C108, am Tag 29) mit Beurteilung des Therapieansprechen ergab bei 7 Patienten (50%) einen stabilen Krankheitsverlauf (stable disease, SD) und bei 7 Patienten eine progrediente Erkrankung

(progressive disease, PD). Als Überlebensstatus nach einem Jahr (bei den zwei ausgetretenen Patienten erhoben zum Zeitpunkt des vorzeitigen Endes der Studienteilnahme) waren von den 14 Patienten 7 verstorben und 7 Patienten lebend (50%). Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich in der Regel um mehrfach vorbehandelte Patienten mit weit fortgeschrittenem Krankheitsstadium handelte. Nach Verabreichung von 1D09C3 traten kaum infusionsbedingte Nebenwirkungen auf. Bei 4 Patienten traten 7 Fälle einer Grad III/IV Toxizität (Anämie, Neutropenie, Thrombopenie) auf, welche sich jedoch spontan oder nach Transfusionen spätestens innerhalb von 5 Tagen zurückbildeten. Im Allgemeinen zeigte die Studienmedikation eine gute Verträglichkeit, so dass die Dosisstufen problemlos bis 8 mg/kg gesteigert werden konnten. Als dokumentiertes schwerwiegendes Ereignis trat bei Patient C109 eine durch Tumordinfiltration bedingte Blasenblutung auf, welche nicht als DLT bewertet wurde. Bei dem letzten Patienten C114 trat am Tag nach der ersten Gabe von 1D09C3 Fieber auf. Eine veranlasste Röntgenaufnahme des Thorax ergab den Verdacht auf eine Pneumonie, welche mit einer intravenösen Antibiotikagabe behandelt wurde. Das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung des Blutes legte eine Infektion des Ports (permanenter zentralvenöser Zugang) nahe. Es war nicht auszuschließen, dass diese Infektion möglicherweise über eine medikamenteninduzierte Immunsuppression exazerbiert worden war. Der Vorfall wurde daher als DLT bewertet und weitere Gaben von 1D09C3 wurden bei dem Patienten ausgesetzt. Die Studie wurde innerhalb dieser Unterbrechung leider vorzeitig von Seiten der Herstellerfirma beendet. Diese Entscheidung erfolgte unter anderem aufgrund der im Kapitel 1.4.1 beschriebener Veröffentlichung wissenschaftlicher Daten, die die Instabilität von Antikörpern vom Typ IgG4 im menschlichen Organismus zeigten. Durch den vorzeitigen Studienabbruch konnte das formale Studienziel, die Ermittlung einer MTD, nicht erreicht werden. Dennoch konnten anhand der nachfolgend dargelegten Messungen die Wirkung des eingesetzten neuartigen Antikörpers 1D09C3 auf das Leukozytenprofil in den 14 rekrutierten Patienten analysiert und für wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn ausgewertet werden.

## **3.2 Verfügbare Blutproben und Etablierung des TruCOUNT®-Verfahrens**

### **3.2.1 Probenmaterial und Beobachtungszeitraum**

Der Großteil der hier untersuchten Blutproben wurde unter stationären Behandlungsbedingungen der Patienten abgenommen. Die meisten Analysen (96,5%) wurden innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme durchgeführt. Das gesetzte maximale

Zeitfenster von 24 Stunden für die Verarbeitung und Analyse der Proben musste in 5 Ausnahmefällen (1,2% aller Proben) kurzzeitig überschritten werden (bei C106, betraf die Messung 3-16; bei C107, betraf die Messungen 2-d4, 3-d4 und 4-d4 und bei C109, betraf die Messung 4-d4). Die Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über alle verwendeten Blutproben und den jeweilig erreichten Beobachtungszeitraum pro Patient.

Patienten-Nr.	Datum erste Probe	Datum letzte Probe	Anzahl aller Proben	Verhältnis tatsächlich gemessene Proben zu geplanten Proben laut Studienprotokoll (%)	Beobachtungszeitraum in Tagen
C101	20.02.2006	24.04.2006	35	97,2	64
C102	08.03.2006	10.05.2006	34	94,4	64
C103	29.05.2006	31.07.2006	36	100	64
C104	31.05.2006	04.08.2006	35	97,2	64
C105	14.06.2006	02.08.2006	33	91,7	50
C106	03.07.2006	08.09.2006	36	100	64
C107	23.08.2006	11.10.2006	35	97,2	50
C108	18.09.2006	09.10.2006	24	66,7	22
C109	25.10.2006	21.12.2006	36	100	64
C110	22.11.2006	05.02.2007	34	94,4	64
C111	28.02.2007	30.03.2007	16	44,4	30
C112	13.03.2007	03.05.2007	29	80,6	50
C113	18.04.2007	20.06.2007	36	100	64
C114	16.05.2007	20.06.2007	9	25	50

Tab. 16, verwendete Blutproben und Beobachtungszeitraum (das prozentuale Verhältnis tatsächlich gemessene Proben zu geplanten Proben laut Studienprotokoll bezieht sich auf die Gesamtzahl geplanter Proben unter der Annahme, dass jeder Patient das Studienprotokoll komplett mit 36 Blutabnahmen durchlaufen hätte).

17 vorgesehene Blutanalysen konnten aufgrund Fehlens der Blutprobe nicht ausgeführt werden (Tabelle 17). Bei einem Teil davon (8 Proben) war der Patient nicht zu der

Blutabnahme erschienen, bei einem weiteren Teil (9 Proben) wurde bei stationären Patienten die Blutabnahme nicht zum vereinbarten Termin durchgeführt. Bei einem Patienten (C112), welcher die Antikörper-Infusionen ambulant erhielt und einen weiten Anfahrtsweg hatte, verzichteten wir auf die sonntags durchzuführenden Blutabnahmen x-d6.

<b>Fehlende Blutproben</b>	
<b>Patienten-Nr.</b>	<b>Blutproben</b>
C101	3-d6
C102	3-08, d29
C104	1-d6
C105	2-d6, 4-d6
C108	3-16
C110	3-16, d36
C111	1-d4
C112	1-d6, 2-d6, 3-d6, 4-d4, 4-d6, d36, d64

Tab. 17, fehlende Blutproben

Für das vorliegende Projekt waren pro Patient im Rahmen des Studienprotokolls - unter Annahme einer verlustlosen Komplettierung aller Messungen - 36 Blutanalysen vorgesehen. Bei einer Gesamtzahl von 14 eingeschlossenen Patienten entsprach das einer formal erwarteten Anzahl von 504 Blutproben. Durch vorzeitigen Studienaustritt und Studienabbruch, entfielen protokollgemäß 59 Proben (1 aufgrund von Tod des Patienten, 30 durch Austritt aus Studie auf Wunsch, 1 aufgrund einer Folgetherapie, 27 durch komplette Beendigung der Studie), resultierend in einer Gesamtzahl von 445 zu erwartenden Proben. Aufgrund der 17 oben beschriebenen fehlenden Blutabnahmen, wurden tatsächlich 428 dieser 445 geplanten Blutproben asserviert und erfolgreich analysiert. Dies entspricht einer relativ hohen Probenausbeute von 96,2%. Relativ zur ursprünglich vorgesehenen Gesamtzahl von 504 Proben – unter Annahme jeder der 14 Patienten hätte die Studie komplett durchlaufen – entspricht die Ausbeute immerhin 84,9% (siehe auch Tab. 16). Bei 9 Proben (2,1%) der 428 Blutabnahmen erfolgte die Abnahme nicht an dem protokollgemäß

geplanten Datum. Diese Abweichungen traten ausnahmslos in der Nachbeobachtungsphase der Studie auf. Bei den frühen Zeitpunkten ein und zwei Wochen nach der letzten Applikation (d29 und d36) lag die Differenz maximal +/- 1 Tag und bei d50 maximal bei +/- 2 Tagen. Eine höhere Differenz kam in 3 Fällen zum Zeitpunkt d64 vor (C106 +4 Tage, C109 -9 Tage und bei C110 +12 Tage). Da es sich hierbei um einen relativ späten Mess-Zeitpunkt von 6 Wochen nach der letzten Infusion von 1D09C3 handelte, wurden auch diese 3 höheren Abweichungen in der Verlaufsbewertung als vergleichbar zu den eigentlichen Zeitpunkten gewertet. 100% der tatsächlich asservierten Proben konnten nach Erhalt erfolgreich aufgearbeitet, analysiert und durchflusszytometrisch ausgewertet werden, davon 98,8% innerhalb von 24 Stunden. Diese Werte zeigen, dass die Asservation des Patientenmaterials gut organisiert und methodisch problemlarm ausgeführt werden konnte. Eine besondere Variabilität innerhalb der durchflusszytometrisch erhobenen Ergebnisse aufgrund z. B. unterschiedlicher Probenabnahme, -lagerung oder -transport etc. war dadurch minimiert. Von den insgesamt 428 absolvierten Analysen erfolgten die ersten 69 (16,1%) durch das Protokoll 1. Die folgenden 359 (83,9%) Blutproben konnten inklusiver absoluter Leukozytenzählung mittels des TruCOUNT<sup>®</sup>-Verfahren im Protokoll 2 analysiert werden.

### **3.2.2 Etablierung und Validierung des TruCOUNT<sup>®</sup>-Verfahrens**

Die Einführung des TruCOUNT<sup>®</sup>-Verfahrens im Rahmen des Protokolls 2 diente der Ermöglichung der Absolutzählung von Zellsubpopulationen in der Durchflusszytometrie. Nur so war es uns möglich, z. B. die B-Zell Population eines Patienten in Absolutzahl pro Volumen Blut (z. B. 10E9/L oder Giga (G)/L) zu bestimmen. Im Rahmen der Etablierung und Validierung des TruCOUNT<sup>®</sup>-Verfahrens wurde die Vergleichbarkeit der in der Durchflusszytometrie mittels TruCOUNT<sup>®</sup> und der im klinischen Zentrallabor vorwiegend anhand der Zellgröße gezählten Leukozytenwerte an Blutproben von 6 Testpatienten ermittelt. Da die jeweilig bestimmten Leukozytenwerte weniger als 10% Abweichung zeigten, wurde die TruCOUNT<sup>®</sup>-Methode als feste Diagnostik innerhalb der Studie eingeführt. In der Tabelle 18 sind die mittels TruCOUNT<sup>®</sup>-Verfahren versus im Zentrallabor ermittelten Leukozyten-Werte für einen Beispielpatienten (C106) aufgeführt. Dabei ergibt sich gemittelt über die Werte des Patienten eine durchschnittliche Abweichung zwischen TruCOUNT<sup>®</sup>- und Zentrallaborverfahren von +/-1,91% (Standardabweichung 5,90%, Spannweite -10,9 bis +14,4%).

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Leukozyten TruCOUNT (G/L)</b>	<b>Leukozyten Zentrallab. (G/L)</b>	<b>Differenz beider Werte (%)</b>
1-08	11,52	12,36	7,3
1-12	7,88	7,80	-1,0
1-13	8,75	8,79	0,4
1-16	9,40	10,33	9,9
1-22	8,93	9,39	5,2
1-d2	9,97	11,40	14,4
1-d4	11,23	11,17	-0,5
1-d6	9,38	9,52	1,5
2-08	10,22	11,29	10,4
2-12	8,19	7,30	-10,9
2-13	7,55	7,91	4,8
2-16	9,14	9,24	1,1
2-22	10,43	11,07	6,2
2-d2	10,77	11,40	5,9
2-d4	12,01	11,73	-2,3
2-d6	10,66	10,32	-3,2
3-08	9,39	9,44	0,6
3-12	6,93	6,59	-5,0
3-13	6,28	6,48	3,2
3-16	7,57	7,62	0,6
3-22	8,84	7,68	-13,1
3-d2	7,86	8,48	7,9
3-d4	8,37	8,36	-0,1
3-d6	9,74	9,79	0,5
4-08	7,36	7,59	3,2
4-12	8,16	8,70	6,6
4-13	7,18	7,19	0,2
4-16	8,97	8,67	-3,4
4-22	9,17	9,67	5,4
4-d2	11,68	11,40	-2,4
4-d4	9,82	10,03	2,1
4-d6	9,46	9,66	2,1
d29	10,83	9,76	-9,8
d36	8,44	8,68	2,8
d50	10,94	12,13	10,8
d64	10,99	11,79	7,3

Tab. 18, Pat. C106, Vergleich Leukozyten Zentrallabor vs. TruCOUNT®

Insgesamt liegen von 311 der innerhalb der Studie analysierten Blutproben die durch beide Methoden bestimmten Leukozytenwerte für eine weitere retrospektive Gesamtbewertung der

Vergleichbarkeit vor. Alle vergleichbaren 311 Blutproben ergaben eine prozentuale Differenz der Leukozyten Absolutwerte im Mittel um  $\pm 1,76\%$  mit einer Standardabweichung von  $15,07\%$ . Statistisch zeigte sich gerechnet für alle Probenpaare ein Trend zu einem signifikantem Unterschied in den Messdifferenzen (Wilcoxon-Test  $p=0,0839$ ). Der Großteil der Abweichungen (bei 231 der 311 Proben, bzw.  $74,28\%$ ) liegt dabei in einem Toleranzbereich von  $\pm 10\%$ . Daneben bestehen vereinzelte Ausreißer mit über  $20\%$  Abweichung (bei 30 Proben, bzw.  $9,65\%$ ). In dem Scatterplot in der folgenden Abbildung 13 ist zu erkennen, dass vor allem bei leukämiebedingt abnorm hohen Leukozytenwerten ab etwa  $50 \text{ G/L}$  die Variabilität zwischen TruCOUNT<sup>®</sup>- und Zentrallaborwerten steigt. Der für zwischen beiden Methoden ermittelte Korrelationskoeffizient (Spearman-Roh Rang  $0,9830$ ) zeigt, dass insgesamt jedoch eine gute Korrelation zwischen den TruCOUNT<sup>®</sup>- und den Zentrallabor-Leukozytenwerten besteht.

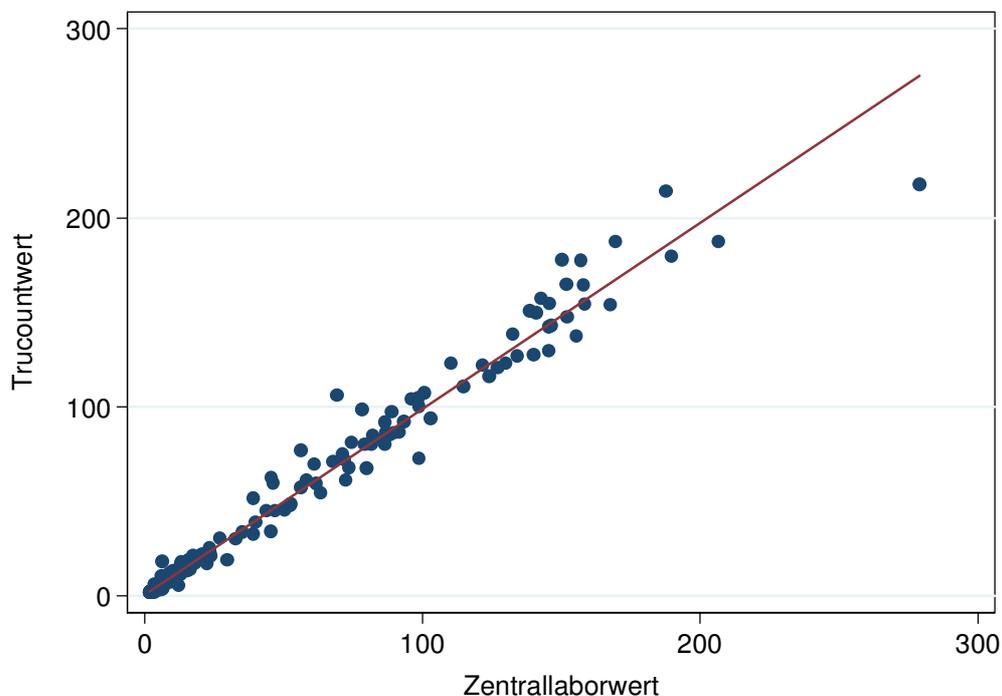


Abb. 13, Scatterplot aller vergleichbaren Werte in absoluten Leukozytenwerten

Betrachtet man für jeden Patienten einzeln die Wertepaare von TruCOUNT®- und Zentrallaborwerten im Verlauf graphisch, so ergibt sich kein klinisch relevanter Unterschied durch die aufgeführten Differenzen. Insgesamt sind die Messungen mittels TruCOUNT®-Beads als akzeptabel für die hier untersuchte Fragestellung anzusehen. Im Nachfolgenden wird daher ausschließlicher Schwerpunkt auf die Darstellung der durchflusszytometrisch ermittelten Werte gelegt. Nur im Falle der fehlenden TruCOUNT®-Bestimmung werden die Zentrallaborwerte zur Hilfe und Vervollständigung der Daten miteinbezogen (neben den Patienten C101 und C102 nach dem Protokoll 1 weitere in Kapitel 2.3.2.10 beschriebene 44 Messungen). Mögliche Ursachen für die tendenziell eher niedrigen Werte im TruCOUNT®-Verfahren werden im Diskussionsteil dieser Arbeit aufgeführt.

### **3.3 Leukozyten und ihre Subpopulationen vor und nach 1D09C3-Therapie**

#### **3.3.1 Exemplarischer Verlauf des Patienten C103**

Der an CLL erkrankte Patient C103 zeigte in der Blutabnahme 1-08 vor der ersten 1D09C3-Therapie eine Leukozytose von 80,97 G/L im Rahmen der Analyse mit TruCOUNT®-Beads. Nach der ersten 1D09C3-Infusion wurde zum Zeitpunkt 1-12 (30 Minuten nach Infusionsende) ein Leukozytenwert von 18,13 G/L gemessen. Das entspricht einer Reduktion im Vergleich zum Ausgangswert vor Infusion um 77,61%. Im weiteren Verlauf mit zunehmendem Abstand zur ersten Infusion von 1D09C3 kam es jedoch zu einer raschen Erholung der Werte mit einem leichten Rebound-Effekt. So wurden folgende Werte gemessen: zur Blutabnahme 1-13 eine Stunde nach Ende der 1D09C3-Infusion 30,55 G/L, zum Zeitpunkt 1-16 nach vier Stunden 51,57 G/L, zum Zeitpunkt 1-22 nach zehn Stunden 62,42 G/L und zum Zeitpunkt 1-d2 nach 24 Stunden mit 106,05 G/L sogar ein höherer Wert als vor Infusionsbeginn. Ein ähnlicher Verlauf konnte bei diesem Patienten auch bei den folgenden drei Infusionen von 1D09C3 ermittelt werden. Die nachfolgende Abbildung 14 zeigt die Leukozyten im kompletten Therapieverlauf dieses Patienten.

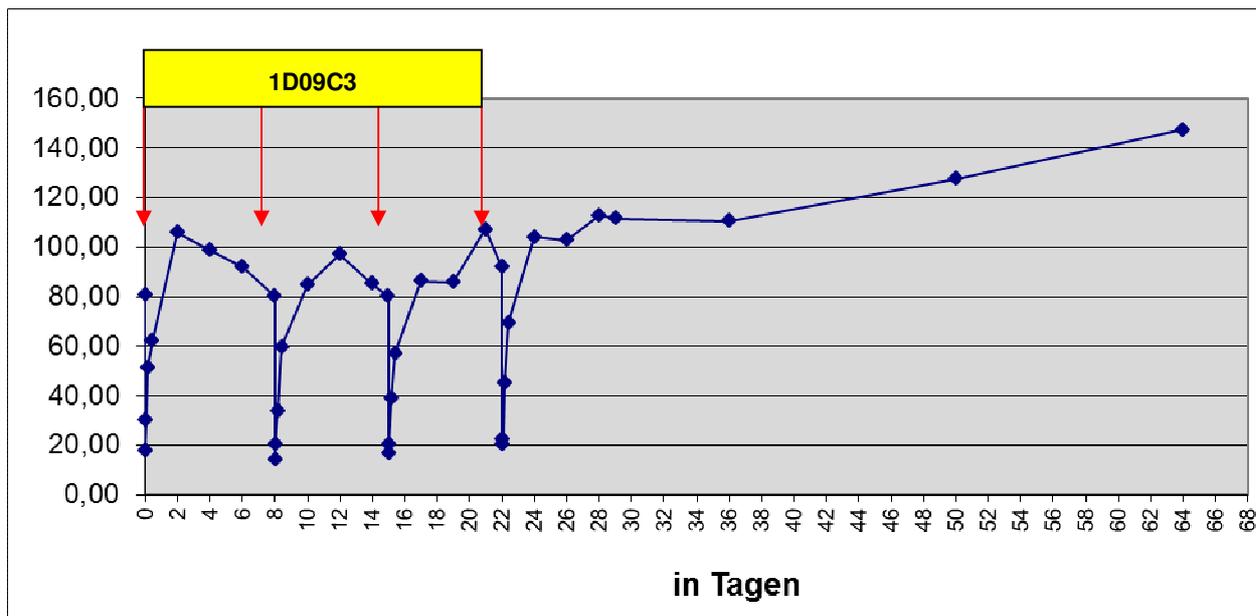


Abb. 14, Pat. C103 mit Leukozyten (G/L) im Therapieverlauf, welcher in Tagen nach erster Infusion dargestellt ist

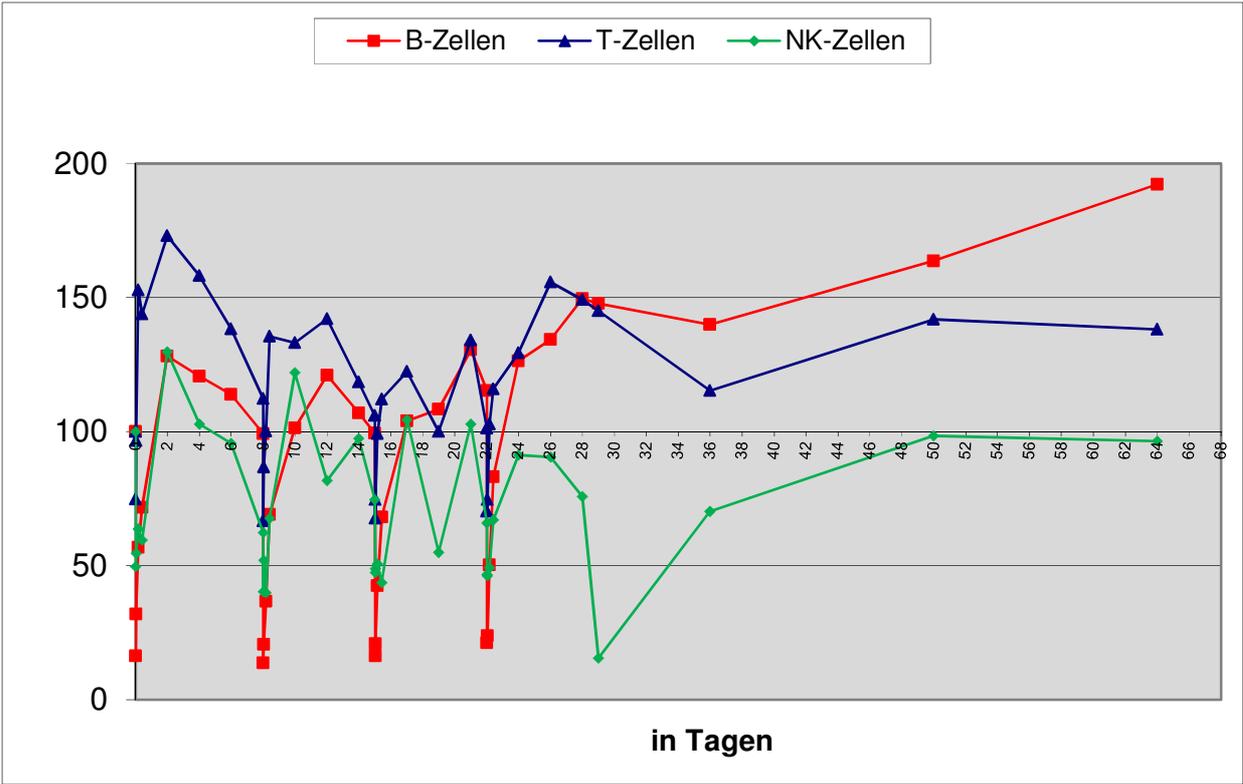
Die einzelnen Zellpopulationen lassen sich wie folgt darstellen: bei den B-Lymphozyten konnte nach der ersten Infusion eine Reduktion um maximal 83,79% verzeichnet werden (1-08 mit 71,81 G/L und 1-12 mit 11,64 G/L). Nach den folgenden Infusionen konnten maximale Reduktionen um 86,35%, 83,72% und 81,70% ermittelt werden. Die Granulozyten reduzierten sich nach der ersten Infusion um maximal 12,53% (von 4,53 auf 3,96 G/L), nach den folgenden Infusionen um maximal 41,03%, 24,14% und um 30,36%. Die T-Lymphozyten zeigten nach der ersten Infusion eine Reduktion um maximal 25,31% (von 1,96 auf 1,46 G/L), nach den folgenden Infusionen um höchstens 40,63%, 36,17% und um 30,67%. Die Monozyten zeigten eine Reduktion von maximal 65,12% (von 1,53 auf 0,53 G/L), sowie nach den folgenden Infusionen um 74,44%, 74,56% und um 64,68%. Die NK-Zellen reduzierten sich nach der ersten Infusion um maximal 50,41% (von 0,47 auf 0,24 G/L), nach den folgenden Infusionen um 35,38%, 36,52% und um 29,20%. Anhand von diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass alle Zellgruppen nach der durchgeführten Infusion zumindest zu dem jeweiligen Zeitpunkt x-12 in deutlich reduzierten Mengen im peripheren Blut nachweisbar waren. Dabei konnte bei den B-Lymphozyten die größte Verringerung verzeichnet werden.

In der folgenden Tabelle 19 sind tabellarisch alle ermittelten Werte des Patienten C103 als prozentuales Verhältnis zur ersten Blutabnahme 1-08 aufgelistet. Die Werte der ersten

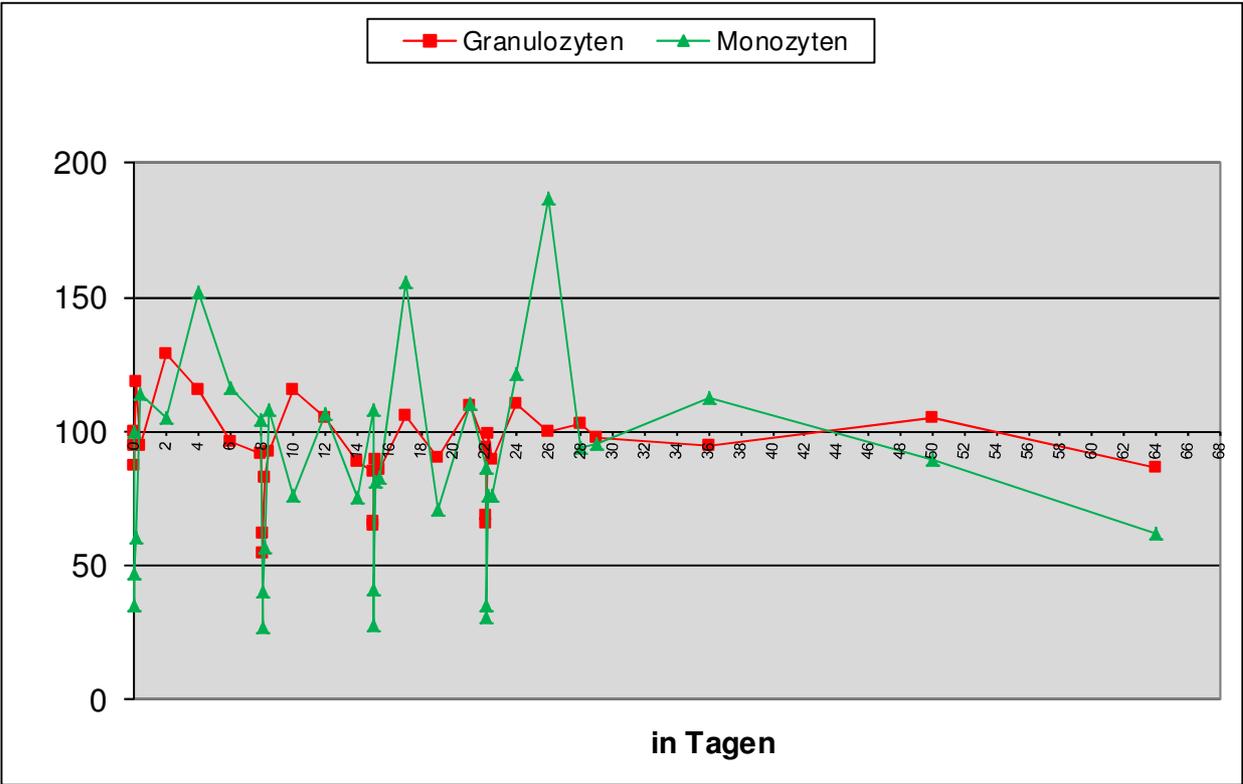
Blutabnahme 1-08 vor Infusionsbeginn entsprechen 100% und die folgenden Werte sind in das Verhältnis zu diesem Ausgangswert gesetzt. Da sich die Ergebnisse der Blutabnahmen 4-d4, 4-d6 und d29 auf Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor beziehen sind diese Felder mit einem Stern markiert (Ursache in Kapitel 2.3.2.10 beschrieben). Die Zellwerte sind außerdem nochmals in Abb. 15A und B getrennt nach lymphozytären und myeloischen Zellgruppen veranschaulicht. In dieser Darstellung können gut die Verläufe der einzelnen Populationen in Relation zu den Ausgangs-Zellzahlen des Patienten vor der ersten Behandlung verfolgt werden. Auffällig ist, dass für alle Leukozyten-Subpopulationen, außer den NK-Zellen, eine ähnliche Kinetik mit Erreichen des jeweiligen Nadirs zum gleichen Zeitpunkt x-12 nach Infusionsende auftrat.

Abnahmezeitpunkt (Woche-Uhrzeit/Tag)	Stunden nach 1. Infusion	Leuko- zyten (%)	Granulo- zyten (%)	Mono- zyten (%)	B-Zellen (%)	T-Zellen (%)	NK- Zellen (%)
1-08	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1-12	0,5	22,39	87,47	34,88	16,21	74,69	49,59
1-13	1	37,73	94,69	46,67	31,83	96,64	54,54
1-16	4	63,70	118,60	60,21	56,73	152,74	63,55
1-22	10	77,10	94,40	114,13	71,68	143,79	59,40
1-d2	24	130,98	129,00	105,36	128,19	173,03	129,79
1-d4	72	121,99	115,54	152,02	120,65	158,16	102,77
1-d6	120	113,59	96,35	116,43	113,90	138,32	95,68
2-08	168	98,97	91,87	104,40	99,22	112,25	62,33
2-12	168,5	17,69	54,18	26,68	13,54	66,64	40,28
2-13	169	25,32	61,81	40,49	20,60	86,58	51,84
2-16	172	41,97	82,79	57,01	36,67	100,22	39,77
2-22	178	73,85	92,14	107,78	68,94	135,61	67,65
2-d2	192	104,79	115,58	75,75	101,34	133,21	122,06
2-d4	240	119,94	105,05	106,59	121,03	141,97	81,77
2-d6	288	105,44	88,89	75,60	106,82	118,36	97,31
3-08	336	99,08	85,08	108,21	99,47	105,95	74,55
3-12	336,5	20,77	64,55	27,53	16,20	67,63	47,32
3-13	337	25,49	65,99	41,04	20,85	74,62	48,77
3-16	340	48,00	89,11	81,44	42,43	99,17	50,56
3-22	346	70,86	85,95	82,51	68,08	112,00	43,58
3-d2	360	106,86	105,95	155,87	103,87	122,41	104,27
3-d4	408	106,19	89,94	70,90	108,39	100,04	54,93
3-d6	456	132,60	109,31	110,50	130,64	134,20	102,74
4-08	504	113,87	94,16	86,16	115,29	101,12	65,87
4-12	504,5	25,25	65,57	30,43	21,09	70,10	46,63
4-13	505	28,11	68,66	35,44	23,70	74,59	46,14
4-16	508	55,72	99,00	75,68	50,07	102,70	49,08
4-22	514	85,92	89,49	76,20	83,13	115,93	67,04
4-d2	528	128,68	110,33	121,74	126,29	129,39	91,28
4-d4	576	*127,20	100,17	187,23	134,26	155,80	90,46
4-d6	624	*139,39	102,53	93,64	149,58	149,15	75,83
d29	672	*138,01	97,25	95,33	147,90	145,01	15,46
d36	840	136,72	94,63	112,14	139,90	115,25	70,19
d50	1.176	157,49	105,33	89,42	163,62	141,84	98,36
d64	1.512	182,15	86,10	61,56	192,38	138,09	96,38

Tab. 19, Pat. C103, prozentuales Verhältnis der ermittelten Werte zur Blutabnahme 1-08. Die mit Stern markierten Werte wurden unter zur Hilfenahme von Zentrallaborwerten generiert.



A



B

Abb. 15A und B, Pat. C103 mit prozentualen Zellverläufen der lymphozytären (B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen) und der myeloischen Zellreihen (Granulozyten und Monozyten) im peripheren Blut nach 1D09C3 Gabe

Wie aus Abbildung 15A und B sowie Tabelle 19 ersichtlich, war die Reduktion der Leukozyten-Subpopulationen einschließlich der B-Zellen von äußerst kurzer Dauer und es kam zu einer Erholung der Werte auf Ausgangsniveau und darüber hinaus (Rebound) innerhalb von 24 Stunden. Dieses Verlaufsmuster der Blutwerte zeigte sich als charakteristisch für die Wirkweise des Antikörpers bei allen behandelten Patienten (siehe Folgekapitel) mit leichter Variabilität in den Zeitpunkten, zu welchen die jeweiligen Nadire und Rebound-Maxima auftraten (siehe Kap. 3.3.3 zur Kinetik der einzelnen Zellpopulationen). Bei den NK-Zellen erfolgte der Wiederanstieg nach maximalem Abfall etwas verzögerter als bei den übrigen Zell-Populationen (Dauer der NK-Zell-Reduktion in diesem Fall bis zu 10 Stunden). Bei den anderen Zellreihen kam es bei allen Therapiegaben innerhalb einer Stunde nach Infusionsende zu einer Umkehr der Werte mit Wiederanstieg. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die NK-Zellen nur bis zu 1% der gesamten Leukozyten betragen und in diesem niedrigem Absolutbereich eher Messschwankungen mit größerem Ausmaß in prozentualen Analysen auftreten. Des Weiteren verdeutlicht Abb. 15A und B, dass bei C103 der stärkste Rebound-Effekt für Monozyten, B- und T-Zellen zu verzeichnen war.

Die B-Zellen waren als potentiell Tumorkorrelat insbesondere in den CLL-Patienten als 1D09C3-Target von besonderem Interesse dieser Arbeit. Betrachtet man für Patient C103 nochmals die pro Therapiewoche erreichten Nadire der Leukozytenpopulationen von der 1. bis zur 4. 1D09C3-Gabe (Tab. 20), so ist kein kumulativer Trend oder Wirkeffekt des Antikörpers (z. B. zunehmende Reduktion des wiedererlangten Basiswertes vor Folgeinfusion) in Bezug auf die B-Zellen oder andere Zellgruppen erkennbar. Es bestätigt sich jedoch eine absolute Vermehrung der B- und T-Zellen insbesondere vor der 4. Gabe von 1D09C3 und/oder an Tag 29, während Monozyten und Granulozyten hier auf Ausgangsniveau zurückgekehrt waren bzw. die NK-Zellen sogar unter das Startniveau gesunken waren. Als Ursache für den Anstieg der B-Zellwerte gegen Ende der Therapie ist ein rascher Progress der Erkrankung zu nennen. Diese ausgeprägte Krankheitsdynamik war bei diesem Patienten jedoch auch schon vor der Therapie erkennbar mit Leukozytenverdopplungszeiten von 2 Monaten. Dieser Verlauf konnte durch die Therapie mit 1D09C3 nur kurzfristig unterbrochen werden.

<b>Leukozyten-Subpopulationen absolut (G/L)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulozyten</b>	<b>Monozyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>
Vor 1. Therapie (1-08)	80,97	4,53	1,53	71,81	1,96	0,47
Vor 2. Therapie (2-08)	80,13	4,16	1,60	71,25	2,20	0,30
Vor 3. Therapie (3-08)	80,22	3,85	1,65	71,43	2,08	0,35
Vor 4. Therapie (4-08)	92,20	4,26	1,32	82,79	1,98	0,31
Tag 29 (d29)	111,74	4,40	1,46	106,20	2,84	0,07
<b>Nadir absolut (G/L)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulozyten</b>	<b>Monozyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>
Nach 1. Therapie	18,13	3,96	0,53	11,64	1,46	0,24
Nach 2. Therapie	14,32	2,45	0,41	9,72	1,31	0,19
Nach 3. Therapie	16,82	2,92	0,42	11,63	1,32	0,21
Nach 4. Therapie	20,45	2,97	0,46	15,15	1,37	0,22
<b>Maximale Reduktion (%)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulozyten</b>	<b>Monozyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>
Nach 1. Therapie	-77,61	-12,58	-65,36	-83,79	-25,51	-48,94
Nach 2. Therapie	-82,13	-41,11	-74,34	-86,36	-40,45	-36,67
Nach 3. Therapie	-81,76	-24,16	-74,55	-83,72	-36,54	-40,00
Nach 4. Therapie	-77,82	-30,28	-65,15	-81,70	-30,81	-29,03
<b>Mittelwert der max. Reduktion</b>	-79,83	-19,53	-69,85	-83,89	-33,33	-38,66

Tab. 20, Absolute und relative Reduktion der Leukozytenpopulationen durch 1D09C3

Betrachtet man die relative Entwicklung der einzelnen Zellgruppen in C103 über alle 4 Zyklen statistisch, so besteht ein signifikanter Unterschied in der Tab. 20 gezeigten maximalen Reduktionen ( $p=0,0011$ ; Kruskal-Wallis Test). Im paarweisen Vergleich der maximalen Reduktion der B-Zellen im Vergleich zu der maximalen Abnahme in anderen Zellgruppen, so ist sie signifikant höher als die aller anderen Subpopulationen ( $p=0,0679$ , Wilcoxon-Mann-Whitney Test, Tab. 21). Die zweitstärkste Reduktion ist den Monozyten zuzuschreiben, welche signifikant stärker als die T-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten abfallen, jedoch signifikant weniger stark als die B-Zellen ( $p=0,0679$ , siehe Tab. 21).

<b>C103 Zyklus 1-4</b>	Maximale Reduktion B-Zellen	Maximale Reduktion T-Zellen	Maximale Reduktion NK-Zellen	Maximale Reduktion Granulozyten	Maximale Reduktion Monozyten
Maximale Reduktion B-Zellen					
Maximale Reduktion T-Zellen	p=0,0679 p=0,0625				
Maximale Reduktion NK-Zellen	p=0,0679 p=0,0625	p=1,0000 p=0,6875			
Maximale Reduktion Granulozyten	p=0,0679 p=0,0625	p=0,1441 p=0,3125	p=0,1441 p=0,3125		
Maximale Reduktion Monozyten	p=0,0679 p=0,0625	p=0,0679 p=1,0000	p=0,0679 p=1,0000	p=0,0679 p=1,0000	

Tab. 21, Statistischer paarweiser Vergleich der maximalen Reduktion der B-Zellen zur Reduktion anderer Leukozyten-Subpopulationen. Angegeben sind jeweils zwei p-Werte, der erste (oberhalb) für den paarweisen zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, der zweite (unterhalb) für den paarweisen einseitigen Vorzeichentest mit der Alternativhypothese, dass die Reduktion in der Population in Reihe 1 immer größer ist als die in der Population in Säule 1

Abb. 16 veranschaulicht für Pat. C103 die Entwicklung der einzelnen Subpopulationen gemessen als relativer Anteil des Gesamtkollektivs der Leukozyten vor (1-08) und nach 1D09C3-Therapie zum Zeitpunkt x-12, zu welchem die meisten Subpopulationen ihren Nadir durchliefen. Dabei wurden die Werte aufgrund des ähnlichen Zellverlaufs über alle 4 Zyklen gemittelt. Hierbei ist ersichtlich, dass die Zellgruppen und insbesondere die B-Lymphozyten zum Nadir-Zeitpunkt nach 1D09C3-Therapie nicht nur in absoluter Menge verringert waren, sondern dass der prozentuelle Anteil sich von den B-Zellen zugunsten der anderen Zellpopulationen, insbesondere der Granulozyten, verteilt hatte.

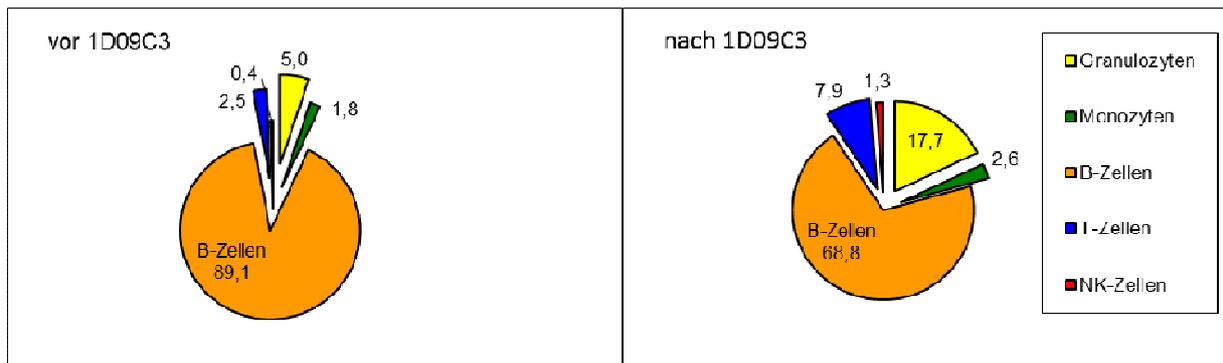


Abb. 16, Pat. C103, prozentuales Verhältnis der Zellpopulationen vor und nach 1D09C3 Gaben (Mittelwerte Zyklus 1-4)

### 3.3.2 Reduktion von Leukozyten und deren Subpopulationen aller Patienten

Die folgenden Grafiken und Tabellen zeigen den Verlauf der Leukozyten für alle 14 Patienten in kumulierter Form. Dabei sind die fehlenden Messwerte berücksichtigt und herausgerechnet.

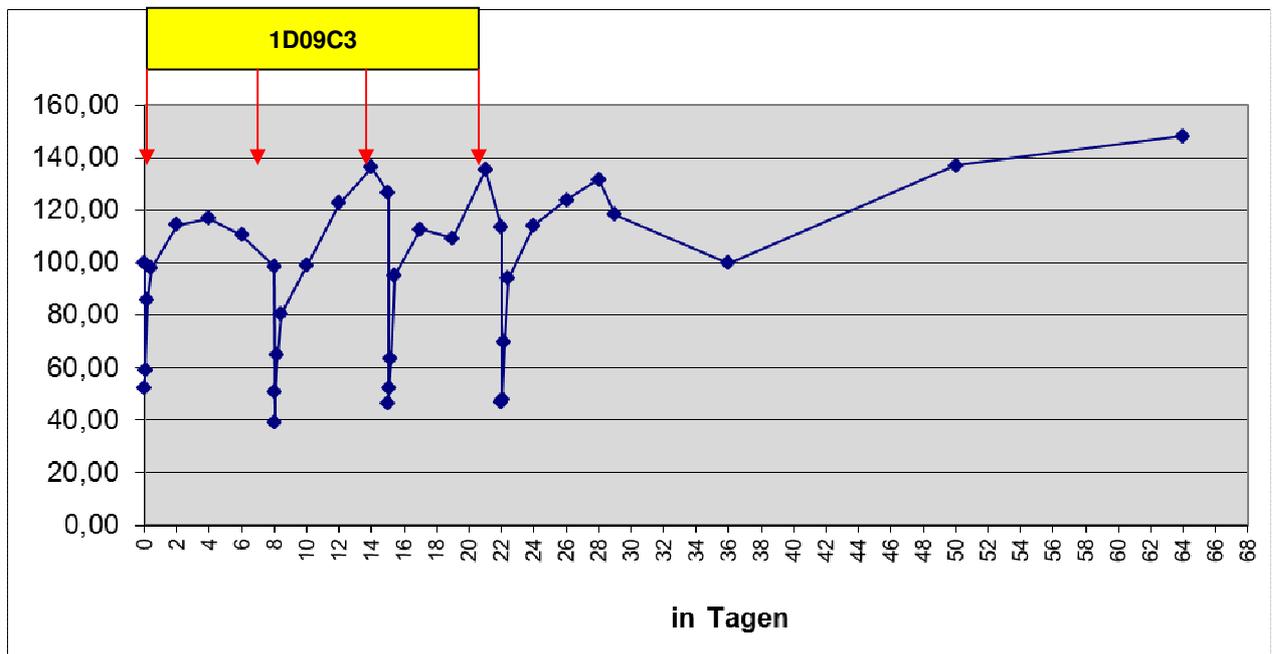
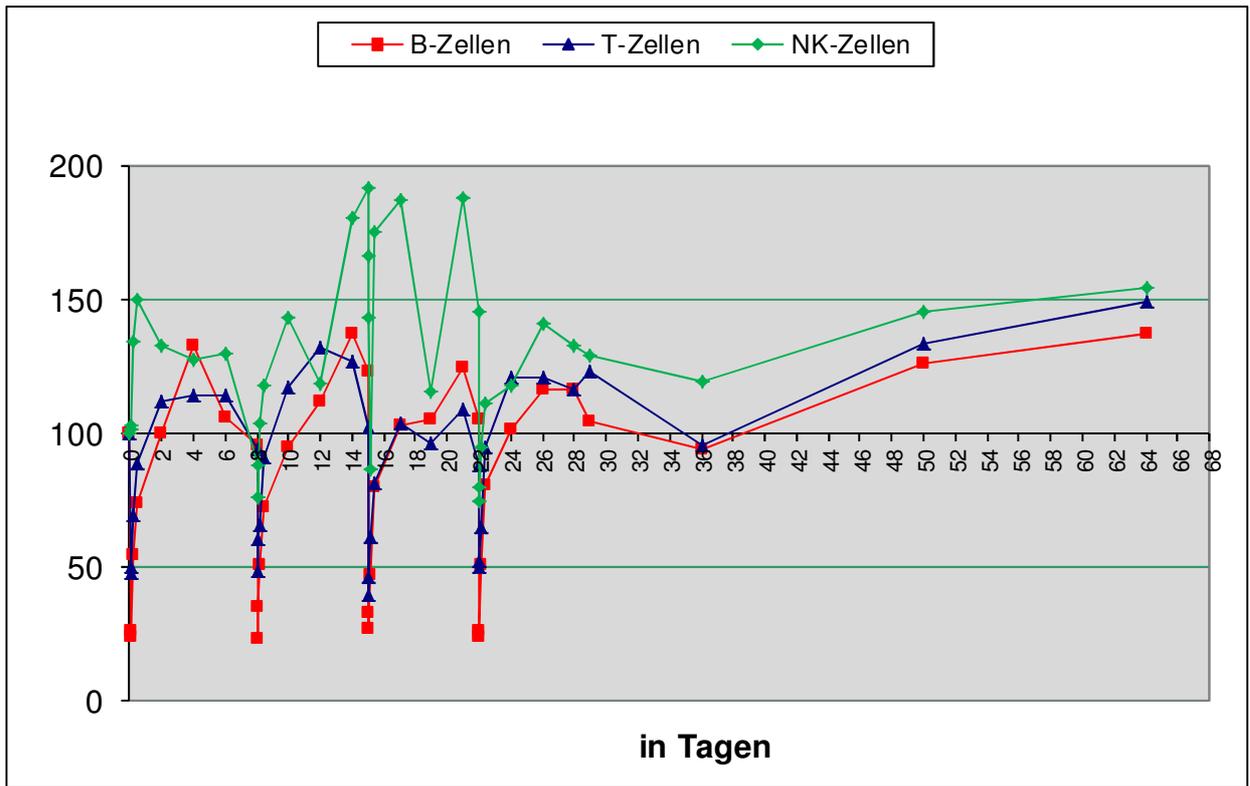
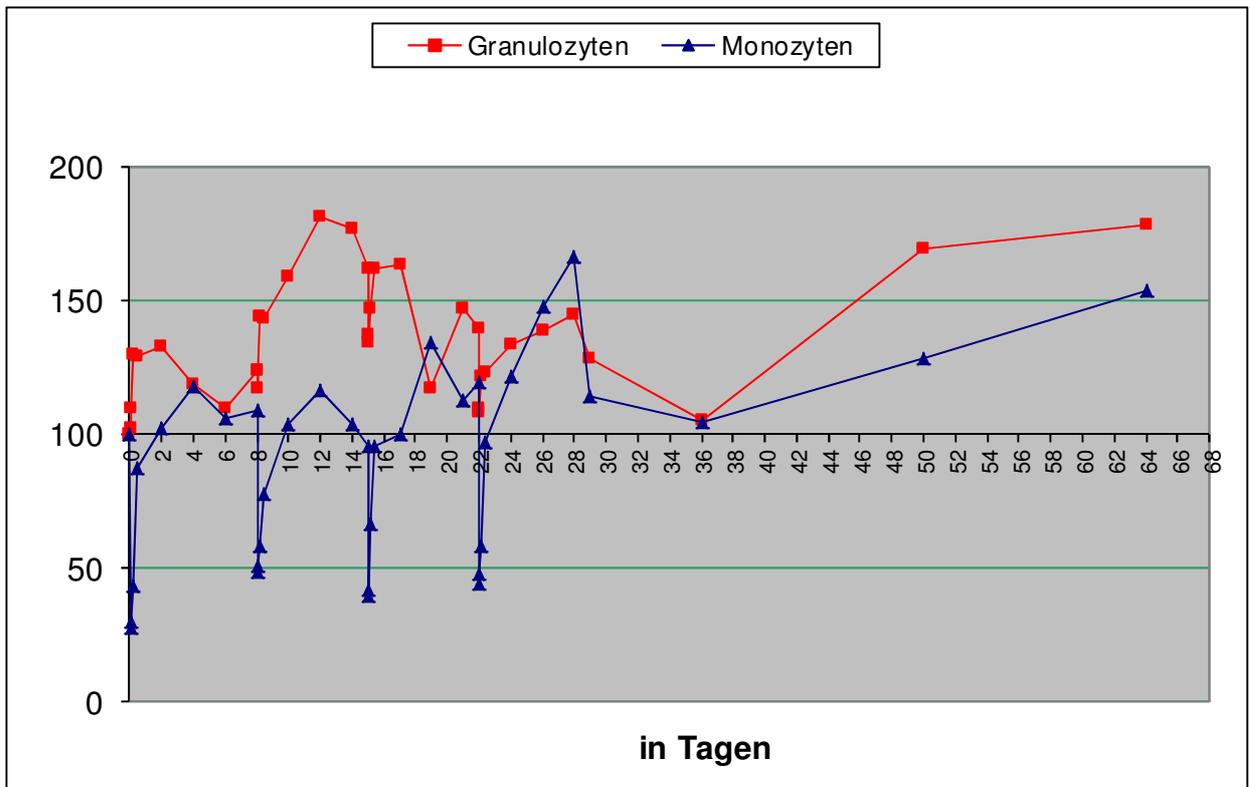


Abb. 17, Leukozyten-Mittelwerte aller Patienten C101-C114 im Therapieverlauf, Darstellung im prozentualen Verhältnis zur ersten Blutabnahme

In Abb. 17 sind anders als in der Abb. 14 des Patienten C103 die Leukozyten nicht als absolute Werte in G/L angegeben, sondern als Mittelwerte aller Patienten im prozentualen Verhältnis zu der ersten Blutabnahme 1-08. Dabei kann der charakteristische Verlauf analog zu dem am Beispiel C103 gezeigten Muster erkannt werden. Direkt nach der Infusion von 1D09C3 fielen die im peripheren Blut gemessenen Leukozyten um ca. 50% auf ihren Minimalwert zum Zeitpunkt x-12 und stiegen innerhalb der Messungen nach 10 bis 24 Stunden wieder auf das ursprüngliche Niveau an. Ab dem zweiten Tag nach der Medikamentengabe und bis zur nächsten Infusion lagen die Leukozyten in einer höheren Konzentration vor als vor Infusion. Dieser überschießende Anstieg wiederholte sich nach jeder Therapiegabe und zeigte bei einzelnen Patienten sogar eine leichte Kumulation. In der Nachbeobachtungsphase war eine weitere Zunahme der mittleren Leukozyten in der Relation zum Therapiebeginn zu verzeichnen, die durch die Progression der Erkrankung bei einem Großteil der behandelten Patienten nach Therapieende zu erklären war. Zur besseren visuellen Differenzierung sind die Zellwerte nochmals in Abb. 18A und B getrennt nach lymphozytären und myeloischen Zellgruppen aufgeführt. In dieser Darstellung können erneut die Verläufe der einzelnen Populationen in Relation zu den Ausgangs-Zellzahlen der Patienten als prozentuale Mittelwertdarstellung vor der ersten Behandlung verfolgt werden.



A



B

Abb. 18A und B, Mittelwerte aller Patienten mit prozentualen Zellverläufen der lymphozytären (B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen) und der myeloischen Zellreihen (Granulozyten und Monozyten) im peripheren Blut nach 1D09C3 Gabe

Abb. 18A und B zeigen erneut am Gesamt-Kollektiv der Patienten, dass durch 1D09C3 die Reduktion der Leukozyten-Subpopulationen einschließlich der B-Zellen von äußerst kurzer Dauer war. Ebenso wie vorher am Beispielpatienten C103 kam es zu einer Erholung der Werte auf Ausgangsniveau und darüber hinaus innerhalb von 24 Stunden. Die stärkste Reduktion und auch die stärksten Rebound-Effekte sind bei Monozyten, B- und T-Zellen zu verzeichnen. Die höchsten Anstiege erzielen dagegen die Granulozyten und die NK-Zellen.

In der Tabelle 22 sind die Subpopulationen als absolute und prozentuale Reduktionen in ihren minimalen und maximalen Ausprägungen, sowie als Median dargestellt.

<b>Absolutwerte in G/L (Median, Streubreite)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulo- zyten</b>	<b>Mono- zyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>	
Vor 1. Gabe 1D09C3	11,3 3,9 - 294,3	2,8 0,3 - 8,8	0,6 0,1 - 2,7	7,2 0,0 - 286,3	1,5 0,1 - 5,3	0,1 0,0 - 4,3	
Vor 2. Gabe 1D09C3	13,4 3,7 - 182,8	2,3 0,7 - 8,0	0,5 0,1 - 2,0	9,1 0,0 - 176,7	1,8 0,1 - 4,8	0,1 0,0 - 2,8	
Vor 3. Gabe 1D09C3	15,4 5,4 - 211,8	3,6 0,7 - 7,4	0,5 0,1 - 2,7	42,4 0,0 - 203,2	2,1 0,2 - 5,6	0,1 0,0 - 4,5	
Vor 4. Gabe 1D09C3	53,3 4,0 - 203,4	3,0 0,8 - 5,8	0,8 0,1 - 2,4	47,6 0,0 - 194,7	1,7 0,1 - 5,1	0,2 0,0 - 2,9	
<b>Nadir absolut in G/L (Median, Streubreite)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulo- zyten</b>	<b>Mono- zyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>	
Nach 1. Gabe 1D09C3	8,4 1,7 - 192,8	2,6 0,3 - 6,8	0,1 0,0 - 0,6	1,7 0,0 - 187,0	0,6 0,0 - 3,1	0,1 0,0 - 2,1	
Nach 2. Gabe 1D09C3	7,7 1,6 - 98,9	1,8 0,6 - 7,4	0,2 0,0 - 0,5	2,3 0,0 - 94,2	0,6 0,0 - 2,7	0,1 0,0 - 1,2	
Nach 3. Gabe 1D09C3	11,6 2,1 - 84,7	2,1 0,7 - 5,2	0,2 0,0 - 0,8	6,9 0,0 - 80,2	0,6 0,0 - 2,4	0,1 0,0 - 1,1	
Nach 4. Gabe 1D09C3	8,2 1,6 - 86,8	2,7 0,7 - 6,1	0,2 0,0 - 0,8	1,5 0,0 - 80,8	0,6 0,0 - 2,9	0,1 0,0 - 1,2	

<b>Maximale Zellreduktion der Therapie in % zum Vorwert (Median, Streubreite)</b>	<b>Leukozyten</b>	<b>Granulozyten</b>	<b>Monozyten</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>NK-Zellen</b>	<b>Reduktionsdifferenz der Zellpopulationen (p-Wert, Kruskal-Wallis test)</b>
Nach 1. Gabe 1D09C3	60,8 (-0,8) - 81,6	2,8 (-31,0) - 36,5	74,6 34,5 - 94,7	80,0 34,8 - 98,6	54,2 25,3 - 86,5	24,2 (-124,6) - 80,2	0.0001
Nach 2. Gabe 1D09C3	64,0 20,6 - 85,2	13,9 (-15,0) - 50,7	75,6 15,1 - 93,5	79,0 46,7 - 98,9	45,7 29,0 - 81,6	24,2 (-85,2) - 78,1	0.0001
Nach 3. Gabe 1D09C3	67,5 25,8 - 84,5	24,1 (-35,5) - 33,5	71,4 33,5 - 94,3	82,3 61,0 - 98,5	68,2 28,1 - 90,8	21,0 (-25,3) - 74,7	0.0001
Nach 4. Gabe 1D09C3	60,3 (-10,9) - 88,6	8,4 (-79,8) - 52,7	70,0 42,7 - 91,9	81,7 53,7 - 98,2	51,4 14,8 - 88,4	8,0 (-60,7) - 46,1	0.0001
<b>Kumulierte Zellreduktion (alle Gaben)</b>	62,1 (-10,9) - 88,6	8,4 (-79,8) - 52,7	73,0 15,0 - 94,7	81,6 34,8 - 98,9	54,2 14,8 - 90,8	24,0 (-124,6) - 80,2	0.0001
<b>Reduktionsdifferenz der einzelnen Gaben 1-4 (p-Wert, Kruskal-Wallis test)</b>	0,4611	0,2279	0,7418	0,8368	0,4280	0,2348	

Tab. 22, Alle Pat., absolute Werte vor Therapie, die Nadire nach Therapie und die jeweiligen prozentualen Reduktionen des Nadirs zum Wert vor der Therapie. Ein negativer Wert steht dabei für eine Zunahme der Zellzahl. Bei den Granulozyten und NK-Zellen ist zu beachten, dass zumeist kein regelhafter Verlauf nach den Therapien zu beobachten war. Zum Vergleich wurden hier jedoch auch die tiefsten Werte 30 oder 60 Minuten nach Therapie verwendet.

Tab. 22 verdeutlicht zum einen, dass die Ausgangs-Leukozytenwerte in den 14 behandelten Patienten sehr variabel waren (3,9 - 294,3 G/L), hauptsächlich bedingt durch die hohen Werte maligner B-Zellen in den CLL-Patienten. Entsprechend fielen auch die Reaktionen der einzelnen Subpopulationen auf die 1D09C3-Therapie sehr heterogen aus. Zum anderen zeigt die Tabelle, dass es, kumuliert über alle 14 Patienten, nach allen 4 Therapiegaben im Median zu einer signifikanten Reduktion aller Leukozyten-Subpopulationen kam. Dabei nahmen die gesamten Leukozyten im Schnitt um 62,1% ab. Der größte Anteil dieser Reduktion entfiel dabei auf die B-Zellen mit einer medianen Reduktion um 81,6%. Die

zweitstärkste Reduktion zeigten mit 73% die Monozyten, welche jedoch nur eine sehr kleine Population im peripheren Blut darstellen. Bei den gezeigten Reduktionen kam es zu keiner signifikanten Veränderung der medianen Zellabnahme im Verlauf, auch wenn die stärksten Verminderungen eher im 3. Zyklus beobachtet wurden. Vergleicht man jedoch erneut relative Reduktion der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen pro Therapiegabe, so zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied (siehe p-Werte in letzter Spalte der Tabelle 22, Kruskal-Wallis-Test) in der Reduktion der B-Zellen, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten. Bei einem paarweisen statistischen Vergleich der unterschiedlichen Zellgruppen pro Therapiezyklus zeigte sich anhand der Daten aller Patienten erneut, dass die Reduktion der B-Zellen signifikant unterschiedlich war im Vergleich zur Reduktion der Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten (Tab. 23, paarweiser Wilcoxon-Mann-Whitney Test).

<b>Alle Patienten Therapie 1-4</b>	Maximale Reduktion B-Zellen	Maximale Reduktion T-Zellen	Maximale Reduktion NK-Zellen	Maximale Reduktion Granulozyten	Maximale Reduktion Monozyten
Maximale Reduktion B-Zellen					
Maximale Reduktion T-Zellen	p<0,0001 p<0,0001				
Maximale Reduktion NK-Zellen	p<0,0001 p<0,0001	p<0,0001 p=0.0047			
Maximale Reduktion Granulozyten	p<0,0001 p<0,0001	p<0,0001 p<0,0001	p=0,0419 p=0,0106		
Maximale Reduktion Monozyten	p=0,0071 p=0,0019	p<0,0001 p=1,0000	p<0,0001 p=1,0000	p<0,0001 p=1,0000	

Tab. 23, Paarweiser Vergleich der medianen maximalen Zellreduktion pro 1D09C3-Therapie (alle 4 Infusionen) und Leukozyten-Subpopulation. Angegeben sind jeweils zwei p-Werte, der erste (oberhalb) für den paarweisen zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, der zweite (unterhalb) für den einseitigen Vorzeichentest mit der Alternativhypothese, dass die Reduktion in der Population in Reihe 1 immer größer ist als die in der Population in Säule 1

Die p-Werte bestätigen statistisch, dass - betrachtet für alle 4 Therapien und alle Patienten - die Reduktion in der B-Zell-Population mit statistischer Signifikanz höher war als die jeder anderen Population. Entsprechend war die Reduktion der Monozyten mit der Wahrscheinlichkeit 1 immer höher als die der T-Zellen, NK-Zellen und Granulozyten, jedoch signifikant niedriger als die der B-Zellen.

Das durch die Zellreduktion veränderte Verhältnis der einzelnen Leukozytensubpopulationen ist erneut in der folgenden Abb. 19 grafisch verdeutlicht. Dabei entspricht das erste Kuchendiagramm den für alle 14 Patienten und 4 Behandlungstage kumulierten prozentualen Werten jeweils vor den Infusionen (1-08) und das zweite Diagramm den Werten 30 Minuten nach der vierten Infusion (4-12). Es wurde jedoch nicht die erste Blutabnahme als 100% gesetzt, sondern das jeweils tatsächlich vorliegende Verhältnis der Populationen in einer Messung ermittelt, kumuliert und als Mittelwert dargestellt. Auch hierbei ist zu erkennen, dass kumuliert für alle Patienten die B-Lymphozyten und die Monozyten die Populationen darstellen, welche die stärkste Verringerung aufweisen. Dahingegen war die Reduktion Granulozyten nicht so stark und weisen dadurch nach der Therapie einen erhöhten prozentualen Anteil am Gesamtkollektiv der Leukozyten auf.

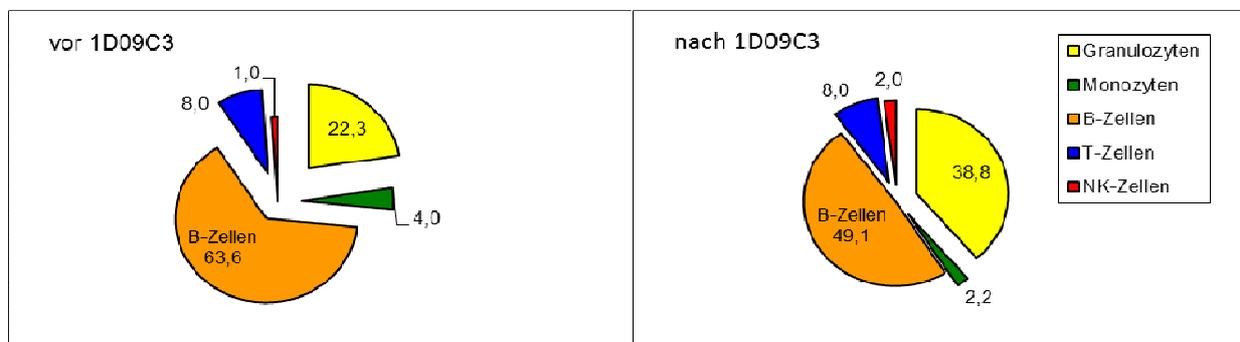


Abb. 19, Alle Patienten, prozentuales Verhältnis der Zellpopulationen kumuliert und gemittelt vor jeweiligen Infusionen und 30 Minuten nach letzter Infusion

### 3.3.3 Zeitliche Kinetik der Leukozyten und der Subpopulationen

Die Reduktion der Leukozyten von 1D09C3 zeigte sich wie bereits beschrieben nur für ein begrenztes Zeitfenster. Die weiteren Analysen dieser zeitlichen Kinetik sind in der folgenden Tabelle 21 dargestellt.

Patienten-Nr.	Wiedererlangen des Leukozyten-Ausgangswert nach Durchschreiten des Nadirs (vor Folge-Infusion +/-5% in Std.)				
	nach 1. Gabe 1D09C3	nach 2. Gabe 1D09C3	nach 3. Gabe 1D09C3	nach 4. Gabe 1D09C3	Mittelwert 1.-4. Gabe
C101	4	4	168	24	50
C102	10	24	24	10	17
C103	24	24	24	24	24
C104	4	1	168	10	46
C105	10	168	24	72	69
C106	72	10	10	*	23
C107	4	72	4	24	26
C108	72	24	168	-	88
C109	24	72	72	24	48
C110	10	10	10	4	9
C111	*	4	-	-	2
C112	24	72	72	168	84
C113	10	10	24	10	14
C114	*	-	-	-	*
Mittelwert	22	38	64	37	40

Tab. 24, Aufstellung der zeitlichen Kinetik der Leukozyten, mit „\*“ markiert bedeutet eine fehlende Zellreduktion

In dieser Aufstellung ist das Wiedererlangen des Leukozyten-Ausgangswertes nach den jeweiligen Infusionen von 1D09C3 gezeigt. Es handelt sich um Angaben in Stunden +/- 5% nach denen der Leukozytenwert vor der jeweiligen Infusion wieder erlangt wurde. In nur 3 Fällen kam es zu keiner Veränderung oder zu einer primären Erhöhung der Leukozytenwerte nach Infusion. Diese Felder sind in der Tabelle entsprechend gekennzeichnet und aus der Berechnung entnommen. In den Fällen, wo der Ausgangswert bis zur nächsten Infusion nicht wieder erreicht wurde, haben wir als statistischen Näherungswert die andauernde Reduktion der Zellen von mindestens 7x24 Stunden (168 Std.) verwendet. Die Mittelwerte der Erholungszeiten liegen bei 22, 38, 64 und 37 Stunden für die Therapien 1-4 und gemittelt über alle 4 Infusion bei 40 Stunden. Es ist anhand dieser Analysen zu erkennen, dass in den meisten Fällen die Zellreduktion von 1D09C3 spätestens innerhalb von 48 Stunden wieder aufgehoben wurde. Zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen sind diese in der folgenden Tabelle 25 separat aufgeführt. Dabei sind die Granulozyten und die NK-Zellen nicht enthalten, welche in der Regel keine therapieassoziierte Reduktion zeigten und oftmals sehr variable Verläufe hatten.

Mittlere Erholungszeit der Leukozyten-Subpopulationen (Stunden)	1. Gabe 1D09C3	2. Gabe 1D09C3	3. Gabe 1D09C3	4. Gabe 1D09C3	Mittelwert 1.-4. Gabe
Leukozyten	22	38	64	37	40
Monozyten	54	64	55	50	56
B-Lymphozyten	36	38	64	50	47
T-Lymphozyten	45	29	42	35	38

Tab. 25, Vergleich der mittleren Erholungszeit der Leukozyten-Subpopulationen pro Zyklus und im Gesamtverlauf der Therapie

Entsprechend der Tabelle 25 weisen Monozyten und B-Lymphozyten eine mittlere Reduktionsdauer von 47-56 Stunden auf. Es bestanden kein signifikanter Unterschied in der mittleren Erholungszeit im Vergleich zu T-Lymphozyten sowie keine signifikante Verlängerung der Erholungszeiten im Therapieverlauf. In dem Vergleich von B-Lymphozyten einerseits sowie Monozyten und T-Lymphozyten andererseits ist zu berücksichtigen, dass die B-Lymphozyten quantitativ bei CLL-Patienten in der Regel eine sehr große Zellpopulation darstellt. Dagegen handelt es sich bei den nicht-malignen Monozyten und T-Lymphozyten um sehr kleine Zellpopulationen, wo bereits geringe Messschwankungen eine größere Auswirkung auf den Verlauf der Zellreduktion haben.

Neben der maximalen Zellreduktion zum Zeitpunkt x-12, sei das unmittelbar danach beobachtete Rebound-Phänomen mit einem überschießenden Anstieg der Leukozytenwerte kurz eruiert. In insgesamt 50 Therapiezyklen von 14 Patienten kam es in 43 Fällen (86%) zu einem überschießenden Anstieg der Gesamt-Leukozyten nach der zeitlich begrenzten Zellreduktion. Dabei ist die Grenze bei einer Zunahme um mindestens 5% über den Leukozytenwert vor der Infusion gelegt. Die prozentualen Maximalwerte der Leukozyten pro Patient und Therapie sind in Tabelle 26 aufgeführt. Sie traten am häufigsten nach 24 bis 120 Stunden auf (Mittelwert 74 Stunden). In 35 Fällen (81,4%) kam es zu einem erneuten Abfall dieses Rebounds (mindestens Abnahme von 5%), jedoch aufgrund der zum Teil progredienten Krankheitsdynamik nicht immer auf oder unterhalb des Ausgangswertes vor Therapiebeginn.

Erreichter relativer Leukozyten-Maximalwert (%) und Zeitpunkt in Stunden		1. Gabe 1D09C3	2. Gabe 1D09C3	3. Gabe 1D09C3	4. Gabe 1D09C3	Mittelwert der erreichten Maximalwerte Zyklus 1-4
C101	%	118	109	Nein	117	115
	Std.	10	72		24	35
C102	%	119	122	109	114	116
	Std.	120	120	120	24	96
C103	%	131	121	134	122	127
	Std.	24	72	120	120	84
C104	%	150	135	Nein	Nein	143
	Std.	24	1			13
C105	%	119	Nein	125	107	117
	Std.	24		72	72	56
C106	%	Nein	117	Nein	159	138
	Std.		72		24	48
C107	%	168	147	166	128	152
	Std.	24	168	24	120	84
C108	%	171	249	Nein	-	210
	Std.	72	120			96
C109	%	153	200	156	177	172
	Std.	120	120	120	120	120
C110	%	108	138	141	147	134
	Std.	72	120	24	168	96
C111	%	189	119	-	-	154
	Std.	4	24			14
C112	%	112	178	105	116	128
	Std.	72	72	72	168	96
C113	%	125	142	116	236	155
	Std.	24	24	24	24	24
C114	%	170	-	-	-	170
	Std.	120				120
<b>Mittelwert der Maximalwerte C101-C114</b>	%	141	148	132	142	141
	Std.	55	82	72	86	74

Tab. 26, Maximaler Leukozyten-Rebound im Vergleich zum Ausgangsniveau in allen Patienten im Therapieverlauf

Betrachtet man die einzelnen Subpopulationen, so war für jede Subpopulationen ein Rebound zu verzeichnen, jedoch unterschiedlich gewichtet bei den einzelnen Patienten und Zyklen. Dabei war kein systematischer Zusammenhang mit den Ausgangswerten, insbesondere den unterschiedlich hohen B-Zell-Werten, zu erkennen. Den stärksten und häufigsten Rebound erfuhren die Zellgruppen NK-Zellen und Monozyten (siehe Tab. 27).

Patient	Diagnose	B-Zell Population vor Therapie (G/L)	Maximal überschießende Zellpopulationen bis Tag 36
C101	CLL	286,97	Monozyten > Granulozyten > T-Zellen
C102	CLL	79,73	Monozyten > NK-Zellen > Granulozyten
C103	CLL	71,81	Monozyten > T-Zellen > <b>B-Zellen</b>
C104	CLL	7,16	NK-Zellen > T-Zellen > Monozyten
C105	CLL	129,41	Monozyten > NK-Zellen > <b>B-Zellen</b>
C106	NHL	0,26	NK-Zellen > <b>B-Zellen</b> > Monozyten
C107	NHL	0,01	Monozyten > Granulozyten > NK-Zellen
C108	CLL	58,0	NK-Zellen > Granulozyten > <b>B-Zellen</b>
C109	CLL	7,31	NK-Zellen > Monozyten > Granulozyten
C110	CLL	121,55	NK-Zellen > Granulozyten > T-Zellen
C111	NHL	0,54	T-Zellen > Granulozyten > <b>B-Zellen</b>
C112	CLL	5,89	NK-Zellen > T-Zellen > Granulozyten
C113	CLL	3,79	<b>B-Zellen</b> > T-Zellen > Granulozyten
C114	HL	0,05	NK-Zellen > T-Zellen > <b>B-Zellen</b>

Tab. 27, Leukozyten-Subpopulationen mit stärkstem Reboundphänomen (relativ zum Ausgangswert) pro Patient.

Ein Patient (C109) wies den stärksten Rebound in den B-Zellen auf (Abb. 20). Der Patient zeigte im weiteren Verlauf eine rasche Dynamik der Erkrankung und wurde 4 Monate später mit einer kombinierten Rezidiv-Chemotherapie behandelt. Abb. 20 fasst für jeden Patient die pro Therapiewoche erreichten B-Zell-Maxima zusammen, um zu beurteilen ob eine zunehmende Steigerung der mitunter malignen B-Zellen im Rahmen des Rebound-Phänomens zu beobachten war.

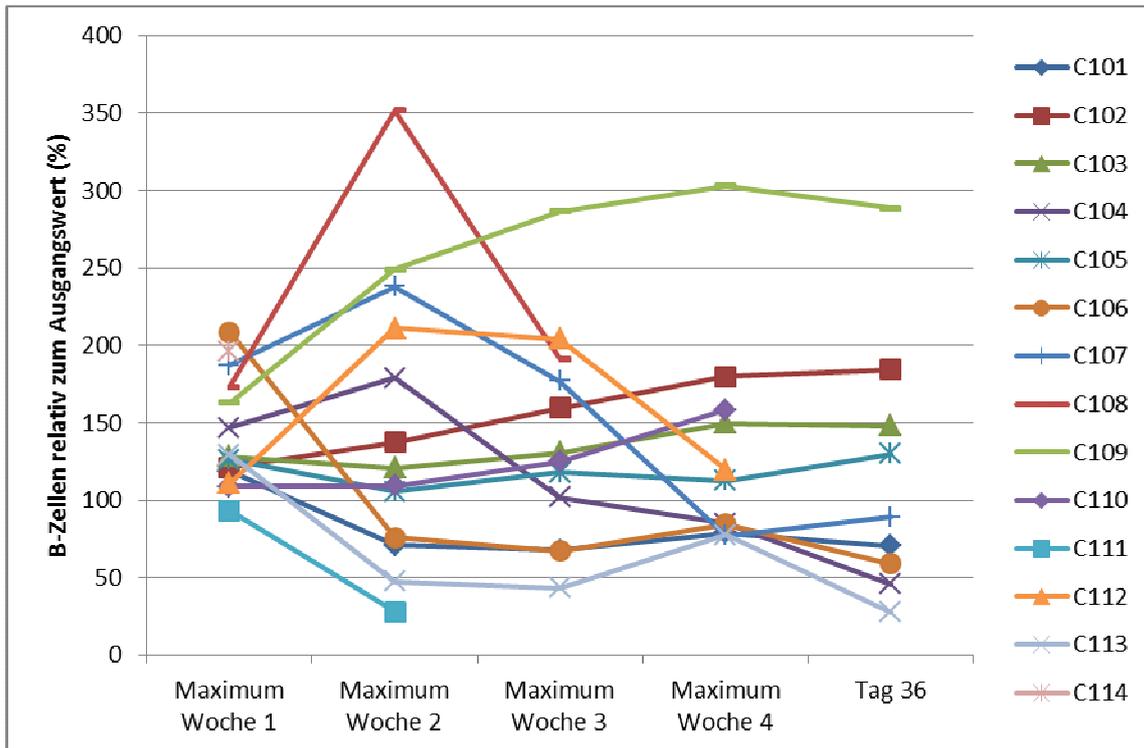


Abb. 20, Rebound-Maxima der B-Zellen pro Patient im Verlauf der Therapie

Die Abbildung zeigt, dass bei ausschließlicher Betrachtung der erreichten Rebound-Maxima von B-Zellen die Verläufe bei den Patienten heterogen waren. Bei 10 Patienten (z. B. C104, C112, C113) war eine (Wieder-)Abnahme der Maxima im Verlauf zu verzeichnen. Bei 4 Patienten, C102, C103, C109, C110, lag eine zunehmende Tendenz zum Therapieende vor. Hierbei handelt es sich jedoch um Patienten, welche sowohl vor als auch nach Therapie eine schnell progrediente Krankheitsdynamik mit hohen Leukozytenverdopplungszeiten hatten. Davon abgesehen, konnte durch das Rebound-Phänomen keine langfristige Erhöhung der Zellen verzeichnet werden.

### 3.3.4 Dosisabhängige Entwicklung der Leukozytensubpopulationen

In der folgenden Analyse wurden die Veränderungen der Leukozyten-Subpopulationen durch den Antikörper 1D09C3 in den steigenden Dosisstufen untersucht. Problematisch ist dabei, dass die sehr hohe Heterogenität der peripheren Blutwerte mit variablen Ausgangszellzahlen und Anteilen maligner Zellen eine Beurteilung der dosisabhängigen

Wirkungsweise des Antikörpers erschwert. Wie in den vorangegangenen Kapiteln mehrfach gezeigt, erfuhren die B-Zellen und Monozyten generell die stärkste Reduktion durch 1D09C3 (ca. 70-90%) und sollen daher schwerpunktmäßig analysiert werden. Betrachtet man die B-Zell-Reduktion nach Erstgabe von 1D09C3 im Vergleich zum Ausgangswert der B-Zellen vor Therapie, so lässt sich ein Trend für eine Abhängigkeit der relativen Reduktion vom Ausgangswert der B-Zellen erkennen (Abb. 20A). Hier dargestellt ist beispielsweise der B-Zell-Verlauf für 3 Patienten mit unterschiedlichen Ausgangswerten auf der Dosisstufe 2 mg, auf welcher 3 Patienten mit B-Zell-Werten mit ca. 7,6 und 121 G/L behandelt wurden. Hier konnte mit steigendem B-Zell-Niveau eine abnehmende Reduktion der B-Zellen um 98% (C109) versus 77-78% (C108, C110) durch 1D09C3 erzielt werden. Dieser Effekt konnte jedoch nicht auf allen Dosisstufen für Patienten mit unterschiedlichen B-Zell-Werten konsequent gesehen werden. Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der Monozyten auf der Dosisstufe 2 mg (Abb. 21B). Während bei Patient C109 mit 0,2 G/L Monozyten diese nach 1D09C3 nahezu unter der Nachweisgrenze fielen, wurden bei dem Patienten C110 mit 1,79 G/L erwartungsgemäß „nur“ um 85% der Monozyten verringert. Bei C108 hingegen mit 0,14 G/L würde man jedoch eine höhere Abnahme als um die gezeigten 71% auf 0,04 G/L erwarten. Es ist somit anzunehmen, dass neben der vorhandenen Zellzahl vor Infusion weitere Faktoren, wie z. B. die Dichte der HLA-DR-Expression auf den Zellen, sowie die Antikörper-Dosierung, mit einer Rolle für die Effizienz der Antikörperwirkung spielten. Hierzu wurden im Rahmen der Studie HLA-DR Expressions- und Sättigungsanalysen durchgeführt, auf die im Rahmen der Diskussion nochmal eingegangen wird.

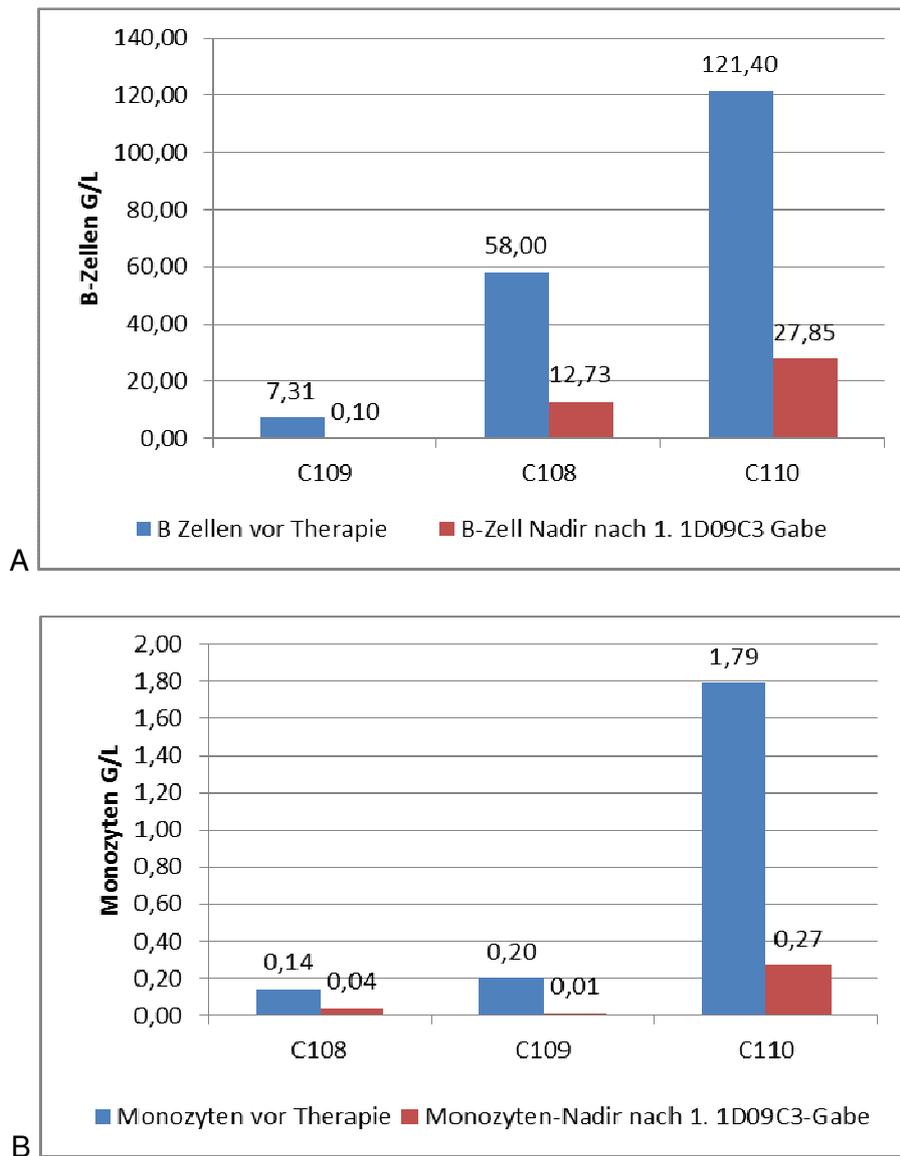


Abb. 21A und B, B-Zell- und Monozyten-Reduktion nach erster Behandlung mit 2mg 1D09C3 abhängig vom Ausgangs-Zell-Niveau

Wir untersuchten, ob trotz der unterschiedlichen Basiswerte für die B-Zellen und Monozyten eine Steigerung der Antikörper-Wirkung mit zunehmender Dosierung nachweisbar war. Hierzu beschränkten wir uns auf die Auswertung der Zellreduktion nach der 1. Gabe von 1D09C3 als Repräsentation des ersten Antikörper-Zell-Kontakts, um Effekte unterschiedlicher Rebounds, Kumulierung, etc. auszuschließen. Tab. 28 fasst die maximale

Verminderung der B-Zellen und Monozyten nach Erstgabe von 1D09C3 nach 4 Dosisclustern zusammen: Cluster 1 für 0,25-0,5 mg, Cluster 2 für 1 mg, Cluster 3 für 2 mg, Cluster 4 für 4-8 mg. Wir überprüften, ob statistisch ein signifikanter Unterschied in der B-Zell- und Monozytenreduktion in diesen 4 Dosisclustern bestand.

Cluster	Pat.-Nr.	B-Zellen (%)	Monozyten (%)	Wilcoxon-Mann-Whitney bzw. Kruskal-Wallis Test
<b>1</b> <b>(0,25-0,5 mg)</b>	C101	-50,37	-39,44	
	C102	-57,22	-32,19	
	C103	-83,89	-69,70	
	C104	-77,08	-65,67	
<b>2</b> <b>(1 mg)</b>	C105	-67,19	-68,30	
	C106	-89,09	-60,18	
	C107	-72,74	-69,13	
<b>3</b> <b>(2 mg)</b>	C108	-75,03	21,33	
	C109	-98,58	-92,49	
	C110	-75,77	-85,18	
<b>4</b> <b>(4-8 mg)</b>	C111	-86,91	-89,71	
	C112	-79,07	-56,51	
	C113	-95,58	-91,18	
	C114	-94,83	-87,27	
<b>Mittelwert</b>		<b>-78,81</b>	<b>-63,26</b>	

Tab. 28, Vergleich der B-Zell- und Monozyten-Reduktion nach Dosis-Clustern. Die letzte Spalte beschreibt die statistische Signifikanz der Unterschiede bei Vergleich von 2 und 4 Dosis-Gruppen in B=B-Zellen, M=Monozyten.

Dabei konnte insbesondere für die Monozyten bei Vergleich aller 4 Dosis-Cluster und Vergleich von 2 zusammengefassten Clustern (0,25-2mg versus 4-8 mg) ein signifikanter Anstieg der Reduktion gezeigt werden ( $p=0,0320$  bzw.  $0,0088$ , siehe Tab. 29, Wilcoxon-Mann-Whitney- oder Kruskal-Wallis-Test). Für die B-Zellen war der Anstieg bei Vergleich von 2 zusammengefassten Clustern signifikant ( $p=0,0476$ , Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Wie in Abb. 22 dargestellt, konnte für die B-Zellen eine logarithmisch ansteigende Verminderung mit zunehmenden Dosierungen im Rahmen eines Plateau- oder Sättigungseffektes nachgewiesen werden.

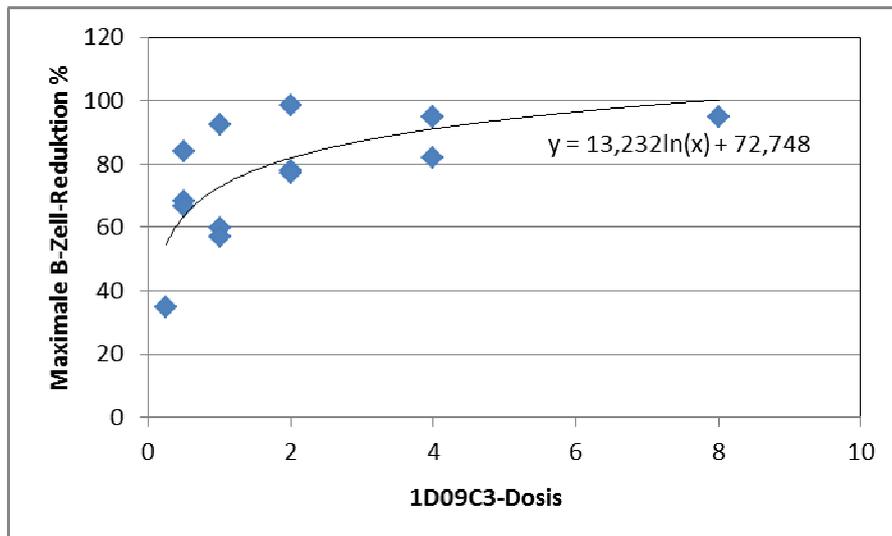


Abb. 22, Zunehmende Sättigung der B-Zell-Reduktion bei steigender 1D09C3-Dosis

Ein ähnlicher Effekt ließ sich für die Reduktion der Monozyten veranschaulichen (Abb. 23). Auch hier trat mit zunehmender Dosis von 1D09C3 eine Abflachung der maximalen Reduktion ein.

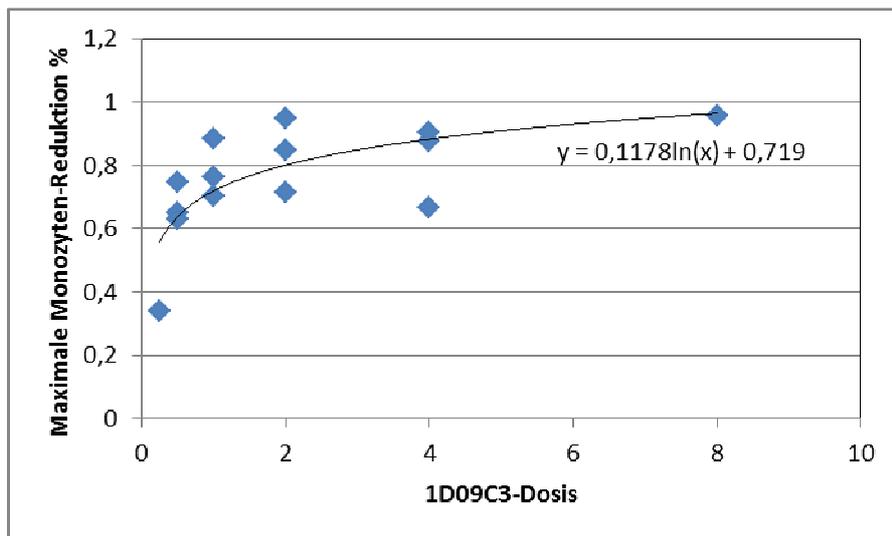


Abb. 23, Zunehmende Sättigung der Monozyten-Reduktion bei steigender 1D09C3-Dosis

Zu berücksichtigen bleibt, dass die Patienten, welche die Dosierungen 4 und 8 mg erhielten, nur wenig erhöhte wenn nicht normale Leukozytenwerte im peripheren Blut aufwiesen. Der Mittelwert der B-Zellen in Patienten der Dosierung 4 und 8 mg lag bei 2,6 G/L, bei den übrigen Patienten hingegen bei 76,2 G/L. Insofern ist eine Sättigung der B-Zell-Reduktion in den höheren Dosisstufen zu erwarten. Dennoch bleibt der rasche logarithmische Anstieg der Reduktionskurve in den B-Zellen bemerkenswert und zeigt, dass auch in niedrigen Dosisstufen, gerade bei Patienten mit ausgeprägter Leukozytose/B-Zell-Lymphozytose, ein bereits relativ starker Effekt durch 1D09C3 bewirkt werden konnte. Der ähnliche Plateau-Effekt in der Zellgruppe der Monozyten, welche als nicht-maligne Zellen wesentlich geringere Schwankungen in den Ausgangswerten (Mittelwerte zwischen 0,5-0,9 G/L in Dosierung 4/8 mg versus übrige Dosierungen) boten, deutet darauf hin, dass dies nicht nur durch Unterschiede in den Zellzahlen vor Therapie hervorgerufen war.

## 4 Diskussion

### 4.1 Besonderheiten im Patientenkollektiv und im Studiendesign

Bei der Bewertung der Studienergebnisse ist zu beachten, dass es sich bei den 14 Studienpatienten um ein verhältnismäßig schwieriges Patientenkollektiv handelt. Das mediane Alter lag bei 67 Jahren, die Erstdiagnose der Erkrankung lag im Median 8,5 Jahre zurück und die mediane Anzahl der Vortherapien lag bei 5 Therapien. Mit diesen Angaben wird verdeutlicht, dass es sich bei den untersuchten Studienteilnehmern um stark vorbehandelte und zumeist therapierefraktäre Patienten handelt. Ein Großteil der Patienten hatte zum Studieneinschluss einen ausgeprägt progredienten Krankheitsverlauf mit fehlendem Ansprechen auf verfügbare Standardtherapien. Zudem ist zu berücksichtigen, dass das primäre Prüfziel der untersuchten Phase 1 Studie die Ermittlung der Verträglichkeit und Sicherheit der Prüfsubstanz bei steigenden Dosierungen von 1D09C3 war. Ein solches Studiendesign hat zur Folge, dass die ersten Dosisstufen in der Regel unterhalb derer liegen, bei welchen ein therapeutischer Effekt zu erwarten wäre. Diese genannten Faktoren sollten Berücksichtigung finden in der Bewertung und Einschätzung des Antikörpers 1D09C3 in Bezug auf eine mögliche therapeutische Wirksamkeit.

### 4.2 HLA-DR als Zielstruktur bei lymphoproliferativen B-Zell-Neoplasien

Eine vergleichende Stimulierung von HLA-DR, -DP und -DQ bei B- und T-Lymphozyten zeigte nur über HLA-DR bei 60% der Zellen einen ausgelösten Zelltod [82]. Es konnte nachgewiesen werden, dass nicht alle Zellen, welche HLA-DR auf der Oberfläche exprimierten, aufgrund einer Antikörperbindung gleichermaßen einen Zelltod durchliefen/erfuhren. Dies scheint insbesondere der Fall zu sein bei HLA-DR-positiven aktivierten B- und T-Zellen, einem Teil von Dendritischen Zellen und maligne entartete Lymphozyten. Vermutlich wird der Zelltod über einen alternativen Mechanismus direkt ausgelöst, unabhängig von klassischen Apoptose-Signalwegen, wie dem der Caspase-Aktivierung [63].

Mehrfache *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen haben schon in den 90er Jahren gezeigt, dass eine Bindung krossligierender Antikörper an HLA-DR zu einer Apoptoseinduktion in Zielzellen führen kann [64] [85]. So wurden in den letzten 15 Jahren mehrere Antikörper gegen HLA-DR durch verschiedene Hersteller generiert und zum Teil auch klinisch getestet.

Bei dem murinen IgG1 Antikörper L243 konnte bereits 1989 im Vergleich mit anderen HLA-DR Antikörper eine Proliferationshemmung von B-Lymphozyten gezeigt werden [45]. Des Weiteren wird L243 fluoreszenzmarkiert als diagnostischer Antikörper verwendet. Eine Weiterentwicklung von L243 ist IMMU-114 (Immunomedics, New Jersey, USA), ein humanisierter monoklonaler HLA-DR Antikörper als IgG4 Subtyp. Die Verwendung dieses Subtyps mit fehlender Komplementaktivierung sowie auch der geringere Mausanteil sollten verminderte infusionsbedingte Nebenwirkungen erreichen. Des Weiteren wurde bei IMMU-114 eine Mutation in der Hinge-Region eingebaut, die einen dynamischen Austausch des Fab-Arms mit anderen IgG4 Antikörpern verhindern soll. In präklinischen Untersuchungen konnte bei mehreren Lymphomzelllinien eine proapoptotische Aktivität mittels der JNK-Kinase *in vitro* nachgewiesen werden [79]. In Mausmodellen konnte hier ein verlängertes krankheitsfreies Überleben gezeigt werden. In einem Hundemodell konnten ebenso Stein et al. neben guter Verträglichkeit eine schnelle Clearance der B-Zellen aus dem peripheren Blut innerhalb weniger Stunden nachweisen [78]. Des Weiteren konnte in Kombination mit Rituximab eine verbesserte Effektivität als Rituximab alleine erzielt werden [80]. Der Antikörper wird aktuell als Vorbereitung zu einer möglichen Anwendung am Mensch in einer Pilotstudie an Hunden mit Lymphom untersucht [78].

Ein anderer HLA-DR Antikörper ist der murine IgG2 Antikörper Lym-1 (Peregrine Pharmaceuticals, California, USA). Für diesen Antikörper wurden bereits 1989 die Daten einer Phase I Studie publiziert [41]. Im Rahmen dieser Studie wurden 10 Patienten mit refraktären B-Zell-Lymphomen dosisesskaliert behandelt. Obwohl der Antikörper murinen Ursprungs ist, konnte eine gute Verträglichkeit beobachtet werden. Es wurden dosisabhängige Serumspiegel nachgewiesen, jedoch eine schlechte Penetration in das extravaskuläre Tumorgewebe. Dementsprechend war auch das klinische Ansprechen gering. In weiterführende Untersuchungen wurde Lym-1 mit verschiedenen radioaktiven Substanzen zur Verbesserung der therapeutischen Wirkung markiert. In einer Phase I Studie konnte so bei 5 von 8 Patienten mit therapierefraktären B-Zell-Lymphomen eine partielle Response erzielt werden [65].

Der HLA-DR Antikörper, der am intensivsten in klinischen Studien untersucht wurde, ist der humanisierte IgG1 Antikörper Apolizumab (PDL BioPharma, Nevada, USA). In einer Phase I/II Studie wurden 23 Patienten mit progredienter CLL/ALL (22 Pat. CLL, 1 Pat. ALL) eingeschlossen. Im Rahmen dieser dosisesskalierten Studie erhielten die Studienteilnehmer 3x/Woche Apolizumab für 4 Wochen. Die MTD wurde mit 3,0 mg/kgKG definiert, da in der Dosierung von 5mg/kgKG zwei DLTs auftraten (aseptische Meningitis und ein hämolytisches urämisches Syndrom). Im Gegensatz zu 1D09C3 erreichte Apolizumab eine Halbwertszeit

von 8-36 Tagen. Leider waren auch hier die klinischen Ansprechraten nicht ausreichend, so dass der Hersteller von weiteren Studien absah [52].

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die bisher untersuchten HLA-DR Antikörper in ihren Dosisschemata eine allgemein akzeptable Verträglichkeit, jedoch bisher keinen klinischen Durchbruch erzielen konnten. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Zielstruktur HLA-DR mit Hilfe anderer oder kombinierter Molekülstrukturen (z. B. bispezifischer Antikörper, Antikörper oder Moleküle mit radioaktiven Stoffen oder small molecules) erfolgversprechender in der Therapie von malignen B-Zell-Neoplasien eingesetzt werden kann. So gibt es aktuelle *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen von dem HLA-DR Antikörper L243 in Verbindung mit Interferon- $\alpha$ 2b, welche über das spezifische Bindungsverhalten an den Zielzellen eine hohe Konzentration von Interferon mit einer additiven apoptotischen Wirkung zeigen [73]. Bei möglichen neuen klinischen Prüfungen für maligne hämatologische Erkrankungen mit HLA-DR IgG4 Antikörpern kommen eher solche in Betracht, die über eine Mutation in der Hinge Region eine Bildung von Halb molekülen mit einen Austausch des Fab-Arms verhindern (IMMU-114, Gemtuzumab [50]).

### **4.3 Analyse der allgemeinen Sicherheit und Verträglichkeit von 1D09C3**

1D09C3 ist als humaner IgG4 Antikörper entwickelt worden, um Unverträglichkeiten zu minimieren. Vor allem die bei anderen Antikörpern häufig auftretenden infusionsbedingten Nebenwirkungen sollen durch den kompletten humanen Ursprung und die fehlender Komplementaktivierung von IgG4 verringert werden. Neben einer möglicherweise auch als unspezifisch zu bewertenden Fatigue sind in der vorliegenden Studie während oder kurz nach den Infusionen keine unerwünschten Symptome aufgetreten. Auch in Bezug auf später auftretenden Nebenwirkungen (s. auch Kapitel 3.1.2) hat sich der Antikörper im Rahmen der 50 Therapiezyklen bei dem stark vortherafierten und älteren Patientenkollektiv als sehr verträglich erwiesen. Von den insgesamt 9 aufgetretenen Grad III/IV-Toxizitäten waren 7 hämatologischer Natur, wobei ein Abfall von Erythrozyten und Thrombozyten nicht über einer Wirkung mittels HLA-DR zu erklären ist. Die Thrombozytopenie kann möglicherweise über eine disseminierte intravasale Gerinnung verursacht sein. Eine leichte nicht klinisch relevante Koagulopathie und Hämolyse konnte jedoch nur bei einem Patienten gezeigt werden. Im Rahmen dieser vermutlich durch 1D09C3 verursachten unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist auch zu berücksichtigen, dass vor allem bei den CLL Patienten die Knochenmarkfunktion sehr eingeschränkt ist und zumeist bereits vor der Studienteilnahme

Zytopenien bestanden. Allgemein waren die hämatologischen Toxizitäten nur von kurzer Dauer, somit konnten die präklinischen Untersuchungen von 1D09C3 am Tiermodell mit temporären und reversiblen Blutbildveränderungen bestätigt werden [62].

Bei der dosislimitierenden Toxizität (DLT) des letzten Patienten C104 ist auch anzumerken, dass eine weitere Episode einer Portinfektion mehrere Monate nach der Studienteilnahme auftrat und daher die Verursachung durch 1D09C3 im Rahmen der gemeldeten DLT retrospektiv unwahrscheinlich war. Eine maximale tolerable Dosis (MTD), die als eine Dosisstufe unterhalb derer definiert ist, bei der >33% der Patienten eine DLT erleiden, konnte leider durch den vorzeitigen Studienabbruch nach der ersten DLT nicht ermittelt werden.

#### **4.4 Potentielle Fehlmessungen aufgrund methodischer Verfahren**

In dem folgenden Abschnitt soll kritisch hinterfragt werden, ob die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse in ihrer Signifikanz aufgrund möglicher Fehler vermindert sein können. Als erstes sollte dabei der Verfahrenswechsel innerhalb der Studie genannt werden. Dieser beinhaltet zum einen den Gerätewechsel der Durchflusszytometer nach 2 von 14 Patienten von EPICS XL<sup>®</sup>-C4 der Firma Beckman-Coulter zu dem BD FACSCanto<sup>®</sup> der Firma Becton Dickinson. Damit verbunden war ein Wechsel der meisten Materialien, insbesondere der fluoreszierenden Antikörper und der Lyse-Lösung. Der Grund dieser Änderung lag bei dem Verfahrenswechsel von einer 2-Plattform-Technik mit Verwendung der Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor zu einer 1-Plattform-Technik mit Absolutmessung mittels TruCOUNT<sup>®</sup>-Beads. Diese Technik hat im Grunde eine geringere Fehlermöglichkeit, da die Arbeitsschritte an einer Blutprobe zur gleichen Zeit und an einem Gerät erfolgen. Bei 44 Messungen waren jedoch die Ergebnisse dieses Verfahrens, vermutlich aufgrund technischer Mängel, nicht ausreichend. Bei diesen Analysen wurden, wie bereits im Kapitel 2.3.2.10 beschrieben, die absolut gemessenen Werte nicht verwendet und zur Wahrung der kontinuierlichen Ergebnisse die Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor verwendet. Im Allgemeinen konnte in Bezug auf die Kinetik der einzelnen Zellpopulationen sowie die Gesamtleukozytenwerte kaum ein Unterschied zwischen den beiden Protokollen festgestellt werden.

Zur genaueren Analysen führten wir Vergleiche im Rahmen des Protokolls 2 durch, wo Leukozytenwerte aus dem Zentrallabor und aus der Absolutmessung vorliegen. Mittels des Sign-Tests konnte gezeigt werden, dass die Leukozytenwerte aus den mit TruCOUNT<sup>®</sup> ermittelten Werte häufiger niedriger waren, als die Werte aus dem Zentrallabor. Als Ursache

für die Differenzen kommen zum Beispiel unterschiedliche Transportwege zu den verschiedenen Laboren in Betracht. Durch eventuell längere Liegezeiten der Probe pro Labor können Lyseeffekte eingetreten sein, die bei den generell sehr empfindlichen CLL-Zellen verhältnismäßig schnell auftreten können. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Absolutmessung im Rahmen der 1-Plattform-Technik als die akurateren Messmethode betrachtet werden kann. Wie im Methodikteil beschrieben werden hier mehr Parameter pro Zelle erhoben (forward-scatter=Größe, side-scatter=Granularität sowie die einzelnen Oberflächenmarker), wodurch das Risiko einer Falschzählung minimiert wird. Dagegen beruht die Zellzählung im Zentrallabor auf einem weniger sensitiven Verfahren, das sich vorwiegend an der Zellgröße orientiert. Durch z. B. Aggregatbildung und erhöhte Variabilität in der Zellgröße bei malignen Zellpopulationen wie den CLL-Zellen, ist es möglich zu erklären, warum insbesondere bei den zweistelligen „Abweichlern“ die Werte im Zentrallabor vermutlich meist eher falsch-niedrig waren.

Als weiteres sollen folgende einzelne Ausreißer von Messergebnissen genannt werden, welche jedoch aus statistischen Gründen unverändert in die Analysen mit aufgenommen wurden. Bei dem Patienten C101 wurde zur Messung 1-08 seitens des Zentrallabors 294,30 G/L Leukozyten gemessen. Diese fielen nach der ersten Infusion von 1D09C3 auf 192,80 G/L (1-12), stiegen jedoch innerhalb von 10 Stunden auf 345,89 G/L (1-22). Die weitere Entwicklung innerhalb der folgenden 6 Tage erbrachte ohne weitere therapeutische Maßnahmen einen Leukozytenwert von 187,38 G/L. Ob es sich dabei um Messfehler aufgrund der sehr hohen Leukozytenzahlen handelt ist nicht sicher zu sagen. Eine vergleichende Absolutmessung der Leukozyten mittels TruCOUNT<sup>®</sup>-Beads lag bei diesem Patienten noch nicht vor. Bei dem Patienten C106 konnte die Blutprobe 3-16 erst nach 48 Stunden gemessen werden, die Auswertung ergab jedoch im Verlauf zu erwartende Werte. Das gleiche betrifft die Messungen 2-d4, 3-d4 und 4-d4 bei dem Patienten C107. Die Messung 2-d6 bei dem Patienten C108 zeigt mit 214,15 G/L einen kurzfristigen Anstieg um 120,15 G/L innerhalb 2 Tagen. Neben der wahrscheinlichen Ursache eines starken Erkrankungsprogresses stellt sich hier die Frage eines Messfehlers. Jedoch wurde seitens des Zentrallabors mit 206,70 G/L ein ähnlich hoher Wert gemessen (Differenz 10,2%). Bei dem Patienten C108 liegt der Monozytenwert der Messung 2-12 außerhalb des zu erwartenden Bereichs. Vor der zweiten Infusion 1D09C3 konnten 0,15 G/L (2-08) gemessen werden, zu der besagten Messung 2-12 wurden 0,33 G/L gemessen und eine halbe Stunde darauf 0,12 G/L (2-13). Es sind zwar nur geringfügige Veränderungen in einem sehr niedrigen Messbereich, dennoch war analog zu der sonst nachgewiesenen Reduktion der Monozyten nach der Infusion eher ein kleinerer Wert als vor der Infusion zu erwarten. Es

konnte jedoch kein Fehler bei der Eingrenzung der Monozytenpopulation in der FACS-Analyse ermittelt werden. Bei dem Patienten C110 wurde seitens des Zentrallabors bei 3-d4 ein Leukozytenwert von 90,28 G/L gemessen. Angesichts der Werte zwei Tage davor mit 160,82 G/L und zwei Tage danach mit 153,07 G/L handelt es sich hierbei potentiell um einen Messfehler. Da dieser jedoch ursächlich nicht zu eruieren war, wurde der Wert in dem Leukozytenverlauf des Patienten belassen.

#### **4.5 Bewertung der Effektivität von 1D09C3**

Die im Kapitel 3.3.2 enthaltene Abb. 17 zeigt den Verlauf der Leukozyten in prozentualen Anteil zur ersten Messung 1-08. Der Effekt der Zell Reduktion erscheint aufgrund von diesen Daten als sehr deutlich und effektiv, jedoch nur sehr kurz anhaltend. Des Weiteren kann in der Nachbeobachtungsphase ein Anstieg der Leukozyten bei 8 von 10 CLL Patienten beschrieben werden, welcher als eine Progression der Erkrankungen zu werten ist. Auch damit wird untermauert, dass der Antikörper 1D09C3 keinen nachweisbaren langanhaltenden Effekt im Rahmen dieser Phase I Studie aufweist. Die Verläufe der einzelnen Zelllinien zeigen, dass die B-Lymphozyten und die Monozyten als regelhafte Träger des Oberflächenantigen HLA-DR die deutlichsten Reduktionsergebnisse aufwiesen. Darauf folgen die T-Lymphozyten, welche z. B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Zytokine aktiviert ebenso dieses Antigen aufweisen [75]. Die NK-Zellen weisen eine schwächer ausgeprägte Verringerung und die Granulozyten zeigten sich im Nadir nahezu unverändert und stiegen nach den Infusionen in der Regel reaktiv an. Diese Ergebnisse können als therapeutisch sehr effektiv gedeutet werden, da die maligne veränderten B-Lymphozyten möglicherweise gezielt reduziert wurden und im Falle einer Zerstörung direkt von den vermehrten Granulozyten aufgenommen werden könnten. Im Rahmen dieser Studie mit einem zielgerichteten therapeutischen Ansatz wurden im Gegensatz und im Vorteil zu einer klassischen zytostatischen Therapie (Chemotherapie) nur wenig Neutropenien verzeichnet. Die beiden Fälle einer Grad III/IV Granulopenie sind, wie im Kapitel 3.1.2 beschrieben, nur von einer Dauer über maximal 5 Tage gewesen. Zudem sind diese bei zwei CLL Patienten aufgetreten, welche aufgrund einer krankheitsbedingten Knochenmarkinsuffizienz bereits vor der Antikörperinfusion eine Grad II Granulopenie hatten und werden daher nicht als schwerwiegende Nebenwirkung gewertet.

Die beiden Zellpopulationen mit den höchsten Reduktionsergebnissen nach Infusion von 1D09C3 waren die B-Lymphozyten und die Monozyten. Diese beiden Zelltypen sind im Vergleich besonders interessant, da beide Populationen als antigenpräsentierende Zellen den Zielrezeptor HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimieren [30]. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die B-Zellen, welche bei 10 von 14 Patienten aufgrund der vorliegenden CLL als maligne bezeichnet werden können, sensitiver auf eine HLA-DR Bindung reagierten als die Monozyten. Das kann z.B. über eine verstärkte Rezeptordichte auf den Zelloberflächen ausgelöst worden sein, wobei in einer anderen Analyse von Roucard et al. bei mehreren nicht-malignen Zelllinien eine gleiche Rezeptordichte von HLA-DR nachgewiesen wurde [74].

Zu berücksichtigen bei der ermittelten stärkeren Reduktion ist die verschiedene absolute Zellanzahl im Blut der beiden Populationen. Bei 8 von 14 Patienten lagen die B-Lymphozyten in erhöhten Konzentrationen von bis zu 298 G/L vor und die Monozyten bei 11 von 14 Patienten unter 1 G/L. Daher war die Bindungswahrscheinlichkeit von dem Antikörper 1D09C3 an B-Lymphozyten deutlich höher als an Monozyten, eine Ursache die dann eher gegen eine Spezifität für maligne Zellen spricht. Bei Betrachtung der Absolutwerte zeigt sich, dass das reduzierte Zellvolumen der B-Zellen im Mittel 55-mal größer ist als das der Monozyten (mediane absoluten Reduktionen von B-Zellen geteilt durch das der Monozyten). Deswegen ist die Betrachtung der medianen Zellreduktion pro Therapiegabe für alle Patienten nur für einen groben Vergleich der Subpopulationen sinnvoll und verwischt eventuell Wirkunterschiede in den einzelnen Patienten und im Verlauf der 4 Therapiegaben. Bei einer Analyse der 6 Patienten mit einer geringen Anzahl an peripheren B-Lymphozyten zeigt sich jedoch ebenso im Vergleich zu den Monozyten eine höhere Reduktionsrate der B-Lymphozyten. Darin enthalten sind auch die 4 Nicht-CLL Patienten (3 Pat. mit NHL, 1 Pat. mit HL), bei denen aufgrund der fehlenden peripheren Ausschwemmung von malignen Zellen es sich um normale B-Lymphozyten handelte, welche die hohe Reduktion durch 1D09C3 aufwiesen.

Generell ist die Frage nach einer Selektivität auf maligne entartete HLA-DR positiven Zellen mittels entsprechender Antikörper in der Literatur uneinheitlich [62]. So wurde z. B. für den monoklonalen Antikörper 8D1 eine Apoptose nur bei maligne entarteten Zellen nachgewiesen, wobei nichtmaligne HLA-DR positive Zellen unbeeinträchtigt waren [85]. Ebenso konnte für die HLA-DR Antikörper Lym-1 und Lym-2 eine Selektivität gegenüber maligne B-Lymphozyten in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, wobei T-Lymphozyten unbeeinflusst blieben [24]. Des Weiteren konnte von Truman et al. *in vitro* nachgewiesen werden, dass bei gesunden aktivierten B-Lymphozyten durch HLA-DR Stimulierung zu 60%

ein Zelltod ausgelöst wurde, während ruhende B-Lymphozyten nicht beeinträchtigt waren [82]. Demgegenüber konnte von Newell et al. eine Apoptose bei ruhenden B-Lymphozyten *in vitro* nach Zugabe von HLA-DR Antikörpern gezeigt werden [64]. In Anbetracht dieser variablen Literaturangaben geben auch die Ergebnisse unserer Phase I Studie keine klare Antwort auf eine mögliche Spezifität von 1D09C3 für maligne entartete Zellen. Vor allem die nachgewiesene gleich hohe Reduktion von B-Lymphozyten bei CLL Patienten mit peripherer malignen Zellausschwemmung und von „gesunden“ B-Lymphozyten im peripheren Blut bei NHL/HL Patienten zeigt zu mindestens keine ausgeprägte selektive Wirkung für maligne Zellen.

Im Rahmen der Phase I Studie mit 1D09C3 konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass die Zellreduktion mit steigenden Dosierungen von 1D09C3 in einem höheren Ausmaß erfolgt. Dieser Effekt kann durch Ergebnisse der vom Studiensponsor durchgeführten pharmakokinetischen Untersuchungen erklärt werden. Die Serumspiegel von 1D09C3 waren bei den Dosierungen von 0,25mg/kgKG bis 2mg/kg/KG bei 5 von 8 Patienten kaum messbar und wenn dann nur kurz nach Ende der Infusion. In den Dosierungen 4-8mg/kgKG waren Serumspiegel messbar (ELISA Biopharm, Eppenheim, Germany) [4]. Der höchste Wert war dabei 2,0-2,3 Stunden nach Infusion messbar und zeigte eine schnelle Clearance aus dem peripheren Blut. Die Halbwertszeit lag bei 0,7-7,9 Stunden und lässt vermuten, dass in dieser Zeit zwar eine Wirkung im peripheren Blut erzielt werden konnte, aber nicht ausreichend die malignen Zellen in des lymphatischen Geweben der Patienten erreicht werden konnten. Die längste Serumverweildauer des Antikörpers konnte nach 48 Stunden bei den Patienten C112 und C114 gemessen werden. Es wurde ein verhältnismäßig kleines Verteilungsvolumen von 28,1-471,5ml/kg gemessen. Das lässt vermuten, dass sich die Verteilung von 1D09C3 auf das periphere Blut beschränkte. Die kalkulierte Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) zeigte eine exponentielle Zunahme mit steigender Dosierung. Eine Akkumulation von 1D09C3 wurde jedoch in keinem der Patienten erreicht.

Die Gründe für diese eingeschränkte Bioverfügbarkeit von 1D09C3 waren nicht eindeutig erkennbar. Die Serumspiegel des Antikörpers variierten bei verschiedenen Patienten innerhalb des gleichen Dosislevels und ähnlicher Leukozytenwerten. Daher konnten eventuell unklare intraindividuelle Faktoren bei den Patienten zum Tragen, die auf die pharmakokinetische Wirkung von 1D09C3 Einfluss nahmen. Des Weiteren konnten nur bei 6 Patienten humane Anti-Human Antikörper (Human Anti-Human Antibodies, HAHA) mit Serumwerten von 396,6-4089,0ng/ml ermittelt werden und bei den höheren Dosisstufen von 4-8mg/kgKG konnten keine HAHA nachgewiesen werden. 1D09C3-neutralisierende Antikörper konnten nur bei 4 Patienten gemessen werden [4]. Da auch hier keine Korrelation

zu den differierenden Serumspiegeln zu erkennen war, kann durch diese Ergebnisse nicht die durchgehende eingeschränkte Bioverfügbarkeit erklärt werden. In den präklinischen Tierexperimenten in Affen konnte gezeigt werden, dass mit einer Dosierung von 10 mg/kg 1D09C3 eine Halbwertszeit über 35-140 Stunden eine anhaltendere Reduktion von Lymphozyten über 8 Tage erreicht werden konnte [6]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Phase I Studie auch ein wöchentliches Therapieschema gewählt.

Andere therapeutische Antikörper weisen *in vivo* eine deutlich längere Halbwertszeit im peripheren Blut auf. Der monoklonale IgG1 CD20 Antikörper Rituximab weist eine Halbwertszeit im Median von 21 Tagen (Spannweite 10,3-35,8 Tagen) auf [71]. Ein ähnliches pharmokokinetisches Profil zeigt der humanisierte monoklonale IgG1 CD52 Antikörper Alemtuzumab mit einem medialen maximalen Serumspiegel am Tag 29 (Spannweite 18-45 Tagen) in CLL Patienten [61]. Daher sollten noch andere Möglichkeiten für die rasche Clearance von 1D09C3 diskutiert werden. Ein bereits bei CD20 und MHC-Klasse-I-Molekülen bei CLL Patienten beschriebener Prozess ist das Ablösen der Antigene von den Zelloberflächen und somit freie Verfügbarkeit im Plasma [56]. Das könnte möglicherweise bei 1D09C3 vor oder nach einer Bindung an HLA-DR erfolgt sein. Dadurch könnte eventuell, wie bei CD20 gezeigt, komplexe Formationen mit anderen Membranstrukturen gebildet werden, und somit zu einer früheren Inaktivierung des Antikörpers führen. Eine weitere Möglichkeit ist eine Internalisierung des HLA-DR Rezeptors inkl. des gebundenen Antikörpers mit anschließender endosomalen Lyse des Antikörpers. Diesen Mechanismus konnte durch frühere Untersuchungen an HLA-DR gezeigt werden [60]. Ebenso konnte bei dem HLA-DR Antikörper Lym-1 *in vitro* eine Internalisierung des Antikörpers nach Bindung an HLA-DR an malignen B-Zelllinien gezeigt werden [87]. Des Weiteren können noch andere biologische Prozesse in Frage gekommen sein, die zu einer Degradierung von 1D09C3 geführt haben. So wurde von Liu et al. z. B. eine Deamidation von z. B. Asparagin mit einer verminderten Aktivität von verschiedenen therapeutischen Proteinen *in vivo* nachgewiesen [53]. Durch die Verwendung eines IgG4-Antikörpers kann die eingeschränkte Bioverfügbarkeit auch durch das bereits beschriebene Austauschpotential der Fab-Fragmente mit Bildung von Halbmolekülen sowie das unten beschriebene Aggregationsverhalten von 1D09C3 bedingt gewesen sein (s. auch Kap. 1.4.1 und 4.6.1). Interessanterweise ist die Halbwertszeit von IMMU-114 im Hund auch relativ kurz wobei dieser Antikörper hat eine Mutation in der Hinge-Region aufweist, die den Austausch von Fab-Armen verhindern soll [78, 79]. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Austauschpotential ein mögliches Problem, aber nicht die alleinige Ursache für die kurze Halbwertszeit von 1D09C3 oder IgG4-Antikörpern im Allgemeinen *in vivo* darstellt.

Des Weiteren wurde seitens GCP-Biotech im Rahmen pharmakodynamischer Analysen die HLA-DR-Expression und –sättigung auf den Leukozyten bei den Patienten mit CLL durchflusszytometrisch ermittelt (Huntingdon Life Sciences, Huntington, Cambridgeshire, UK). Eine HLA-DR Expression konnte an B-Zellen und Monozyten bei allen Patienten nachgewiesen werden. Der Sättigungspeak war 30 Minuten nach den Infusionen messbar, nach 2-4 Tagen war die Bindung zu 1D09C3 nicht mehr messbar. Eine längere Sättigung >10 Stunden konnte nur bei dem Patienten C112 nachgewiesen werden, analog zu höheren Serumspiegeln von dem Antikörper. Die Sättigung war wie erwartet mit zunehmenden Dosierungen zu verzeichnen, ab 4mg/kgKG konnte bei beiden Zelltypen eine meist komplette Sättigung mit 1D09C3 erreicht werden [4].

Dem gegenüber war allerdings keine Korrelation zwischen der zunehmenden Zellreduktionsrate bei steigenden Dosierungen und einem klinischen Ansprechen zu erkennen. So konnte im Rahmen der Anamnese und klinischer oder radiologischer Untersuchungen kaum eine Wirkung von 1D09C3 außerhalb des peripheren Blutes, z. B. bzgl. der Lymphadenopathie und Splenomegalie, festgestellt werden. Es waren keine oder nur eine geringe Veränderung krankheitsbedingter Symptomen wie z. B. von B-Symptomen (Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsverlust) zu eruieren. Lediglich bei dem Patienten C114 ist Verbesserung dokumentiert worden. Ähnlich war es bei den Lymphknotenschwellungen, wobei in den Tumor-Verlaufskontrollen an den Tagen 29 oder 50 alle Patienten als stabile oder progressive Erkrankung („stable disease“/“progressive disease“) bewertet wurden. Bei genauerer Betrachtung konnte ein geringfügig klinisches Ansprechen z. B. beim Patient C106 und C108 als eine Regression der großen abdominellen Lymphknoten bei gleichzeitiger Stabilität oder Progression anderer Tumormanifestationen verzeichnet werden. Um eine genaue Beurteilung der nachgewiesene dosisabhängigen Wirkung von 1D09C3 vornehmen zu können, wäre eine höhere Patientenanzahl mit vergleichbaren Leukozyten-Basiswerten (z. B. im Rahmen einer Phase II Folgestudie) wünschenswert. Ebenso ist es möglich, dass die Effektivität durch höhere Dosierungen, möglicherweise auch in einem dosisdichteren Schema von 3x wöchentlichen Gaben, hätte gesteigert werden können. Das ist jedoch aufgrund den unten aufgeführten Gründe die zum Studienabbruch führten als unwahrscheinlich anzusehen.

## 4.6 Besondere Aspekte in der Untersuchung von 1D09C3

### 4.6.1 Alternativhypothesen zur Apoptose bei 1D09C3

Die Gabe von 1D09C3 im Rahmen der Phase I Studie zeigte eindeutig einen Effekt auf die im peripheren Blut analysierten Leukozyten. Dabei ist davon auszugehen, dass der Effekt der Zellreduktion über den Zielrezeptor HLA-DR ausgelöst wurde.

Eine der Hauptfragen ist jedoch, wie dieser vorwiegend im Blut messbare Effekt von 1D09C3 zustande kommt. Im Rahmen der vorklinischen Studien wurde gezeigt, dass der Antikörper 1D09C3 eine Apoptose der Zielzellen erzeugt. Die Verlaufskinetiken der Blutwerte in der Phase I Studie zeigten jedoch eine sehr schnelle Erholung der vorher verringerten Zellen mit sogar einem überschießenden Rebound-Phänomen. Das soll im folgenden Beispiel verdeutlicht werden. Der Patient C105 hatte vor der ersten Therapie eine sehr hohe Leukozytenzahl von 150,79 G/L (Kodierung 1-08). Diese konnte nach der Infusion auf 72,05 G/L (1-12) gesenkt werden. Bereits 4 Stunden nach der Infusion waren wieder 122,05 G/L (1-16) Leukozyten im peripheren Blut messbar, nach 10 Stunden 154,18 G/L (1-22) und nach 24 Stunden sogar 179,73 G/L (1-d2). Bei diesen genannten Messungen mittels der TruCOUNT<sup>®</sup>-Methode konnten Abweichungen zu den Messungen des Zentrallabors zwischen 0,1% und 8,1% ermittelt werden. Daher können diese Werte über zwei Methoden als bestätigt angenommen werden. Die Differenz zwischen der Messung 1-d2 und 1-12 beträgt somit in einem Zeitfenster von ca. 24 Stunden 107,68 G/L. Bei einem minimal angenommenen Blutvolumen von 5 Litern entspricht das einer Zunahme von  $5,38 \times 10^{11}$  Leukozyten innerhalb 24 Stunden. Da das Knochenmark ein Reservevolumen von reifen Blutzellen bereithält ist es theoretisch möglich, dass die Leukozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blut abgegeben wurden. Jedoch ist die Hypothese der kompletten Auffüllung aus dem Knochenmark durch die schnelle Kinetik des Effekts innerhalb weniger Stunden eher unwahrscheinlich. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass sich diese Entwicklung in den folgenden 3 Infusionen innerhalb 4 Wochen wiederholt hatte. Nach einer konventionellen zytostatische Therapie dauern die Zytopenien normalerweise wesentlich länger, hier jedoch vorwiegend dadurch, dass zytostatische Therapie eine entsprechende Zellschädigung auch im Knochenmark erzielen. Das ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit und des Wirkmusters bei 1D09C3 wohl nicht erfolgt. Man würde bei einer Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark außerdem das zusätzliche Ausschwemmen von unreiferen Vorstufen erwarten, was wir bei unseren Patienten nicht bestätigen konnten. Möglicherweise kann das

Rebound-Phänomen durch eine Ausschüttung von Leukozyten aus dem Knochenmark erklärt werden, jedoch weniger die nach den Infusionen aufgetretene Zellreduktion.

Daher sollten neben der Apoptose weitere Hypothesen diskutiert werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper 1D09C3 zwar mit den Zielzellen eine Verbindung eingehen konnte, jedoch keine Apoptose bei den Zellen ausgelöst wurde. Während dieser Komplexbildung könnte eine Adhäsion an Endothelzellen im Gefäßbett erfolgt sein [25] [51]. Durch diese möglicherweise mittels Zytokine ausgelöste Margination könnten die Leukozyten temporär nicht messbar gewesen sein. Nach dem Lösen der Antikörper bzw. dessen Abbau konnten die Leukozyten wieder in der vorherigen Anzahl in einer peripheren Blutabnahme erfasst werden. Es konnten von anderen Arbeitsgruppen im Rahmen von Untersuchungen einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation Antikörper gegen MHC-I und II Moleküle nachgewiesen werden, die zu einer Adhäsion von Leukozyten an den Kapillarwänden führten [10]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Ivanov et al. eine homotypische Adhäsion mit einem folgenden nicht-apoptotischen Zelltod unter Tositumumab und L243 *in vitro* bei Lymphom- und Leukämiezellen nachweisen [42].

In neueren Untersuchungen mit 1D09C3 konnten von Hansen et al. ein durch den Antikörper ausgelöstes Aggregationsverhalten von HLA-DR positiven Zellen spektroskopisch nachgewiesen werden [38]. Eine Aggregatbildung gleichartiger Zellen durch Krossligierung von HLA-DR Molekülen mittels 1D09C3 könnte ursächlich an einer falsch-niedrig Zählung von Blutzellwerten beteiligt gewesen sein. Hierbei wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass wir zumindest in der Durchflusszytometrie Aggregate durch die Größen- und Granularitätsbeurteilung im Forward-Side-Scatter erkannt hätten. Hier waren keine Veränderungen des Scatter-Musters vor und nach 1D09C3-Gaben zu erkennen. Als weitere theoretische Überlegung könnte dann eine Auslösung des Zelltodes nach Auflösung dieser Aggregate durch die Probenvorbereitung für die Zellzählung im Zentrallabor oder Durchflusszytometrie erfolgt sein. Mittels der Untersuchung von Hansen et al. konnte ebenso das bereits beschriebene Austauschpotential des Fab-Fragments von IgG4 Antikörper auch an 1D09C3 nachgewiesen werden. Nach einem Austausch an der Hinge Region des gegen HLA-DR gerichteten Fab-Elements als Halbmolekül gegen Fab-Fragmente von anderen IgG4 Antikörper erfolgte in dieser funktionalen Monovalenz auch kein weiteres Aggregationsverhalten. In der spektroskopischen Analyse konnte durch 1D09C3 keine Apoptose oder ein sonstiger Zelltod an Myelomzellen nachgewiesen werden. Ein Aggregationsverhalten durch Antikörper wurde bereits mehrfach untersucht und beschrieben. So konnte zum Beispiel auch mit Alemtuzumab eine Clusterbildung von Zellen *in vitro* gezeigt werden [90]. Ebenso wurde in einer Untersuchung an mehreren Antikörpern,

darunter auch der HLA-DR Antikörper L243, eine Aggregationsbildung der Zielzellen mit der Gefahr der mechanischen Zelltodes *ex vivo* nachgewiesen [58].

Im Rahmen unserer Untersuchungen haben wir keine größeren Zellaggregate unter 1D09C3 entdeckt. Diese Untersuchungen fanden jedoch *ex vivo* statt nach vorhergehender und nicht vermeidbarer mechanischer Manipulation der Zellen. Eine plausible Erklärung ist, dass mögliche Aggregate durch mechanische Manipulation, welche bereits bei der Blutentnahme beim Patienten wirksam gewesen sein könnten, erst *ex vivo* einen Zelltod ausgelöst haben können. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine Probenverarbeitung ohne jegliche mechanische Manipulation der Zellen kaum möglich und nach dem damaligen Kenntnisstand zur Studie nicht erforderlich gewesen war.

In zwei Patienten mit CLL (C112 und C113), welche im Rahmen der Studie jeweils 4mg/kgKG 1D09C3 erhielten, wurden seitens dem Studiensponsor Annexin/7-AAD Färbungen durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie können dadurch apoptotische Zellen im peripheren Blut nach 1D09C3 nachgewiesen werden. Die Experimente zeigten, dass Apoptose *ex vivo* nachweisbar war, aber in variabler Höhe, die nicht durch Unterschiede in der Pharmakokinetik oder im Bindungsverhalten des Antikörpers bei den Patienten zu erklären war. So konnten bei dem Patienten C112 lediglich eine erfolgte Apoptose bei weniger als 15% der Leukozyten gezeigt werden, während der Patient C113 bei der gleichen Dosierung von 1D09C3 eine Apoptoserate von 79% der Leukozyten aufwies [4]. Beide Patienten hatten vergleichbare Leukozytenwerte vor der Infusion (7,7 und 10,1 G/L), messbare Serumspiegel von 1D09C3 und eine effiziente HLA-DR Sättigung von bis zu 100%. In unseren Analysen zeigten jedoch beide Patienten eine Reduktion der Leukozyten nach der Infusion von ca. 60-70%. Daher ist auch hier zu berücksichtigen, dass bei dieser *ex vivo* durchgeführten Annexin-Färbung ebenso andere Mechanismen zu diesen Ergebnissen geführt haben mögen, als eine durch 1D09C3 ausgelöste *in vivo* Apoptose. Das könnten zum Beispiel bei dem Patienten C112 individuelle Faktoren wie eine Margination der Zellen gewesen sein oder dass auch hier die Apoptose artifiziell durch die *ex vivo* Probenverarbeitung hervorgerufen worden sein könnte.

Letztlich bleiben der Wirkmechanismus von 1D09C3 und eine genaue Erklärung, wie der Antikörper diese schnellen Effekte im Patienten erzielen konnte, offen. Aufgrund der oben aufgeführten aktuellen Ergebnisse in der Literatur muss man kritisch hinterfragen, ob eine Signalkaskade über HLA-DR wirklich zu einer Apoptoseinduktion führt oder womöglich andere Mechanismen, wie die Aggregatwirkung im Vordergrund stehen.

#### 4.6.2 Gründe für den Studienabbruch

Im Verlauf der Studie kam es zu verschiedenen ungünstigen Entwicklungen, die vermutlich im Zusammenspiel zur vorzeitigen Beendigung der Studie geführt haben. Zuerst sollte dabei der Aspekt genannt werden, dass die anfänglichen Studienergebnisse und Therapieverläufe nicht den gewünschten Effekt von 1D09C3 zeigten, wie die vorklinischen Experimente vermuten ließen. Der Effekt auf das Blut erschien zwar beeindruckend, nur bestand eine zu kurze Kinetik und eine Wirkung auf vergrößerte Lymphknoten war kaum nachweisbar. Die ausschließlich kurzfristige Wirkung auf die B-Lymphozyten konnte auch bei den höheren Dosierungen von 4 mg/kgKG keinen anhaltenden Effekt erkennen lassen. Allerdings ist es möglich, dass man sich mit 1D09C3 noch zu sehr in einem unterdosierten Bereich bewegt hat. Es wäre daher ein dosisdichteres Therapieschema mit häufigeren Gaben in kürzeren Abständen von 1D09C3 wünschenswert gewesen. Dadurch hätte die kurze Halbwertszeit des Antikörpers besser ausgenutzt werden können. Ein Amendment der Studie mit 3x wöchentlichen 1D09C3 Gaben war von klinischer Seite bereits geplant, konnte jedoch nicht mehr realisiert werden, da der Sponsor sich vorher zu einem kompletten Studienabbruch entschloss.

Kurz vor Beendigung der Studie kam es bei dem letzten eingeschlossenen Patienten C114 zu einer dosis-limitierenden Toxizität (DLT) in Form einer katheter-assoziierten Infektion einschließlich Pneumonie. Die aufgetretene DLT war in jedoch kein Grund für einen Studienabbruch. Laut dem Studienprotokoll hätten auf der Dosisstufe 8 mg/kg daher 6 Patienten anstelle von 3 weiter behandelt werden müssen. Erst bei einer erneuten DLT bei 8 mg/kg wäre die Studie gestoppt worden und die MTD bei 4 mg/kg definiert gewesen. Leider konnte die 8mg-Kohorte aufgrund des Studienabbruches von Firmenseite nicht mehr komplettiert rekrutiert werden.

Der Hauptfaktor, der zur Beendigung der Studie durch den Sponsor führte, war das beschriebene Fab-Austauschpotential bei Antikörpern des Subtypes IgG4, welches zum Zeitpunkt des Studienabbruches in der Literatur beschrieben wurde [12, 84]. Dabei wird, wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, an der Hinge Region von IgG4 Antikörpern ein Fab-Fragment mit einem anderen Fab-Arm von endogenen IgG4 ausgetauscht. Daraus entstehen neue bispezifischer Antikörper mit einem nicht abschätzbaren Risiko bezüglich der Verträglichkeit. In einer später durchgeführten Untersuchung konnte das beschriebene Austauschpotential auch an 1D09C3 gezeigt werden [38]. Ob der Effekt tatsächlich *in vivo* im Menschen auch aufgetreten ist, können wir letztlich nicht mehr nachweisen.

Im Zusammenspiel mit den anderen genannten Aspekten ist daher die Begründung zur Beendigung dieser Phase I Studie seitens GPC Biotech nachvollziehbar. Zumal geht die Pharmaindustrie seit dem unglücklichen Verlauf der Würzburger Firma TeGenero Immuno Therapeutics vorsichtiger mit möglichen Nebenwirkungen im Rahmen einer Therapie mit monoklonalen Antikörper um. Es handelte sich hierbei um einen humanisierten Antikörper des Typs IgG4, welcher gegen das Oberflächenmolekül CD28 auf T-Lymphozyten gerichtet ist. Der Einsatz sollte bei Rheumatoider Arthritis und bei CLL geprüft werden. Eine Phase I Studie startete im März 2006 mit 6 gesunden Probanden. Diese zeigten kurz nach der Infusion mannigfaltige Symptome einer schweren Entzündungsreaktion und daraufhin multiples Organversagen, welches mitunter eine intensivmedizinische Behandlung der Probanden erforderte. Dieses schwerwiegende unerwünschte Ereignis war kaum voraus zu sehen, da in präklinischen Tests an Makaken die 500-fache Dosis gefahrlos getestet worden war [32]. Dieses Beispiel zeigt die potentielle Gefährdung der Probanden in Phase I Studien mit Erstanwendung am Menschen. Aufgrund dieses Vorfalles hatte neben dem Hersteller GPC-Biotech auch das Paul-Ehrlich-Institut als zuständige Aufsichtsbehörde eine besonders große Aufmerksamkeit für den Antikörper 1D09C3 und die hier beschriebene Studie. Entsprechend waren die zu erfüllenden Auflagen für den Hersteller besonders umfangreich und hätten aufgrund der neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse vermutlich neue präklinische Untersuchungen gefordert.

#### **4.6.3 Durchführbarkeit des angewandten Therapiemonitoring**

Die Arbeitsabläufe der zeitlich vorgegebenen Blutabnahmen und die anschließende zeitnahe Untersuchung mittels Durchflusszytometrie zeigten sich organisatorisch anspruchsvoll aber auch praktikabel. Die zeitlich dichten Messungen haben die Wirkkinetik der Studienmedikation sehr deutlich wiedergegeben. So konnte im Vergleich zu der Pharmakokinetik gezeigt werden, dass die Reduktion der B-Zellen dosisassoziiert von der Präsenz des Antikörpers im Serum abhängig war. Als Nachteil sind die häufigen Blutabnahmen anzuführen, welche eine grenzwertige Belastung für den Patienten darstellten. Zu diskutieren wäre hier die Verwendung eines zentralen Katheters, ein Verfahren welches zum Teil bei Phase I Studien mit aufwendigen Blutuntersuchungen eingesetzt wird, jedoch aufgrund des invasiven Eingriffs auch ethisch bedenklich ist. In der Durchführung des Therapiemonitorings von 1D09C3 konnten eindeutig Vorteile zugunsten der Ein-Plattform-Analysen mit einer Leukozytenabsolutmessung gezeigt werden. Die Aussagekraft einer Therapieverlaufskontrolle kann mittels multiparametrischen Analysen in

der Durchflusszytometrie deutlich subtiler erfolgen als es ein Differentialblutbild und andere herkömmliche Laboruntersuchungen vermögen. Die Anwendung eines solchen oder ähnlichen Therapiemonitorings bei anderen Prüfsubstanzen oder auch bei bereits zugelassenen Medikamenten könnte wertvolle Hinweise auf die genaue Wirkungsweise, die Effektivität und potentiellen Nebenwirkungen der entsprechenden Therapie geben. Dabei sind abhängig vom erwartenden pharmakologischen und -dynamischen Profil des untersuchten Medikaments vermutlich auch weniger Messungen nötig, welche im Routinebetrieb eines hämatologisch-onkologischen Labors durchgeführt werden könnten.

Zur Bestätigung der möglicherweise stattgefundenen Zellzerstörung *ex vivo* nach Zellaggregation wäre eine geringere mechanische Manipulation ab Probenentnahme wünschenswert gewesen. Letztlich ist es nicht auszuschließen, dass solche Aggregate bereits bei der Blutentnahme ausgelöst wurden. Eine genaue Bewertung von möglichen Aggregaten hätte jedoch auch den Einsatz aufwändiger mikroskopischer Techniken erfordert. Eine Vermeidung der Zentrifugation und von Waschschritten wurde bereits mittels des Protokolls 2 ab dem Patienten C103 umgesetzt. Eine weitere Reduktion der mechanischen Manipulation der Zellen durch die Technik der Blutentnahme und der FACS Analyse wäre auch mit der Kenntnis der später publizierten Ergebnisse kaum möglich gewesen. Des Weiteren wäre im Rahmen der Fragestellung einer stattgefundenen Apoptose noch weitere Apoptosetests mit Annexin-Färbungen von Interesse gewesen, da die beiden stattgefundenen keinen klaren Hinweis auf eine Apoptose zeigen.

## 5 Zusammenfassung

Die Therapie fortgeschrittener maligner Neoplasien, einschließlich lymphatischer Tumorerkrankungen, erzielt oftmals weder eine Heilung noch eine deutliche Verlängerung im Überleben der Patienten. Die Entwicklung von neuartigen zielgerichteten medikamentösen Therapien, zum Beispiel mit monoklonalen Antikörpern, ist ein großer Hoffnungsträger um die Effektivität und Verträglichkeit gegenüber konventioneller zytostatischer Therapie zu verbessern.

Im Rahmen einer Phase I Studie wurde der monoklonale IgG4-Antikörper 1D09C3 untersucht. Dieser Antikörper bindet an das Oberflächenmolekül HLA-DR, welches vorwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen, wie den B-Lymphozyten und Monozyten, exprimiert wird. In präklinischen Tests konnte über diese Bindung eine direkte und caspaseunabhängige Apoptose in Zielzellen erzeugt werden. 1D09C3 wurde präklinisch in mehreren Mausmodellen mit Xenotransplantat von verschiedenen malignen hämatologischen Neoplasien getestet und zeigte in diesen Modellen eine durchgehende hohe Antitumoraktivität.

In diese Phase I Studie wurden 14 Patienten mit therapierefraktären lymphoproliferativen Erkrankungen vom B-Zell-Typ eingeschlossen. Das Studienprotokoll sah vier Infusionen von 1D09C3 in wöchentlichen Abständen mit jeweils 36 Blutabnahmen in definierten Zeitabständen vor. Es erfolgte eine Dosissteigerung von 0,25 mg pro kg Körpergewicht bei dem ersten Patienten bis zu 8 mg/kg bei dem letzten Patienten. Zielsetzung dieser Arbeit war die Wirkungsweise von 1D09C3 auf maligne und nicht-maligne Zellen des Immunsystems im Patienten nachzuverfolgen. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit mit jeder Blutabnahme mittels Durchflusszytometrie eine Immunphänotypisierung der Leukozyten durchgeführt. Mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern konnten so die Leukozyten in ihre Untergruppen differenziert werden und im Verlauf der Studie beobachtet werden. Durch die Verwendung von TruCOUNT<sup>®</sup>-Beads konnte in dem gleichen Arbeitsschritt eine Absolutzählung der Zellen erfolgen.

In den Ergebnissen der Untersuchungen zeigte der Antikörper 1D09C3 bei guter Verträglichkeit bereits in niedrigen Dosisstufen eine schnelle und deutliche Reduktion insbesondere der B-Lymphozyten. Diese lag 30 Minuten nach der Infusion im Median bei einer Verringerung um 81,6%. Von den anderen untersuchten Zellpopulationen lag die Verringerung der Monozyten bei 73,0%, bei den T-Lymphozyten 54,2% und die NK-Zellen sind mit einer Reduktion um 24,0% ebenso wie die Granulozyten mit einer Verringerung um

8,4% deutlich weniger verändert. Die Einteilung in Cluster mit steigenden Dosisstufen konnte zeigen, dass die Reduktion der B-Lymphozyten mit höheren Dosen von 1D09C3 zunahm. Der Vergleich zwischen B-Lymphozyten und Monozyten ist besonders interessant, da beide Zellgruppen das Zielantigen HLA-DR auf ihrer Oberfläche tragen. Die B-Lymphozyten, welche zum größten Teil bei den Studienpatienten aufgrund des Vorliegens einer Leukämie (CLL) als maligne entartet bezeichnet werden können, erfahren eine signifikant stärkere Reduktion ( $p=0,008$ ) als die Monozyten. Generell zeigt der zeitliche Verlauf jedoch innerhalb von Stunden eine Angleichung und oftmals sogar ein Überschießen (Rebound) der Zellzahlen im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Infusion. Der deutliche Effekt auf die malignen B-Lymphozyten ist daher nur sehr kurz anhaltend. Als Ursachen für die kurze Wirksamkeit von 1D09C3 kommen verschiedene Ursachen in Frage, z. B. die kurze Bioverfügbarkeit und kurze Halbwertszeit des Antikörpers. Diese könnte durch Instabilität des Antikörpers (z. B. durch die Bildung von Halbmolekülen mit einem Austausch der Antigenbindungsstelle) verursacht gewesen sein. Möglicherweise sind im Gegensatz zur Apoptoseinduktion andere Mechanismen für die kurze Zellreduktion verantwortlich, wie z. B. eine Aggregation der Zielzellen oder eine Adhäsion an Endothelzellen. Klinisch fand sich in der 8-wöchigen Nachbeobachtungsphase bei den meisten Patienten eine Progression der Erkrankung.

Zusammenfassend hatte der Antikörper 1D09C3 einen deutlichen Effekt auf HLA-DR positive Leukozyten. Die limitierte Wirkdauer und das schnelle Wiedererlangen des Ausgangswertes der Zielzellen führten jedoch zu keinem klinischen Ansprechen. Die abschließende Bewertung dieser Ergebnisse ist leider durch den Abbruch der Studie erschwert worden. Die Entscheidung zur vorzeitigen Beendigung wurde von der herstellenden Firma GPC Biotech AG getroffen. Die Begründung lag an unabhängig zu dieser Studie publizierten Experimenten, die bei dem Antikörpertyp IgG4, zu dem auch 1D09C3 gehört, ein erhöhtes Austauschpotenzial von dessen Bestandteilen zeigte. Dieses Austauschpotential und ein Aggregationsverhalten mit HLA-DR positiven Zellen wurden in einer Untersuchung mit 1D09C3 nach Beendigung der Studie bestätigt. Aufgrund der dadurch bestehenden Ungewissheit bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit von 1D09C3 als IgG4 Antikörper für die therapeutische Anwendung werden vermutlich keine weiteren klinischen Untersuchungen mit 1D09C3 unternommen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Zielstruktur HLA-DR mit Hilfe anderer oder kombinierter Molekülstrukturen (z. B. bispezifischer Antikörper, Kombinationen mit radioaktiven Stoffen) effektiver in der Therapie von malignen B-Zell-Neoplasien eingesetzt werden kann. Kritisch zu hinterfragen bleibt weiterhin die eigentliche intrazelluläre Signalwirkung von HLA-DR, die bisher nicht ausreichend geklärt ist.

## 6 Literaturverzeichnis

1. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. N Engl J Med, 1985. 313(6): p. 337-42.
2. Clinical Study Protocol 1D0-04-02: A Phase 1 Open-label-Study of 1D09C3 Weekly Administration in Patients with Relapsed and/or Refractory B-Cell Lymphoproliferative Neoplasias. 2005, GPC Biotech AG: Martinsried. p. 3-5.
3. Human Monoclonal Antibody 1D09C3 Investigator's Brochure. 2006, GPC Biotech AG.
4. Study Report: A Phase 1 Open-label Study of 1D09C3 weekly administrations in Patients with relapsed and/or refractory B-cell lymphoproliferative Neoplasias. 2009, GPC Biotech AG. p. 121.
5. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 2010, Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin 2010. p. S. 12-13.
6. AG, B., 1D09C3 - toxicity study by intermittent intravenous infusion administration to cynomolgus monkeys for 4 weeks with a 4 week recovery period., in Martinsried/Munich: Final pharmacokinetic report. 2005.
7. Apelgren, P., S. Hasselblom, O. Werlenius, H. Nilsson-Ehle, and P.O. Andersson, Evaluation of clinical staging in chronic lymphocytic leukemia- population-based study. Leuk Lymphoma, 2006. 47(12): p. 2505-16.
8. Armstrong, A.A., F.E. Alexander, R. Cartwright, B. Angus, A.S. Krajewski, D.H. Wright, I. Brown, F. Lee, E. Kane, and R.F. Jarrett, Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. Leukemia, 1998. 12(8): p. 1272-6.
9. Bahnsen, U., Die Wende im Kampf gegen Krebs., in Die ZEIT. 2007: Hamburg.
10. Bickerstaff, A., R. Pelletier, J.J. Wang, G. Nadasdy, N. DiPaola, C. Orosz, A. Satoskar, G. Hadley, and T. Nadasdy, An experimental model of acute humoral rejection of renal allografts associated with concomitant cellular rejection. Am J Pathol, 2008. 173(2): p. 347-57.
11. Brando, B., D. Barnett, G. Janossy, F. Mandy, B. Autran, G. Rothe, B. Scarpati, G. D'Avanzo, J.L. D'Hautcourt, R. Lenkei, G. Schmitz, A. Kunkl, R. Chianese, S. Papa, and J.W.

- Gratama, Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*, 2000. 42(6): p. 327-46.
12. Burton, D.R. and I.A. Wilson, Immunology. Square-dancing antibodies. *Science*, 2007. 317(5844): p. 1507-8.
  13. Campo, E., S.H. Swerdlow, N.L. Harris, S. Pileri, H. Stein, and E.S. Jaffe, The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 2011.
  14. Carlo-Stella, C., The HLA-DR-Specific Monoclonal antibody 1D09C3 Exerts a potent Antitumor Activity on Malignant Lymphoid Cells Both in Vitro and In Vivo, in ASH. 2003: Orlando.
  15. Carlo-Stella, C., M. Di Nicola, M.C. Turco, L. Cleris, C. Lavazza, P. Longoni, M. Milanesi, M. Magni, M. Ammirante, A. Leone, Z. Nagy, W.R. Gioffre, F. Formelli, and A.M. Gianni, The anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody 1D09C3 activates the mitochondrial cell death pathway and exerts a potent antitumor activity in lymphoma-bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*, 2006. 66(3): p. 1799-808.
  16. Chung, C.H., Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *Oncologist*, 2008. 13(6): p. 725-32.
  17. Deetjen, P., E.-J. Speckmann, and J. Hescheler, *Physiologie*. 4. Auflage ed. 2004, München: Elsevier.
  18. Diehl, V., A. Engert, and D. Re, New strategies for the treatment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007. 21(5): p. 897-914.
  19. Dores, G.M., W.F. Anderson, R.E. Curtis, O. Landgren, E. Ostroumova, E.C. Bluhm, C.S. Rabkin, S.S. Devesa, and M.S. Linet, Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol*, 2007. 139(5): p. 809-19.
  20. Dreyling, M. and W. Hiddemann, *Lymphome*. Epidemiologie. 2005, Stuttgart: Thieme.
  21. Dreyling, M. and W. Hiddemann, Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: p. 542-51.
  22. Dreyling, M., H. Schmidtberger, and W. Hiddemann, Current therapeutic options in indolent lymphoma. *Onkologe*, 2006. 12: p. 612-618.

23. Engert, A., D.A. Eichenauer, and M. Dreyling, Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2010. 21 Suppl 5: p. v168-71.
24. Epstein, A.L., R.J. Marder, J.N. Winter, E. Stathopoulos, F.M. Chen, J.W. Parker, and C.R. Taylor, Two new monoclonal antibodies, Lym-1 and Lym-2, reactive with human B-lymphocytes and derived tumors, with immunodiagnostic and immunotherapeutic potential. *Cancer Res*, 1987. 47(3): p. 830-40.
25. Fedosov, D.A., J. Fornleitner, and G. Gompfer, Margination of white blood cells in microcapillary flow. *Phys Rev Lett*, 2012. 108(2): p. 028104.
26. Feugier, P., A. Van Hoof, C. Sebban, P. Solal-Celigny, R. Bouabdallah, C. Ferme, B. Christian, E. Lepage, H. Tilly, F. Morschhauser, P. Gaulard, G. Salles, A. Bosly, C. Gisselbrecht, F. Reyes, and B. Coiffier, 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.
27. Francisci, S., R. Capocaccia, E. Grande, M. Santaquilani, A. Simonetti, C. Allemani, G. Gatta, M. Sant, G. Zigon, F. Bray, and M. Janssen-Heijnen, The cure of cancer: a European perspective. *Eur J Cancer*, 2009. 45(6): p. 1067-79.
28. Freim Wahl, S.G., M.R. Folvik, and S.H. Torp, Progressive multifocal leukoencephalopathy in a lymphoma patient with complete remission after treatment with cytostatics and rituximab: case report and review of the literature. *Clin Neuropathol*, 2007. 26(2): p. 68-73.
29. Fruehauf, S., J. Tolpaly, A. Wilmes, and A. Ho, *Onkologie. Durchflusszytometrische Diagnostik maligner hämatologischer Erkrankungen*, ed. Z. WJ and z.H. H. 2001, Landsberg/Lech: Ecomed Verlag.
30. Fung, E., L. Esposito, J.A. Todd, and L.S. Wicker, Multiplexed immunophenotyping of human antigen-presenting cells in whole blood by polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc*, 2010. 5(2): p. 357-70.
31. Gentile, M., A.G. Recchia, E. Vigna, C. Mazzone, E. Lucia, V. Gigliotti, S. Bossio, A. Madeo, L. Morabito, P. Servillo, S. Franzese, N. Caruso, L. De Stefano, M.G. Bisconte, C. Gentile, and F. Morabito, Lenalidomide in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011. 20(2): p. 273-86.
32. Goodyear, M., Learning from the TGN1412 trial. *BMJ*, 2006. 332(7543): p. 677-8.

33. Hallek, M., Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol*, 2008. 19 Suppl 4: p. iv51-3.
34. Hallek, M., B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, and T.J. Kipps, Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5446-56.
35. Hallek, M. and B. Emmerich, *Chronisch lymphatische Leukämie*. 4. Auflage ed. 2009, Bremen: Uni-Med.
36. Hallek, M., K. Fischer, G. Fingerle-Rowson, A.M. Fink, R. Busch, J. Mayer, M. Hensel, G. Hopfinger, G. Hess, U. von Grunhagen, M. Bergmann, J. Catalano, P.L. Zinzani, F. Caligaris-Cappio, J.F. Seymour, A. Berrebi, U. Jager, B. Cazin, M. Trneny, A. Westermann, C.M. Wendtner, B.F. Eichhorst, P. Staib, A. Buhler, D. Winkler, T. Zenz, S. Bottcher, M. Ritgen, M. Mendila, M. Kneba, H. Dohner, and S. Stilgenbauer, Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 2010. 376(9747): p. 1164-74.
37. Hannel, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. DeBruyere, Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today*, 1992. 13(6): p. 215, 218.
38. Hansen, K., I.R. Ruttekolk, H. Glauner, F. Becker, R. Brock, and S. Hannus, The in vitro biological activity of the HLA-DR-binding clinical IgG4 antibody 1D09C3 is a consequence of the disruption of cell aggregates and can be abrogated by Fab arm exchange. *Mol Immunol*, 2009. 46(16): p. 3269-77.
39. Harris, N.L., E.S. Jaffe, H. Stein, P.M. Banks, J.K. Chan, M.L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K.C. Gatter, and et al., A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 1994. 84(5): p. 1361-92.
40. Horvitz, H.R., Obituary: Stanley J. Korsmeyer (1950-2005). *Nature*, 2005. 435(7039): p. 161.
41. Hu, E., A.L. Epstein, G.S. Naeve, I. Gill, S. Martin, A. Sherrod, P. Nichols, D. Chen, A. Mazumder, and A.M. Levine, A phase 1a clinical trial of LYM-1 monoclonal antibody

serotherapy in patients with refractory B cell malignancies. *Hematol Oncol*, 1989. 7(2): p. 155-66.

42. Ivanov, A., S.A. Beers, C.A. Walshe, J. Honeychurch, W. Alduaij, K.L. Cox, K.N. Potter, S. Murray, C.H. Chan, T. Klymenko, J. Erenpreisa, M.J. Glennie, T.M. Illidge, and M.S. Cragg, Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest*, 2009. 119(8): p. 2143-59.

43. Jemal, A., M.J. Thun, L.A. Ries, H.L. Howe, H.K. Weir, M.M. Center, E. Ward, X.C. Wu, C. Ehemann, R. Anderson, U.A. Ajani, B. Kohler, and B.K. Edwards, Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(23): p. 1672-94.

44. Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, and G. Winter, Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986. 321(6069): p. 522-5.

45. Kabelitz, D. and O. Janssen, Growth inhibition of Epstein-Barr virus-transformed B cells by anti-HLA-DR antibody L243: possible relationship to L243-induced down-regulation of CD23 antigen expression. *Cell Immunol*, 1989. 120(1): p. 21-30.

46. Keating, M.J., S. O'Brien, M. Albitar, S. Lerner, W. Plunkett, F. Giles, M. Andreeff, J. Cortes, S. Faderl, D. Thomas, C. Koller, W. Wierda, M.A. Detry, A. Lynn, and H. Kantarjian, Early results of a chemioimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2005. 23(18): p. 4079-88.

47. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 1975. 5(2): p. 112-7.

48. Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellenhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun, and B. Virnekas, Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol*, 2000. 296(1): p. 57-86.

49. Kohler, G. and C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975. 256(5517): p. 495-7.

50. Labrijn, A.F., A.O. Buijsse, E.T. van den Bremer, A.Y. Verwilligen, W.K. Bleeker, S.J. Thorpe, J. Killestein, C.H. Polman, R.C. Aalberse, J. Schuurman, J.G. van de Winkel, and P.W. Parren, Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol*, 2009. 27(8): p. 767-71.
51. Ley, K., Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*, 1996. 32(4): p. 733-42.
52. Lin, T.S., W. Stock, H. Xu, M.A. Phelps, M.S. Lucas, S.K. Guster, B.R. Briggs, C. Cheney, P. Porcu, I.W. Flinn, M.R. Grever, J.T. Dalton, and J.C. Byrd, A phase I/II dose escalation study of apolizumab (Hu1D10) using a stepped-up dosing schedule in patients with chronic lymphocytic leukemia and acute leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2009. 50(12): p. 1958-63.
53. Liu, Y.D., J.Z. van Enk, and G.C. Flynn, Human antibody Fc deamidation in vivo. *Biologicals*, 2009. 37(5): p. 313-22.
54. Lorenz, H.M., Technology evaluation: adalimumab, Abbott laboratories. *Curr Opin Mol Ther*, 2002. 4(2): p. 185-90.
55. Maloney, D.G., What is the role of maintenance rituximab in follicular NHL? *Oncology (Williston Park)*, 2008. 22(1): p. 20-6; discussion 26, 29, 33-4.
56. Manshour, T., K.A. Do, X. Wang, F.J. Giles, S.M. O'Brien, H. Saffer, D. Thomas, I. Jilani, H.M. Kantarjian, M.J. Keating, and M. Albitar, Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood*, 2003. 101(7): p. 2507-13.
57. Marcus, R., K. Imrie, A. Belch, D. Cunningham, E. Flores, J. Catalano, P. Solal-Celigny, F. Offner, J. Walewski, J. Raposo, A. Jack, and P. Smith, CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1417-23.
58. Mattes, M.J., Apoptosis assays with lymphoma cell lines: problems and pitfalls. *Br J Cancer*, 2007. 96(6): p. 928-36.
59. McKelvey, E.M., J.A. Gottlieb, H.E. Wilson, A. Haut, R.W. Talley, R. Stephens, M. Lane, J.F. Gamble, S.E. Jones, P.N. Grozea, J. Gutterman, C. Coltman, and T.E. Moon, Hydroxydaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer*, 1976. 38(4): p. 1484-93.

60. Moldenhauer, G., C. Henne, J. Karhausen, and P. Moller, Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology*, 1999. 96(3): p. 473-84.
61. Montagna, M., M. Montillo, M.A. Avanzini, C. Tinelli, A. Tedeschi, L. Visai, F. Ricci, E. Vismara, E. Morra, and M. Regazzi, Relationship between pharmacokinetic profile of subcutaneously administered alemtuzumab and clinical response in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 2011. 96(6): p. 932-6.
62. Nagy, Z.A., B. Hubner, C. Lohning, R. Rauchenberger, S. Reiffert, E. Thomassen-Wolf, S. Zahn, S. Leyer, E.M. Schier, A. Zahradnik, C. Brunner, K. Lobenwein, B. Rattel, M. Stanglmaier, M. Hallek, M. Wing, S. Anderson, M. Dunn, T. Kretzschmar, and M. Tesar, Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med*, 2002. 8(8): p. 801-7.
63. Nagy, Z.A. and N.A. Mooney, A novel, alternative pathway of apoptosis triggered through class II major histocompatibility complex molecules. *J Mol Med*, 2003. 81(12): p. 757-65.
64. Newell, M.K., J. VanderWall, K.S. Beard, and J.H. Freed, Ligation of major histocompatibility complex class II molecules mediates apoptotic cell death in resting B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(22): p. 10459-63.
65. O'Donnell, R.T., S. Shen, S.J. Denardo, T. Wun, D.L. Kukis, D.S. Goldstein, and G.L. Denardo, A phase I study of 90Y-2IT-BAD-Lym-1 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Res*, 2000. 20(5C): p. 3647-55.
66. Oldham, R.K. and R.O. Dillman, Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol*, 2008. 26(11): p. 1774-7.
67. Pezzutto, A., T. Ulrichs, and G.-R. Burmester, *Taschenatlas der Immunologie*. 2007, Stuttgart: Thieme.
68. Pfreundschuh, M., J. Schubert, M. Ziepert, R. Schmits, M. Mohren, E. Lengfelder, M. Reiser, C. Nickenig, M. Clemens, N. Peter, C. Bokemeyer, H. Eimermacher, A. Ho, M. Hoffmann, R. Mertelsmann, L. Trumper, L. Balleisen, R. Liersch, B. Metzner, F. Hartmann, B. Glass, V. Poeschel, N. Schmitz, C. Ruebe, A.C. Feller, and M. Loeffler, Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol*, 2008. 9(2): p. 105-16.

69. Pfreundschuh, M., L. Trumper, A. Osterborg, R. Pettengell, M. Trneny, K. Imrie, D. Ma, D. Gill, J. Walewski, P.L. Zinzani, R. Stahel, S. Kvaloy, O. Shpilberg, U. Jaeger, M. Hansen, T. Lehtinen, A. Lopez-Guillermo, C. Corrado, A. Scheliga, N. Milpied, M. Mendila, M. Rashford, E. Kuhnt, and M. Loeffler, CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol*, 2006. 7(5): p. 379-91.
70. Ratain, M.J., R. Mick, R.L. Schilsky, and M. Siegler, Statistical and ethical issues in the design and conduct of phase I and II clinical trials of new anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(20): p. 1637-43.
71. Regazzi, M.B., I. Iacona, M.A. Avanzini, L. Arcaini, G. Merlini, V. Perfetti, F. Zaja, M. Montagna, E. Morra, and M. Lazzarino, Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. *Ther Drug Monit*, 2005. 27(6): p. 785-92.
72. Reichert, J.M., Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*, 2011. 3(1): p. 76-99.
73. Rossi, E.A., D.L. Rossi, T.M. Cardillo, R. Stein, D.M. Goldenberg, and C.H. Chang, Preclinical studies on targeted delivery of multiple IFNalpha2b to HLA-DR in diverse hematologic cancers. *Blood*, 2011. 118(7): p. 1877-84.
74. Roucard, C., F. Garban, N.A. Mooney, D.J. Charron, and M.L. Ericson, Conformation of human leukocyte antigen class II molecules. Evidence for superdimers and empty molecules on human antigen presenting cells. *J Biol Chem*, 1996. 271(24): p. 13993-4000.
75. Salgado, F.J., J. Lojo, C.M. Fernandez-Alonso, J. Vinuela, O.J. Cordero, and M. Nogueira, Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunol Cell Biol*, 2002. 80(2): p. 138-47.
76. Schmidt, S., M. Dreyling, and D. Hölzel, *Manual Maligner Lymphome. Epidemiologie Maligner Lymphome*. 2004, München: Emmerich, B.
77. Stanglmaier, M., S. Reis, and M. Hallek, Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol*, 2004. 83(10): p. 634-45.

78. Stein, R., C. Balkman, S. Chen, K. Rassnick, M. McEntee, R. Page, and D.M. Goldenberg, Evaluation of anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody therapy in spontaneous canine lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2011. 52(2): p. 273-84.
79. Stein, R., P. Gupta, X. Chen, T.M. Cardillo, R.R. Furman, S. Chen, C.H. Chang, and D.M. Goldenberg, Therapy of B-cell malignancies by anti-HLA-DR humanized monoclonal antibody, IMMU-114, is mediated through hyperactivation of ERK and JNK MAP kinase signaling pathways. *Blood*, 2010. 115(25): p. 5180-90.
80. Stein, R., Z. Qu, S. Chen, D. Solis, H.J. Hansen, and D.M. Goldenberg, Characterization of a humanized IgG4 anti-HLA-DR monoclonal antibody that lacks effector cell functions but retains direct antilymphoma activity and increases the potency of rituximab. *Blood*, 2006. 108(8): p. 2736-44.
81. Stern, M. and R. Herrmann, Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. 54(1): p. 11-29.
82. Truman, J.P., M.L. Ericson, C.J. Choqueux-Seebold, D.J. Charron, and N.A. Mooney, Lymphocyte programmed cell death is mediated via HLA class II DR. *Int Immunol*, 1994. 6(6): p. 887-96.
83. Uhr, J.W., The 1984 Nobel Prize in medicine. *Science*, 1984. 226(4678): p. 1025-8.
84. van der Neut Kolfshoten, M., J. Schuurman, M. Losen, W.K. Bleeker, P. Martinez-Martinez, E. Vermeulen, T.H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L.A. Aarden, M.H. De Baets, J.G. van de Winkel, R.C. Aalberse, and P.W. Parren, Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, 2007. 317(5844): p. 1554-7.
85. Vidovic, D. and J.I. Toral, Selective apoptosis of neoplastic cells by the HLA-DR-specific monoclonal antibody. *Cancer Lett*, 1998. 128(2): p. 127-35.
86. Waldmann, T.A. and J. O'Shea, The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): p. 507-12.
87. Wang, B.S., K.A. Kelley, A.L. Lumanglas, A.M. Zimmer, and F.E. Durr, Internalization and shedding of Lym-1 monoclonal antibody following interaction with surface antigens of a cultured human B cell lymphoma. *Cell Immunol*, 1989. 123(2): p. 283-93.
88. Wiseman, G.A., L.I. Gordon, P.S. Multani, T.E. Witzig, S. Spies, N.L. Bartlett, R.J. Schilder, J.L. Murray, M. Saleh, R.S. Allen, A.J. Grillo-Lopez, and C.A. White, Ibritumomab

tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma and mild thrombocytopenia: a phase II multicenter trial. *Blood*, 2002. 99(12): p. 4336-42.

89. Witzens-Harig, M., M. Reiz, C. Heiss, A. Benner, M. Hensel, K. Neben, P. Dreger, A. Kraemer, and A.D. Ho, Quality of life during maintenance therapy with the anti-CD20 antibody rituximab in patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma: results of a prospective randomized controlled trial. *Ann Hematol*, 2009. 88(1): p. 51-7.

90. Zent, C.S., J.B. Chen, R.C. Kurten, G.P. Kaushal, H.M. Lacy, and S.A. Schichman, Alemtuzumab (CAMPATH 1H) does not kill chronic lymphocytic leukemia cells in serum free medium. *Leuk Res*, 2004. 28(5): p. 495-507.

91. Zola, H. and A. Beare, 1D09C3, an mAb specific for MHC-II. *Curr Opin Mol Ther*, 2008. 10(1): p. 68-74.

92. Zola, H., B. Swart, I. Nicholson, B. Aasted, A. Bensussan, L. Boumsell, C. Buckley, G. Clark, K. Drbal, P. Engel, D. Hart, V. Horejsi, C. Isacke, P. Macardle, F. Malavasi, D. Mason, D. Olive, A. Saalmueller, S.F. Schlossman, R. Schwartz-Albiez, P. Simmons, T.F. Tedder, M. Uguccioni, and H. Warren, CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*, 2005. 106(9): p. 3123-6.

**Eigene Publikation zur Zeit im Review Prozess bei *Cancer Immunology and Immunotherapy*:**

C. D. Schweighofer, A. Tuchscherer, S. Sperka, T. Meyer, B. Rattel, S. Stein, S. Ismail, T. Elter, P. Staib, M. Reiser, and M. Hallek; Clinical safety and pharmacological profile of the HLA-DR antibody 1D09C3 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and lymphoma – results from a phase I study

## **7 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.