

Wirkmechanismus des bispezifischen anti-CD19 x anti-CD3  
BiTE-Antikörpers MT103 in Patienten mit rezidivem  
indolentem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

Matthias Klinger  
aus München

vorgelegte

Dissertation

2009

Tag der mündlichen Prüfung:	26.02.2009
Dekan:	Prof. Dr. Hanspeter Mallot
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Patrick Bäuerle
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Wirkmechanismus des bispezifischen anti-CD19 x anti-CD3  
BiTE-Antikörpers MT103 in Patienten mit rezidivem  
indolentem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

Matthias Klinger

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.2. Das Immunsystem	2
1.3. Charakteristika des BiTE-Antikörpers MT103	10
1.4. Zielsetzungen dieser Arbeit	13
<b>2. Methoden</b>	<b>14</b>
2.1. Studienprotokoll der Studie MT103-104	14
2.2. Patientenkollektiv der Studie MT103-104	15
2.3. FACS-Analysen	17
2.3.1. Abnahme, Lagerung und Versand von Blutproben	17
2.3.2. Blutbild-Bestimmung	18
2.3.3. Isolierung der PBMC aus den Blutproben	18
2.3.4. Färbung der PBMC mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse	19
2.3.4.1. Färbungen der Lymphozyten-Subpopulationen	19
2.3.4.2. Färbung der regulatorischen T-Zellen	22
2.3.5. Durchflusszytometrische Aufnahme der gefärbten PBMC	24
2.3.6. Analyse der FACS-Rohdaten	24
2.3.7. Berechnungen und Endauswertung	26
2.4. Quantifizierung von MT103 in humanem Serum	27
2.5. Quantifizierung von Zytokinen in humanem Serum	28
2.5.1. Zytokin-Bestimmung durch CBA	28
2.5.2. Zytokin-Bestimmung durch ELISA	29
2.6. Bestimmung des zytotoxischen Potentials der CD8 <sup>+</sup> T-Zell- Subpopulationen	30
2.6.1. Isolierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen aus Vollblut	30
2.6.2. Radioaktive Markierung der Targetzellen	31
2.6.3. Zytotoxizitätstest	31

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1. Klinische Ergebnisse der Studie MT103-104	32
3.2. Pharmakokinetik	35
3.3. Verläufe der Lymphozyten-Subpopulationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dosisstufen	36
3.4. MT103-induzierte B-Zell-Apoptose	41
3.5. T-Zell-Effekte während der Einstiegsphase	43
3.5.1. T-Zell-Verläufe in Abhängigkeit der B-Zellzahl bei unterschiedlichen Einstiegsvarianten	43
3.5.2. Korrelation zwischen B-Zellzahl und T-Zell-Rückkehrkinetik	47
3.5.3. CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung während der Einstiegsphase	49
3.5.4. Erhöhte Adhäsivität der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	51
3.6. T-Zell-Effekte während der Effektorphase	53
3.6.1. Expansion der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	53
3.6.2. CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> -Zellen bilden das für die Expansion verantwortliche CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subset	55
3.6.3. CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> -Zellen besitzen ein großes zytotoxisches Potential	57
3.6.4. CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung während der Effektorphase	59
3.6.5. T-Zell-assoziierte Zytokin-Sekretion	61
3.6.6. Regulatorische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen sind an der T-Zell- Expansion nicht beteiligt	63
3.7. Klinische Implikationen der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Daten	64
3.7.1. Länge eines Behandlungszyklus	64
3.7.2. Länge der Pause zwischen zwei Behandlungszyklen	66
3.7.3. Korrelation zwischen der Expansion der CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> -Zellen und der klinischen Wirksamkeit	70
<b>4. Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1. Einstiegsvarianten in die MT103-Therapie	74
4.2. Behandlungsdauer und -pausen	79
4.3. Essentielle Bedeutung der CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> -Zellen für die MT103- vermittelte Zytotoxizität	82
4.4. Ausblick	84

---

<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6. Summary</b>	<b>89</b>
<b>7. Referenzen</b>	<b>91</b>

# Abkürzungen

A	Amplitude
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Ag	Antigen
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	Fläche unter der Kurve
BiTE	<i>Bispecific T Cell Engager</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR7	<i>(C-C Motif) Chemokinereceptor 7</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CR	<i>Complete Response</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DLT	Dosis-limitierende Toxizität
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale Effektorkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FasL	<i>Ligand of Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FBS	Fötales bovines Serum
F <sub>c</sub>	<i>Fragment crystallizable</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

---

FL	Folikuläres Lymphom
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
F <sub>v</sub>	<i>Fragment variable</i> (V <sub>H</sub> und V <sub>L</sub> )
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IC	Immunozytom
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA-1	<i>Leukocyte Function-associated Antigen-1</i>
LLOQ	Unterer Quantifizierungsgrenzwert
m	männlich
M	Molar
MCL	Mantelzelllymphom
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
<i>min</i>	Reduzierte Methylprednisolon-Dosis
MR	<i>Minor Response</i>
MT103	Bispezifisches anti-CD19 x anti-CD3 sc Antikörper-Konstrukt
MT110	Bispezifisches anti-EpCAM x anti-CD3 sc Antikörper-Konstrukt
MTD	Maximal tolerable Dosis
MW	Morbus Waldenström
MZL	Marginalzonenlymphom
N	Zellzahl
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
N-terminal	Amino-terminal
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PD	<i>Progressive Disease</i>

---

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PR	<i>Partial Response</i>
R-CHOP	Rituximab in Kombination mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sc	<i>single-chain</i>
SD	<i>Stable Disease</i>
sec	Sekunde
SLL	Kleinzelliges Lymphozytisches Lymphom
Tab.	Tabelle
T <sub>CM</sub> -Zellen	<i>Central</i> Memory-T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>EM</sub> -Zellen	<i>Effector</i> Memory-T-Zellen
T <sub>EMRA</sub> -Zellen	CD45RA exprimierende T <sub>EM</sub> -Zellen
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
T <sub>H1</sub> -Zellen	Typ 1 Helfer-T-Zellen
T <sub>H2</sub> -Zellen	Typ 2 Helfer-T-Zellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
t <sub>ss</sub>	Zeitpunkt, zu dem der <i>steady state</i> erreicht wird
V <sub>H</sub>	Variable Ig-Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V <sub>L</sub>	Variable Ig-Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
v/v	<i>volume per volume</i>
w	weiblich
w/v	<i>weight per volume</i>



# 1. Einleitung

## 1.1. B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

Leukämien entstehen durch maligne Transformation weißer Blutkörperchen und stellen innerhalb der Krebserkrankungen eine bedeutende Untergruppe mit weltweit 3,1 Millionen neuen Fällen pro Jahr dar<sup>1,2</sup>. Generell werden diese Krebszellen je nach ihrer hämatopoietischen Abstammung in myeloische oder lymphatische Formen eingeteilt. Während sich erstere hauptsächlich im Knochenmark manifestieren und Granulo- sowie Monozyten betreffen, findet man letztere vor allem in den Lymphgeweben. Sie werden daher auch als Lymphome bezeichnet und entwickeln sich aus B- oder T-Lymphozyten bzw. deren Vorläuferzellen. Historisch bedingt werden die Lymphome noch einmal in zwei große Gruppen unterteilt, den Morbus Hodgkin einerseits und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) andererseits<sup>3</sup>. Sie unterscheiden sich voneinander in ihren histologischen Charakteristika und werden je nach zellulärer Abstammung, Differenzierungsgrad sowie Lokalisierung des Tumors in viele weitere Subtypen eingeteilt<sup>4</sup>. Während es beim Morbus Hodgkin nur vier Typen gibt, werden alle anderen Lymphome unter der Bezeichnung NHL zusammengefasst. Außerdem erfolgt je nach Krankheitsverlauf der einzelnen NHL-Typen eine weitere Klassifizierung in indolente und aggressive Lymphome<sup>5</sup>. Dabei stellen die aggressiven bzw. hoch-malignen Lymphome eine akute, schnell fortschreitende Erkrankung dar. Im Gegensatz dazu sind die indolenten bzw. niedrig-malignen Lymphome durch einen chronischen Krankheitsverlauf gekennzeichnet, so dass zwischen Diagnose und Tod mehrere Jahre liegen können. Dabei wechseln sich Phasen, in denen das Lymphom stabil ist, mit solchen ab, in denen sich der Zustand langsam, aber kontinuierlich verschlechtert. Zu den indolenten B-NHL zählen z.B. die Chronische Lymphatische Leukämie (B-CLL), das Immunozytom, das Plasmazell-Myelom und Frühstadien des Follikulären Lymphoms (FL)<sup>5</sup>. Bei den aggressiven B-NHL kann man noch einmal zwischen Vorläufer- und reifzelligem B-Zell-Lymphomen differenzieren; Beispiele hierfür sind das Akute Lymphoblastische Lymphom (B-ALL) bzw. Spätstadien des FL und Mantelzell-

Lymphome (MCL)<sup>5</sup>. Die genetischen Ursachen der einzelnen B-NHL sind sehr vielfältig. Durch Mutationen in den Onkogenen TP53 (B-CLL), BCL-2 (FL), Cyclin D1 (MCL, Plasmazell-Myelom) oder BCR/ABL (B-ALL) kommt es zur Transformation und damit zur unkontrollierten Proliferation der betroffenen B-Lymphozyten<sup>6</sup>.

Jährlich erkranken 13 – 14 von 100.000 Menschen an den verschiedenen Formen der B-NHL<sup>2</sup>. Neben der Diagnose des Lymphomtyps ist das Erkrankungsstadium für eine erfolgreiche Behandlung von entscheidender Bedeutung. Je nach Ausbreitung des Lymphoms im Körper werden die B-NHL in die Stadien I – IV eingeteilt, und die Stadienbezeichnung durch den Zusatz A für das Fehlen bzw. B für das Vorhandensein von Allgemeinsymptomen wie Nachtschweiß, Fieber oder Gewichtsverlust ergänzt<sup>7</sup>. Für die Behandlung der B-NHL existiert keine einheitliche Standardtherapie; häufig werden auch verschiedene Therapieformen miteinander kombiniert, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Insbesondere bei einigen indolenten Lymphomen mit sehr langsamem Krankheitsfortschritt besteht die Möglichkeit einer abwartenden Haltung ohne sofortigen Behandlungsbeginn (sog. *wait and see*). Daneben kommen klassische Methoden wie die Strahlen- oder Chemotherapie und seit einigen Jahren verstärkt die Antikörpertherapie zum Einsatz. Bestes Beispiel für letztere ist Rituximab, ein anti-CD20 Antikörper, der an B-Zellen bindet und damit über verschiedene Mechanismen zu ihrer direkten Zerstörung führt<sup>8</sup>. Allerdings ist die Wirkung von Rituximab aufgrund eines genetisch bedingten Polymorphismus bei ca. 27% der Patienten sowie bei einigen Lymphomtypen stark eingeschränkt<sup>9</sup>. Trotz dieser unterschiedlichen Therapieformen ist zurzeit in den meisten Fällen nur eine Verzögerung des Krankheitsfortschritts, aber keine vollständige Heilung möglich.

## 1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem wird durch Zellen und Moleküle gebildet, die dem Organismus Schutz vor Infektionskrankheiten verleihen und deren kollektive und koordinierte Reaktion auf fremde Substanzen als Immunantwort bezeichnet wird. Generell unterscheidet man zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Die wichtigsten Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Phagozyten (Neutrophile,

Makrophagen) und  $CD3^-CD56^+$  NK-Zellen, das Komplement-System sowie regulierende Zytokine<sup>10</sup>. Charakteristisch für diese Komponenten ist, dass sie unspezifisch durch Oberflächen-Muster stimuliert werden, die verwandten Pathogenen gemeinsam sind, und bei wiederholten Infektionen mit einem bestimmten Pathogen jeweils gleich reagieren. Im Gegensatz dazu ist das adaptive Immunsystem durch die Spezifität für unterschiedliche Makromoleküle und die Fähigkeit, sich bei wiederholtem Kontakt mit einem bestimmten Pathogen an dieses zu erinnern und deshalb schneller und stärker zu reagieren, gekennzeichnet<sup>11</sup>. Die Aufgaben des adaptiven Immunsystems werden von den Lymphozyten übernommen, die in B- und T-Zellen unterteilt werden. Jede dieser Zellen besitzt auf ihrer Oberfläche einen klonotypischen Antigen-Rezeptor, der sich in seiner Spezifität von den Rezeptoren anderer B- bzw. T-Lymphozyten unterscheidet. Während eine Zelle, die durch Kontakt mit ihrem Antigen aktiviert wurde, proliferiert, so dass viele Zellen mit dem gleichen Antigen-Rezeptor gebildet werden, bleibt eine Reaktion der Zellen, die dieses Antigen nicht erkennen können, aus (sog. *clonal selection*)<sup>12</sup>.

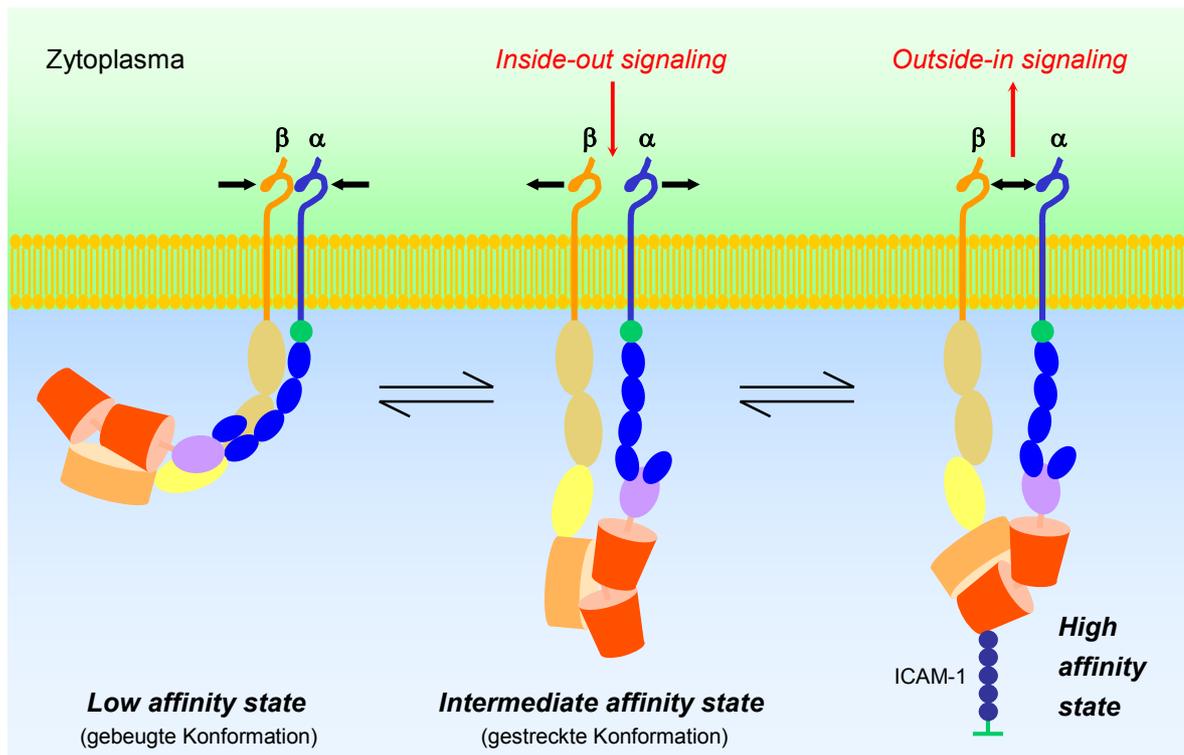
B-Zellen exprimieren neben den jeweiligen spezifischen Antigen-Rezeptoren die für ihre Aktivierung essentiellen Oberflächenmarker CD19 und CD20<sup>13</sup>. Nach Antigen-Kontakt differenzieren sie zu einer großen Zahl von kurzlebigen, Antikörperproduzierenden Plasma-B-Zellen und wenigen, langlebigen Memory-B-Zellen, die im Organismus zirkulieren und bei erneutem Antigen-Kontakt sehr effizient reaktiviert werden. Neben den B-Zellen kommt den T-Zellen zentrale Bedeutung für die adaptive Immunität zu. Der auf T-Zellen exprimierte Antigen-Rezeptor wird als T-Zell-Rezeptor (TCR) bezeichnet und setzt sich bei den meisten T-Zellen aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen<sup>14</sup>. Daneben existiert eine kleine Gruppe sog.  $\gamma\delta$  T-Zellen, deren TCR von je einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette gebildet wird und die im Gegensatz zu den klassischen T-Zellen spezialisierte, intra-epitheliale Funktionen übernehmen. Der TCR ist in der Zellmembran mit weiteren Transmembranproteinen assoziiert, die essentiell für seine Oberflächenexpression und die Signaltransduktion sind. Eines davon ist CD3 $\epsilon$ , das zusammen mit CD3 $\gamma$  und CD3 $\delta$  den CD3-Komplex bildet<sup>14</sup>. Während der B-Zell-Rezeptor native Makromoleküle binden kann, erkennt der TCR nur kurze Peptide von prozessierten Antigenen, die von anderen Zellen im Kontext von *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen auf ihren Oberflächen präsentiert werden. Dabei kommt es zum räumlich

engen Kontakt zwischen T-Zelle und Peptid-präsentierender Zelle, der als immunologische Synapse bezeichnet wird<sup>15</sup>. Bei der Erkennung der MHC-Moleküle spielen zwei weitere Oberflächenmarker auf T-Zellen, CD4 und CD8, eine wichtige Rolle. Anhand dieser Moleküle, die sich in ihrer Expression gegenseitig ausschließen, lassen sich die T-Zellen in zwei funktionell verschiedene Gruppen unterteilen: CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigene in einem MHC II-Kontext auf spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die externe Moleküle aufnehmen und zu Peptiden prozessieren. Durch den Antigen-Kontakt werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert und unterstützen die Proliferation und Differenzierung anderer Leukozyten durch Ausschüttung von Zytokinen oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt<sup>16</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden daher als Helfer-T-Zellen bezeichnet. Obwohl sie grundsätzlich auch das Potential besitzen, infizierte körpereigene Zellen zu zerstören, spielen sie dabei nur eine untergeordnete Rolle. Diese Funktion wird von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen übernommen, die man deshalb auch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) nennt. Sie erkennen zellinterne Peptide, die von infizierten Zellen im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert werden. Nach ihrer Aktivierung induzieren sie durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen oder durch die Expression von FasL Apoptose in den infizierten Zellen<sup>17</sup>. Neben den Helfer- und zytotoxischen T-Zellen existiert eine weitere, funktionell distinkte T-Zell-Population, die sog. regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen). Sie besitzen eine große Bedeutung bei der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen und exprimieren neben CD4 konstant sehr viele CD25-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Um sie von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden zu können, die CD25 transient hochregulieren, wird der Transkriptionsfaktor Foxp3 verwendet, dessen Expression für den regulatorischen Phänotyp notwendig und hinreichend ist<sup>18</sup>. T<sub>reg</sub>-Zellen supprimieren insbesondere zytotoxische T-Zellen durch Ausschüttung des Zytokins TGF- $\beta$  und durch direkte Zell-Zell-Kontakte und verhindern dadurch, dass autoreaktive T-Zellen fälschlicherweise erkannte körpereigene Zellen zerstören. Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen wird deshalb diskutiert, ob T<sub>reg</sub>-Zellen auch eine natürliche Immunantwort auf Krebszellen unterdrücken und damit kontraproduktiv wirken können<sup>19, 20</sup>.

Bei der Steuerung einer Immunantwort spielen neben direkten Zell-Zell-Kontakten immun-spezifische Hormone, sog. Zytokine und Chemokine, eine wichtige Rolle. Aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten produzieren für den jeweiligen Zelltyp

charakteristische Zytokine und regulieren dadurch die Art und Stärke der Immunantwort<sup>21</sup>. Zu Beginn einer Infektion schütten Makrophagen TNF- $\alpha$  aus, das lokal Entzündungsreaktionen und das Einwandern von Neutrophilen und Lymphozyten fördert sowie in höheren Konzentrationen systemisch zu Fieber führt. Das zeitlich nachfolgend produzierte Interleukin (IL)-12 bildet die Verbindung zum adaptiven Immunsystem und aktiviert neben NK- vor allem T-Zellen. IL-12 führt zur Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Effektor-T<sub>H</sub>1-Zellen, die dann zusammen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen große Mengen IFN- $\gamma$  produzieren. Dieses aktiviert erneut stark Makrophagen, so dass die T<sub>H</sub>1-Differenzierung durch diese positive Rückkopplung noch verstärkt wird. Außerdem steigert IL-12 die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Antigen-stimulierte T-Zellen bilden den autokrin wirkenden Wachstumsfaktor IL-2, der für die klonale Expansion verantwortlich ist. Sind an einer Immunantwort keine Makrophagen beteiligt, so dass die Stimulation durch IL-12 fehlt, produzieren aktivierte naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen IL-4, das zu ihrer Differenzierung in Effektor-T<sub>H</sub>2-Zellen führt. Diese schütten weiteres IL-4 aus, das Makrophagen hemmt und antagonistisch zu IFN- $\gamma$  wirkt, so dass die T<sub>H</sub>2-Differenzierung dadurch verstärkt wird. Außerdem produzieren T<sub>H</sub>2-Zellen ebenso wie Makrophagen selbst IL-10, das die Funktion letzterer inhibiert und damit eine überschießende Immunantwort durch negative Rückkopplung verhindert.

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die die Migration von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe entlang eines Gradienten regulieren. Obwohl die Leukozyten je nach Zelltyp und Differenzierung in unterschiedliche Gewebe wandern, liegt diesem Vorgang prinzipiell der gleiche mehrstufige Mechanismus zugrunde<sup>22</sup>: Nicht-aktivierte Leukozyten exprimieren Selectin-Liganden und das heterodimere Integrin LFA-1, das in diesem Stadium in einer gebeugten Konformation vorliegt und deshalb eine sehr niedrige Affinität für seinen Liganden ICAM-1 auf ruhenden Endothelzellen besitzt. Im Gegensatz dazu exprimieren aktivierte Endothelzellen Selectine und weitere Integrin-Liganden und präsentieren Chemokine auf ihrer Oberfläche. Durch schwache Selectin-Ligand-Interaktionen können jetzt Leukozyten an die Endothelzellen adhären; allerdings werden diese Bindungen immer wieder durch die Scherkraft des Blutflusses unterbrochen, so dass die Leukozyten letztlich entlang des Endothels rollen. Gleichzeitig werden sie durch die Chemokine aktiviert, was zu einer Neuordnung ihres Zytoskeletts und einer Konforma-



**Abb. 1.1. Konformations- und damit einhergehende Affinitätsänderungen des Integrins LFA-1.** Das heterodimere Integrin LFA-1 setzt sich aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (CD11a bzw. CD18) zusammen und wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert. Auf ruhenden Zellen liegt es in einer gebeugten Konformation vor, in der die eigentliche Bindungsdomäne eine niedrige Affinität für den Liganden ICAM-1 besitzt (sog. *low affinity state*). Die durch TCR-Stimulation oder Chemokine induzierte Signaltransduktion führt u.a. zu einer Neuordnung des Zytoskeletts, die sich auch auf LFA-1 überträgt (sog. *inside-out signaling*). Dabei geht LFA-1 in eine gestreckte Konformation über, die mit einer steigenden Affinität für ICAM-1 verbunden ist (*intermediate affinity state*). Die jetzt stattfindende Bindung von LFA-1 an ICAM-1 löst eine weitere Konformationsänderung in der Bindungsdomäne von LFA-1 aus, die nochmals zu einer Zunahme der Affinität für ICAM-1 führt (*high affinity state*). Aufgrund dieser hoch affinen Bindung können die T-Zellen stabil an das Endothel adhären. Gleichzeitig erhalten sie dadurch auch ein Signal, das sie veranlasst, durch das Endothel hindurch in das umliegende Gewebe einzuwandern (*outside-in signaling*).

tionsänderung des damit verbundenen LFA-1 führt (sog. *inside-out signaling*)<sup>23, 24</sup>. Dabei geht LFA-1 von der gebeugten in eine gestreckte Konformation über, die eine mittlere Affinität für ICAM-1 aufweist (sog. *intermediate affinity state*)<sup>25, 26</sup>. Die jetzt mögliche Interaktion mit ICAM-1 induziert in der an der Bindung beteiligten Domäne von LFA-1 eine weitere Konformationsänderung, wodurch es nochmals zu einer Steigerung der Affinität für ICAM-1 kommt<sup>25</sup>. Aus dieser hoch affinen Bindung zwischen LFA-1 und ICAM-1 resultiert eine stabile Adhäsion der aktivierten

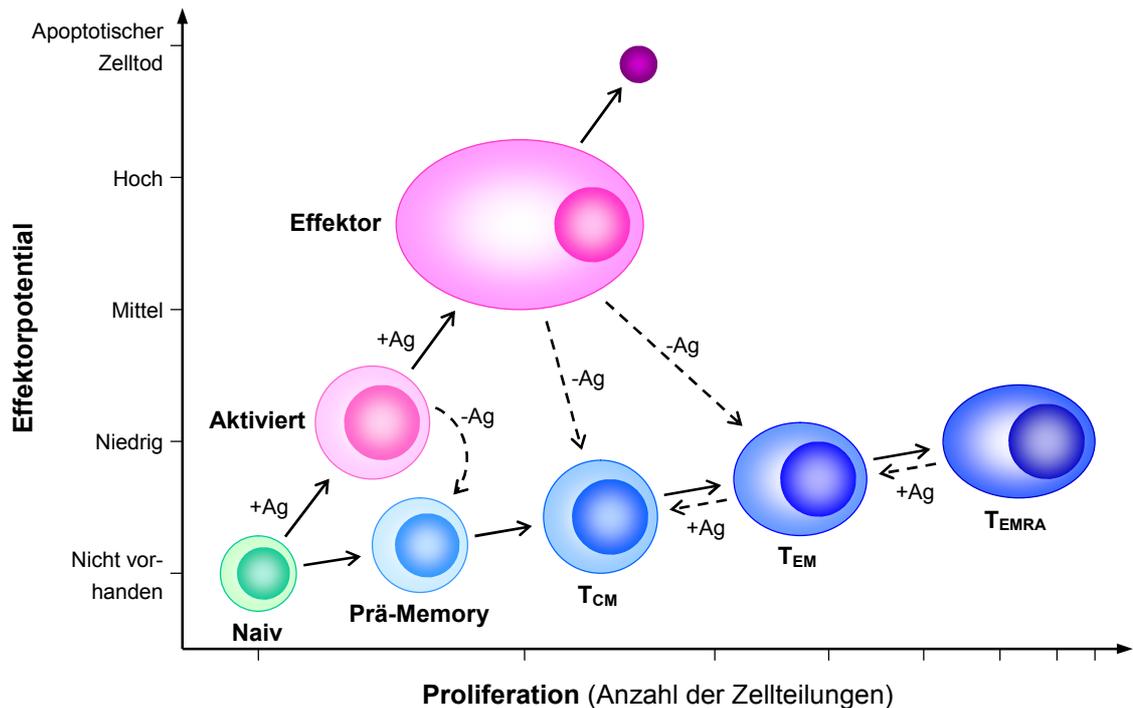
Leukozyten an das Endothel. Außerdem erhalten die Leukozyten dadurch ihrerseits ein Signal, das sie veranlasst, zwischen den Endothelzellen hindurch in das umliegende Gewebe einzuwandern (sog. *outside-in signaling*)<sup>24</sup>. Die einzelnen Bindungsstadien von LFA-1 spielen also eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Extravasation der Leukozyten.

Die primäre Immunantwort des adaptiven Immunsystems kann in vier Phasen unterteilt werden: Antigen-Erkennung, Lymphozyten-Aktivierung und -Expansion, Eliminierung des Antigens und Kontraktion der Lymphozyten. Dieser Ablauf soll im folgenden anhand der T-Zellen näher erläutert werden. In den Lymphknoten werden die durch APC prozessierten und auf MHC-Molekülen präsentierten Peptid-Antigene von naiven T-Zellen erkannt, die einen für das jeweilige Antigen spezifischen TCR besitzen (*clonal selection*). Damit diese T-Zellen in der folgenden Phase aktiviert werden, müssen sie gleichzeitig zwei unterschiedliche Signale erhalten. Neben der eigentlichen Antigen-Erkennung durch den TCR ist eine Co-Stimulation durch membrangebundene Moleküle auf den APC oder durch Zytokine erforderlich<sup>27</sup>. Die Aktivierung führt dann zu einer Neusynthese von Proteinen, zur Proliferation und klonalen Expansion sowie zu einer Differenzierung in Effektor-T-Zellen. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung lässt sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker verfolgen. Der bereits nach wenigen Stunden detektierbare frühe Aktivierungsmarker CD69, ein C-Typ Lectin, wird bis zu zwei Tage lang gebildet und verhindert in diesem Zeitraum wahrscheinlich, dass die T-Zellen den Lymphknoten schnell verlassen<sup>28, 29</sup>. Nach ca. einem Tag wird die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 hochreguliert<sup>30</sup>. Dabei handelt es sich um die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, die die konstitutiv exprimierte  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette zu einem funktionellen Rezeptor mit hoher IL-2-Affinität ergänzt<sup>31</sup>. Der erst nach mehreren Tagen produzierte späte Aktivierungsmarker HLA-DR gehört zur Klasse der MHC II-Moleküle, die normalerweise nur auf APC vorzufinden sind. Die spezielle Funktion dieses Markers auf aktivierten T-Zellen ist bislang nicht umfassend geklärt<sup>28</sup>. In der sich an die Aktivierung anschließenden Effektorphase werden die Antigene durch T-Zell-spezifische Mechanismen eliminiert. Nach Beseitigung der Antigene sterben die Effektor-T-Zellen in der Kontraktionsphase durch Apoptose ab, da sie wahrscheinlich von Antigen-induzierten Wachstumsfaktoren abhängig sind<sup>32</sup>. Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass durch die Aktivierung ein defi-

niertes zelluläres Programm ausgelöst wird, dass unabhängig von der vollständigen Eliminierung der Antigene nach ca. vier Wochen zur Apoptose der Effektor-T-Zellen führt<sup>33, 34</sup>. Letzteres Modell würde auch erklären, warum bei bestimmten chronischen Virusinfektionen nach der primären Immunantwort eine niedrige Antigen-Konzentration persistiert, die letztlich in einer Anergie potentiell reaktiver T-Zellen resultieren kann<sup>35, 36</sup>.

Die primäre Immunantwort endet mit der Homöostase der T-Lymphozyten auf Ausgangsniveau. Allerdings haben sich in ihrem Verlauf sog. Memory-T-Zellen gebildet, die für die ursprünglich erkannten Antigene spezifisch sind und auch ohne deren Vorhandensein über einen langen Zeitraum hinweg im Körper zirkulieren können<sup>37</sup>. Bei erneutem Kontakt mit diesen Antigenen werden die entsprechenden Memory-T-Zellen reaktiviert und lösen eine sekundäre Immunantwort aus. Grundsätzlich entspricht deren Ablauf dem einer primären Immunantwort, wobei die Memory-T-Zellen schneller und stärker als naive T-Zellen reagieren<sup>38</sup>.

Die Memory-T-Zellen können in funktionell unterschiedliche Subsets eingeteilt werden<sup>39, 40</sup>. Dazu wird die Expression von drei Oberflächenmarkern miteinander kombiniert. CD45RA ist eine das Exon A enthaltende *Splice*-Isoform von CD45 und enthält zytosolisch eine Tyrosinphosphatase, die an der Signalverstärkung bei der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist für das *Homing* der T-Zellen in Lymphknoten erforderlich. Bei CD28 handelt es sich um den zentralen Rezeptor für die Co-Stimulation von T-Zellen. Während die Definition der einzelnen Subsets inzwischen allgemein anerkannt ist, wird deren Entwicklung weiterhin kontrovers diskutiert<sup>41, 42</sup>. Nach dem Modell der linearen Differenzierung entstehen aus naiven CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-Zellen zunächst *Central* Memory-T-Zellen (T<sub>CM</sub>-Zellen, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>). Dabei bezieht sich *Central* auf die Tatsache, dass diese Zellen wie naive T-Zellen Zugang zu lymphatischen Organen haben<sup>39, 43</sup>. Im Gegensatz dazu halten sich die aus T<sub>CM</sub>-Zellen hervorgehenden *Effector* Memory-T-Zellen (T<sub>EM</sub>-Zellen, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>+/-</sup>) aufgrund der fehlenden CCR7-Expression bevorzugt in peripherem (nicht-lymphatischem) Gewebe auf. Sie besitzen vorwiegend zytotoxische Eigenschaften und können nach Antigen-Kontakt stark expandieren<sup>43</sup>. Speziell bei den CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen wurde ein weiteres Subset beschrieben, die sog. T<sub>EMRA</sub>-Zellen. Es handelt sich dabei um T<sub>EM</sub>-Zellen, die CD45RA wieder exprimieren



**Abb. 1.2. Modell der Memory-T-Zell-Differenzierung.** Naive T-Zellen werden durch Antigenkontakt entweder aktiviert oder entwickeln sich zu Prä-Memory-T-Zellen. Allerdings sind die Mechanismen, die dieser unterschiedlichen Differenzierung zugrunde liegen, noch weitgehend unbekannt. Die T-Zell-Aktivierung führt zur Bildung zytotoxischer Effektor-T-Zellen, die nach der Eliminierung des Antigens durch Apoptose absterben. Unabhängig davon entstehen aus den Prä-Memory-T-Zellen durch eine gerichtete lineare Differenzierung die eigentlichen Memory-T-Zell-Subsets (T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>EMRA</sub>). In diesem Modell verfügen T<sub>EMRA</sub>-Zellen über das größte zytotoxische Potential aller Memory-T-Zellen, sind aber vergleichsweise proliferationsinkompetent. Allerdings gibt es inzwischen Hinweise, dass auch eine reversible Differenzierung möglich ist. Demnach entstehen T<sub>EMRA</sub>-Zellen vorwiegend dadurch, dass der entsprechende Antigenkontakt über einen langen Zeitraum hinweg fehlt. Bei erneuter Stimulation können sie sich jedoch schnell wieder zu (phänotypischen) T<sub>EM</sub>- und T<sub>CM</sub>-Zellen zurück entwickeln. Insofern besteht wahrscheinlich eine gewisse Dynamik zwischen den einzelnen Memory-T-Zell-Subsets. Außerdem wird vermutet, dass die Memory-T-Zellen auch direkt aus Effektor-T-Zellen gebildet werden können, nachdem diese das Antigen erfolgreich eliminiert haben.

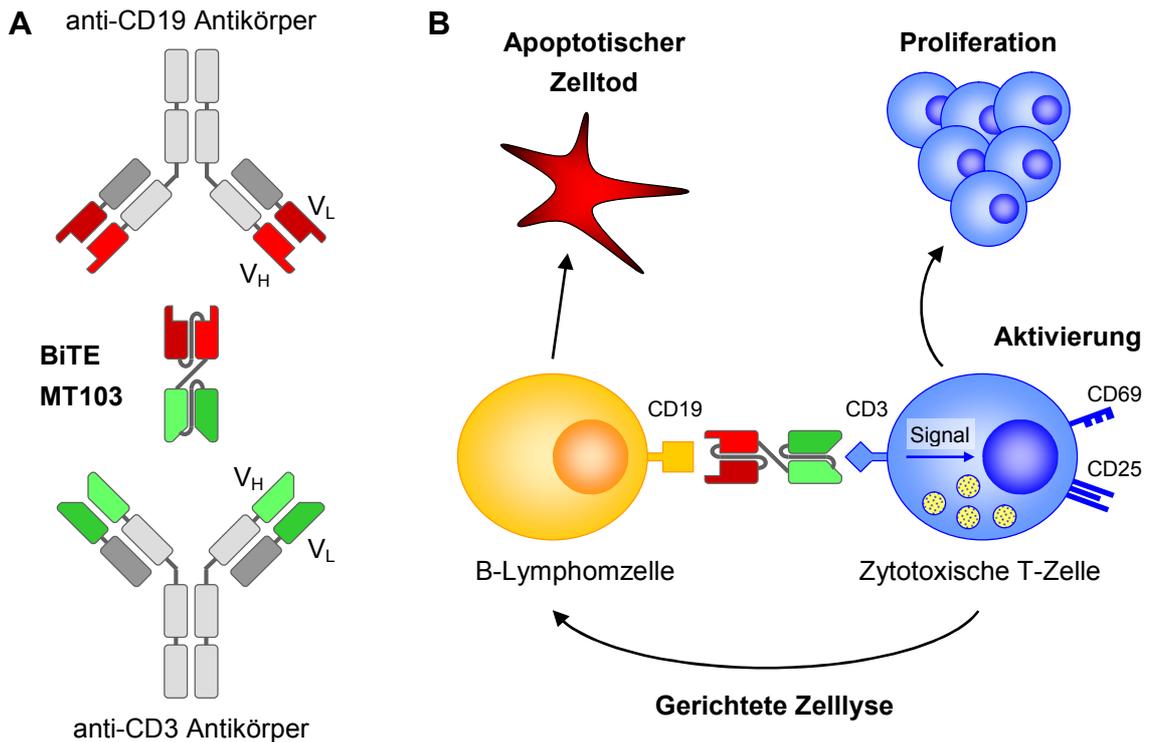
(CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>). In diesem Modell stellen T<sub>EMRA</sub>-Zellen die am weitesten differenzierten Memory-T-Zellen dar, wofür ihre große Anzahl zytotoxischer Granula und ihr geringes proliferatorisches Potential sprechen würden<sup>43</sup>. Allerdings könnte letzteres auch ein Anzeichen herabgesetzter Reaktivität sein, da T<sub>EMRA</sub>-Zellen verstärkt bei chronischen Virusinfektionen beobachtet werden<sup>35</sup>. Außerdem mehren sich inzwischen Hinweise, dass Memory-T-Zellen entgegen einer strikt

linearen Entwicklung aus naiven T-Zellen auch aus bereits differenzierten Effektor-T-Zellen entstehen können<sup>42</sup>. Weiterhin deuten *in vitro* Experimente auf eine reversible Differenzierung hin. Danach führt über einen längeren Zeitraum fehlender Antigen-Kontakt zur Bildung von T<sub>EMRA</sub>-Zellen und zur Anhäufung zytotoxischer Granula. Nach erneuter Antigen-Stimulation proliferieren diese Zellen jedoch, verlieren CD45RA und entwickeln sich zu funktionellen T<sub>EM</sub>- und T<sub>CM</sub>-Zellen<sup>44, 45</sup>. Insofern sind die Auslöser und Zusammenhänge der Differenzierung in die einzelnen Memory-T-Zell-Subsets noch nicht abschließend geklärt.

### 1.3. Charakteristika des BiTE-Antikörpers MT103

T-Zellen bilden also die zentrale Komponente des Immunsystems für die spezifische und effiziente Zerstörung erkrankter körpereigener Zellen. Voraussetzung dafür ist allerdings die Präsentation bakterieller oder viraler, d.h. körperfremder Peptid-Antigene durch MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche. Da es sich bei Krebs um entartete körpereigene Zellen handelt, besteht gegenüber ihren Proteinen meist immunologische Toleranz. Selbst immunogene Mutationen lösen oft keine effiziente Immunantwort aus, da einerseits zu wenige naive T-Zellen mit entsprechender Spezifität existieren und andererseits Tumore sog. *Escape*-Mechanismen entwickeln können, die das Immunsystem umgehen und/oder unterdrücken<sup>46</sup>. Daher können T-Zellen alleine keinen natürlichen Schutz vor Krebserkrankungen bieten. Während Strahlen- oder Chemotherapien relativ unspezifisch wirken, sind gerichtete, Antikörper-basierte Therapien meist nur begrenzt wirksam. Um diese beiden Therapie-Ansprüche, Spezifität und Effizienz, miteinander zu verbinden, wurde ein gänzlich neuartiges Konzept entwickelt. Es basiert auf der Idee, das große zytotoxische Potential der T-Zellen unabhängig von ihrer durch den jeweiligen TCR vermittelten Spezifität für die Zerstörung von Krebszellen auszunutzen. Dabei wird die fehlende Spezifität der T-Zellen durch sog. BiTE-Moleküle aufgehoben, die sowohl an Krebs- als auch an T-Zellen binden können.

BiTE (*Bispecific T Cell Engager*)-Moleküle bilden eine neuartige Wirkstoffklasse bispezifischer *single-chain* (sc) Antikörper-Konstrukte<sup>47, 48</sup>. Nachfolgend sollen ihre grundlegenden Eigenschaften anhand des in dieser Arbeit eingesetzten Moleküls



**Abb. 1.3. Aufbau und Wirkmechanismus des BiTE-Moleküls MT103.** **A.** MT103 ist ein bispezifisches Antikörper-Konstrukt, das sich aus einer N-terminalen CD19-spezifischen scF<sub>v</sub>-Domäne und einer C-terminalen CD3<sub>ε</sub>-spezifischen scF<sub>v</sub>-Domäne zusammensetzt, die über einen kurzen, flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Die scF<sub>v</sub>-Domänen sind jeweils von den variablen Regionen V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> eines CD19- bzw. CD3<sub>ε</sub>-spezifischen murinen Antikörpers abgeleitet. **B.** Die BiTE-vermittelte Bindung von T-Zellen an mit MT103 bedeckte B-Zellen führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse. Dabei erhalten die T-Zellen ein TCR-analoges Signal, das eine polyclonale Aktivierung bewirkt. Durch Ausschüttung zytotoxischer Granula, die in den gebundenen B-Zellen Apoptose induzieren, kommt es zu einer gerichteten Zellyse der B-Zellen. Gleichzeitig wird durch Proliferation und Expansion der aktivierten T-Zellen eine große Anzahl reaktiver T-Zellen gebildet, die anschließend ebenfalls für die Eliminierung der B-Zellen zur Verfügung stehen.

MT103 kurz dargestellt werden. MT103 ist ein ca. 55 kDa großes rekombinantes murines Protein<sup>49</sup>. Es besteht aus einer N-terminalen CD19-spezifischen scF<sub>v</sub>-Domäne und einer C-terminalen CD3<sub>ε</sub>-spezifischen scF<sub>v</sub>-Domäne, die über einen kurzen, flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Dieser ermöglicht die freie Rotation und das Abknicken der beiden scF<sub>v</sub>-Domänen gegeneinander. Die biochemische Charakterisierung der Bindungsaffinitäten lieferte für CD19 und CD3<sub>ε</sub> Dissoziationskonstanten von 10<sup>-9</sup> M bzw. 10<sup>-7</sup> M, d.h. MT103 bindet ca. 100 mal stärker an B- als an T-Zellen<sup>50</sup>. Damit bilden mit MT103 bedeckte B-Zellen eine

von der jeweiligen Spezifität des TCR unabhängige Aktivierungsmatrix für T-Zellen. Nach Bindung letzterer kommt es ähnlich wie in der natürlichen Immunantwort zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, die über einen längeren Zeitraum zu einem engen räumlichen Kontakt zwischen den beteiligten B- und T-Zellen führt<sup>51</sup>. Dabei erhalten die T-Zellen durch das Binden von MT103 an CD3 $\epsilon$ , das eine integrale Komponente der Signaltransduktion des TCR bildet, ein Signal, das qualitativ der Stimulation des TCR durch Peptid-MHC-Komplexe entspricht. Anders als bei naiven T-Zellen ist jedoch für die vollständige Aktivierung der T-Zellen, die bereits Antigen-Kontakt hatten, keine Co-Stimulation erforderlich. Außerdem kommt es aufgrund der TCR-Unabhängigkeit der BiTE-vermittelten Stimulation zu einer polyklonalen Aktivierung, die sich in der Expression von Aktivierungsmarkern, der Ausschüttung von Zytokinen, der Proliferation und Expansion sowie in der Zytotoxizität gegenüber den gebundenen B-Zellen äußert<sup>52</sup>. Dabei erfolgt die Zerstörung letzterer durch natürliche, den T-Zellen inhärente Mechanismen wie die Ausschüttung von Perforin und Granzyme B; MT103 initiiert lediglich diese Reaktionen. Sind dagegen keine CD19<sup>+</sup> B-Zellen vorhanden, führt die ausschließliche Bindung von MT103 an T-Zellen nicht zu deren Aktivierung. Die EC<sub>50</sub> von MT103 beträgt *in vitro* ca. 50 pg/ml und liegt damit ca. 100.000 mal niedriger als die EC<sub>50</sub> vergleichbarer Antikörper wie z.B. Rituximab<sup>50</sup>. Diese hohe Effizienz lässt sich u.a. dadurch erklären, dass bereits wenige, durch MT103 gleichzeitig gebundene CD3 $\epsilon$ -Moleküle für die Aktivierung einer T-Zelle ausreichen. Außerdem ist eine einzelne T-Zelle in der Lage, hintereinander mehrere B-Zellen zu eliminieren<sup>53</sup>. Beide Beobachtungen zeigen das große zytotoxische Potential der BiTE-Moleküle. In einer toxikologischen Studie an Schimpansen, der einzig relevanten Spezies, traten bei wiederholten 2-stündigen MT103-Infusionen mit einer Dosierung von 0,1  $\mu$ g/kg Körpergewicht nur geringe Nebenwirkungen auf<sup>54</sup>. Pharmakodynamische Untersuchungen bestätigten die erwartete T-Zell-Aktivierung, die mit einer transienten Depletion der B-Zellen im peripheren Blut verbunden war<sup>54</sup>. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MT103 ein TCR-analoges Signal vermittelt und damit zur Aktivierung der T-Zellen führt. Diese ist B-Zell-, aber nicht co-stimulationsabhängig und resultiert in der Eliminierung der B-Zellen durch zytotoxische T-Zellen. Dabei hat sich MT103 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als sicheres und gleichzeitig sehr effizientes Molekül erwiesen.

## 1.4. Zielsetzungen dieser Arbeit

Nach Abschluss der präklinischen Entwicklung wird zurzeit eine klinische Phase I-Studie mit MT103 durchgeführt, in die austherapierte Patienten mit rezidiven indolenten B-NHL eingeschlossen werden. Primäres Studienziel ist die Beurteilung der Sicherheit und Tolerierbarkeit einer kontinuierlichen intravenösen MT103-Infusion auf steigenden Dosisstufen. Dabei kann sowohl die MTD als auch ein mögliches therapeutisches Dosisfenster ermittelt werden. Sekundäre Studienziele sind die Bestimmung pharmakokinetischer und -dynamischer Parameter sowie die Anti-Tumor-Wirksamkeit der MT103-Therapie. Da es sich bei MT103 um das erste BiTE-Molekül in der klinischen Erprobung handelt, ist es notwendig, die durch MT103 ausgelösten Reaktionen des adaptiven Immunsystems auf zellulärer Ebene zu verstehen. Dazu wird in der vorliegenden Arbeit der zeitliche Verlauf der involvierten Zellpopulationen sowie ihrer Aktivierung und Adhäsion während der MT103-Behandlung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei stehen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

- Welche Auswirkungen hat der für MT103 beschriebene Wirkmechanismus auf B-, T- und NK-Zellen? Welche Zell(sub)populationen sind an den MT103-vermittelten Effekten beteiligt? Wie ist deren zeitlicher Verlauf?
- Wie erfolgt eine optimale MT103-Dosierung? Wie kann einerseits ein Behandlungsbeginn mit möglichst geringen Nebenwirkungen erreicht werden? Wie lange soll andererseits ein Therapiezyklus dauern und wie viel Zeit zwischen zwei Zyklen liegen, um eine möglichst große Wirksamkeit zu erzielen?
- Korrelieren Art und Stärke der T-Zell-Antwort mit einem möglichen Therapieerfolg? Existiert ein zellulärer *surrogate marker*, anhand dessen Verlaufs die klinische Wirksamkeit von MT103 abgeschätzt werden kann?
- Können eventuell auftretende Nebenwirkungen mit den zeitlichen Verläufen einzelner Zell(sub)populationen erklärt werden?

## 2. Methoden

### 2.1. Studienprotokoll der Studie MT103-104

Die Phase I-Studie MT103-104 wurde nach einem 3+3 Dosisescalationsschema durchgeführt: Auf jeder Dosisstufe wurden zunächst 3 Patienten behandelt. Wenn dabei keine DLT auftrat, konnte die Studie auf der nächst höheren Dosisstufe fortgesetzt werden. Kam es dagegen zu einer DLT, mussten auf dieser Dosisstufe 3 weitere Patienten in die Studie eingeschlossen werden, bevor die Dosis gesteigert werden konnte, wobei dabei keine weitere DLT auftreten durfte. Bei 2 DLT-Ereignissen innerhalb einer Dosisstufe wäre die Studie beendet gewesen, und die nächst niedrigere Dosisstufe hätte die MTD dargestellt.

Die MT103-Applikation erfolgte in dieser Studie durch *continuous infusion*, d.h. die jeweilige MT103-Menge pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche innerhalb von 24 h wurde mit Hilfe einer Pumpe kontinuierlich infundiert. Patienten, die die gleiche MT103-Dosierung und Co-Medikation mit Methylprednisolon erhielten, wurden zu Kohorten zusammengefasst (Tab. 2.1.):

**Tab. 2.1. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit durchgeführte Kohorten** (Erläuterungen im Text).

Kohorte	MT103-Dosis	Methylprednisolon-Dosis
1	0,5 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1 500 mg, Tag 2 250 mg, Tag 3+4 je 125 mg
2	1,5 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1 500 mg, Tag 2 250 mg, Tag 3+4 je 125 mg
2 <i>min</i>	1,5 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1 100 mg
3	5 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1 100 mg
4 <i>step</i>	15 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1+2 je 100 mg
4 <i>ramp</i>	15 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1+2 je 100 mg
4 <i>flat</i>	15 µg/(m <sup>2</sup> *24 h)	Tag 1+2 je 100 mg

Die einzelnen Kohorten unterschieden sich hinsichtlich ihrer MT103-Dosierung und Co-Medikation. Patienten in den Kohorten 1, 2, 2 *min* und 3 erhielten von Behandlungsbeginn an die der jeweiligen Dosisstufe entsprechende MT103-Dosis. In der Kohorte 4 *step* wurde zunächst für 24 h die MT103-Dosis 5 µg/(m<sup>2</sup>\*24 h) ver-

abreicht, bevor diese auf  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erhöht wurde. Dieses Einstiegsschema wurde in der Kohorte 4 *ramp* dahingehend verändert, dass die MT103-Dosis innerhalb der ersten 24 h linear von 0 auf  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  gesteigert wurde. Dagegen wurde in der Kohorte 4 *flat* die Behandlung unmittelbar mit der MT103-Dosis  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  begonnen. Um eine mögliche, mit dem *first dose effect* verbundene hohe Zytokin-Ausschüttung zu minimieren, wurde zu Behandlungsbeginn das synthetische Glucocorticoid Methylprednisolon eingesetzt. Dabei erhielten Patienten in den Kohorten 1 und 2 zunächst 500 mg Methylprednisolon vor Behandlungsbeginn und jeweils weitere 250 bzw. 125 mg an den Tagen 2 bzw. 3 und 4 der Behandlung. Ab der Kohorte 2 *min* wurde die Methylprednisolon-Dosis auf einmalig 100 mg vor Behandlungsbeginn (bzw. ab der Kohorte 4 *step* zusätzlich auch an Tag 2 der Behandlung) reduziert.

Sofern keine gegenteilige medizinische Indikation vorlag, wurden die Patienten 4 Wochen mit MT103 behandelt. Falls sich der Krankheitsverlauf bei der anschließenden klinischen Beurteilung nicht verschlechtert hatte, konnten die Patienten die MT103-Therapie weitere 4 Wochen erhalten. Außerdem hatten Patienten ab der Kohorte 4 *step* die Möglichkeit, nach einer jeweils mindestens 4-wöchigen Pause an maximal 2 weiteren Behandlungszyklen mit MT103 teilzunehmen.

Die klinische Auswertung der Studie umfasste neben der Evaluation der Sicherheit von MT103 den Lymphknoten- und Knochenmarksbefall durch (maligne) B-Zellen und erfolgte nach standardisierten Cheson-Kriterien<sup>55</sup>.

## 2.2. Patientenkollektiv der Studie MT103-104

Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit waren 25 Patienten mit initial diagnostiziertem indolentem B-NHL in einem fortgeschrittenen Stadium in die Studie MT103-104 eingeschlossen (Tab. 2.2.):

**Tab. 2.2. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit rekrutierte Patienten.**

Kohorte	Patient <sup>1)</sup>	Geschlecht	Alter <sup>2)</sup>	Diagnose	Stadium
1	101-001	m	71	IC	Binet C
	101-002	w	67	MCL	IV / A

Kohorte	Patient <sup>1)</sup>	Geschlecht	Alter <sup>2)</sup>	Diagnose	Stadium
1	101-003	m	67	CLL	IV / B
2	101-004	m	69	MCL	IV / B
	101-005	m	49	MCL	IV / A
	103-001	m	71	MCL	IV / B
2 min	107-001	m	65	CLL	IV / B
	108-001	m	77	MCL	IV / B
	105-001	m	75	FL	II / B
3	102-001	m	58	MCL	III / B
	105-002	w	68	FL	IV / B
	102-002	m	65	MCL	III / A
4 step	102-003	m	60	SLL	IV / B
	109-001	m	73	MCL	II / A
	105-003	m	44	FL	IV / B
	109-002	m	61	FL	IV / A
	105-004 <sup>3)</sup>	m	67	MZL	IV / B
	109-003	m	64	FL	IV / A
	102-004	m	75	MCL	III / A
4 ramp	109-004	w	65	FL	III / A
	109-005	m	60	MCL	IV / A
	109-006 <sup>4)</sup>	w	67	FL	IV / B
	109-061 <sup>4)</sup>	w	67	FL	IV / B
4 flat	109-007	m	67	DLBCL	III / B
	105-005	w	65	FL	III / A
	105-006	w	74	MW	IV / B

<sup>1)</sup> Die vorderen drei Ziffern geben das Studienzentrum an (101: Berlin; 102: Essen; 103: Göttingen; 105: Mainz; 107: Nürnberg; 108: Ulm; 109: Würzburg), die hinteren drei Ziffern stellen die individuelle Patienten-Nummer dar.

<sup>2)</sup> in Jahren zu Behandlungsbeginn

<sup>3)</sup> Dieser Patient wurde aufgrund einer bereits zu Behandlungsbeginn vorliegenden, aber nicht diagnostizierten Pneumonie von der Auswertung ausgeschlossen.

<sup>4)</sup> Es handelte sich um die gleiche Patientin (1. und 2. Behandlungszyklus).

Alle eingeschlossenen Patienten gaben zu dem von den jeweiligen lokalen Ethikkommissionen gebilligten Studienprotokoll ihr schriftliches Einverständnis, und die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki der *World Medical Association* durchgeführt.

## 2.3. FACS-Analysen

### 2.3.1. Abnahme, Lagerung und Versand von Blutproben

Zu bestimmten Zeitpunkten vor, während sowie nach der Behandlung mit MT103 wurde den Patienten mit Hilfe von EDTA Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson) Blut abgenommen. Dafür wurde standardmäßig ein 6 ml Röhrchen verwendet, für die Bestimmung der  $T_{reg}$ -Zellen ab Kohorte 4 *ramp* an dem jeweiligen Zeitpunkt zusätzlich ein 3 ml Röhrchen. Als Behandlungsbeginn wurde „Tag 1“ festgelegt, so dass mit dem jeweils nach 24 h stattfindenden Wechsel des Infusionsbeutels der jeweils nächste Behandlungstag anfang. Damit ergaben sich in den Kohorten 1, 2, 2 min und 3 folgende Blutabnahme-Zeitpunkte (sofern der Zeitpunkt nicht durch eine h-Angabe präzisiert wird, fand die Blutabnahme immer vor dem Wechsel des Infusionsbeutels statt): Vor Behandlungsbeginn, an Tag 1 +6 h, an den Tagen 2, 3, 8, 15, 22 und vor dem Infusionsende an Tag 29. Falls Patienten weitere 4 Wochen behandelt wurden, wurde zusätzlich an den Tagen 36, 43, 50 und vor dem dann relevanten Infusionsende an Tag 57 Blut abgenommen. Außerdem war am 4 Wochen nach dem Infusionsende liegenden Studienende (Tag 57 oder 85) eine weitere Blutprobe vorgesehen. Bei den Patienten in der Kohorte 4 *step* wurde aufgrund der höheren MT103-Dosis eine zusätzliche Blutprobe an Tag 2 +6 h abgenommen. Um die Einstiegs- sowie die Expansionsphase besser abzubilden, wurden in den Kohorten 4 *ramp* und 4 *flat* in diesen Bereichen deutlich mehr Blutabnahme-Zeitpunkte eingeführt: Vor Behandlungsbeginn, an Tag 1 +45 min, an Tag 1 +2 h, an Tag 1 +6 h, an Tag 1 +12 h, an Tag 2, an Tag 2 +6 h, an den Tagen 3, 8, 15, 17, 22, 24 und vor dem Infusionsende an Tag 29, bei 8-wöchiger Behandlung außerdem an den Tagen 36, 43, 50 und vor dem Infusionsende an Tag 57 sowie am Studienende an Tag 57 bzw. 85. Davon abweichend wurde die Bestimmung der  $T_{reg}$ -Zellen nur zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt: Vor Behandlungsbeginn, an den Tagen 3, 8, 15, 22 und vor dem Infusionsende an Tag 29, eventuell außerdem an den Tagen 36, 43, 50 und vor dem Infusionsende an Tag 57 sowie am Studienende an Tag 57 bzw. 85. Daneben konnte der behandelnde Arzt entscheiden, ob zu bestimmten Zeitpunkten einzelne Blutproben zusätzlich abgenommen wurden oder entfallen mussten.

Die Lagerung der Blutproben in den Studienzentren erfolgte bis zum Versand bei 4°C. Die Proben wurden in Kühlboxen bei 2 – 14°C verschickt und erreichten die Micromet AG durchschnittlich 24 h, maximal jedoch 48 h nach dem Blutabnahmezeitpunkt. Anschließend wurde unmittelbar mit der Proben-Aufarbeitung angefangen.

### **2.3.2. Blutbild-Bestimmung**

Um die Anzahl der Gesamtleukozyten sowie der Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen im peripheren Blut zu einem bestimmten Behandlungszeitpunkt zu erhalten, wurde durch ein externes Auftragslabor von jeder Probe ein Blutbild erstellt. Dazu wurde das Blut durch mehrmaliges Umschwenken des EDTA Vacutainer-Röhrchens gut gemischt. 300 µl Vollblut wurden mit 600 µl Dulbecco's PBS (Biochrom) verdünnt und anschließend an das Labor Dr. Tiller & Kollegen (München) verschickt.

### **2.3.3. Isolierung der PBMC aus den Blutproben**

Zur Aufreinigung der PBMC aus Vollblut wurde ein modifiziertes Ficoll-Protokoll verwendet<sup>56</sup>. Dazu wurde zunächst für jede Probe ein 10 ml Leukosep-Röhrchen (Greiner) mit 3,1 ml Biocoll (Dichte: 1,077 g/ml; Biochrom) befüllt und bei RT 30 sec bei 1050 g zentrifugiert, so dass sich das Biocoll unterhalb der porösen Fritte des Leukosep-Röhrchens befand. Das auf RT erwärmte Vollblut wurde mit einer mit FACS-Puffer (Dulbecco's PBS, 2% [v/v] FBS; Biochrom) benetzten Pipette aus dem EDTA Vacutainer- in das vorbereitete Leukosep-Röhrchen überführt. Das leere EDTA Vacutainer-Röhrchen wurde mit dem zum Auffüllen des Leukosep-Röhrchens benötigten Volumen Dulbecco's PBS nachgespült, und dieses ebenfalls in das Leukosep-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde das Leukosep-Röhrchen in einem Ausschwingrotor (Hettich) bei 22°C 15 min bei 1050 g zentrifugiert, wobei die Zentrifuge danach ungebremst auslaufen gelassen wurde, um eine Durchmischung des sich gebildeten Dichtegradienten (Schichtung von oben

nach unten: Blutplasma – PBMC – Biocoll – Erythrozyten / Granulozyten) zu vermeiden. Das Blutplasma wurde bis auf 1 cm oberhalb der PBMC-Schicht abgesaugt und verworfen. Die PBMC-Schicht wurde mit einer mit FACS-Puffer benetzten Pipette vollständig in ein 10 ml Spitzbodenröhrchen (Nalgene) überführt, in das bereits 5 ml FACS-Puffer vorgelegt worden waren. Das Spitzbodenröhrchen wurde mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei 4°C 4 min bei 500 g zentrifugiert (diese Bedingungen wurden auch bei allen nachfolgenden Zentrifugationsschritten verwendet). Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet je nach Größe in 2,5 – 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA; pH 7,5) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation der Zellsuspension bei RT wurde das Spitzbodenröhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, und das Zellpellet je nach Größe in 1 – 3 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer *improved*-Zählkammer und Anfärben mit Eosin-Rot (0,5% [w/v] Eosin G; Roth; 0,9% [w/v] NaCl in H<sub>2</sub>O) bestimmt.

### **2.3.4. Färbung der PBMC mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse**

Bei den von jeder Probe durchgeführten Färbungen der PBMC zur Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen handelte es sich ausschließlich um extrazelluläre 4-Farben-Färbungen von Zelloberflächenantigenen. Dagegen war zur eindeutigen Bestimmung der T<sub>reg</sub>-Zellen neben einer extrazellulären 3-Farben-Färbung auch die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 nach vorangegangener Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erforderlich.

#### **2.3.4.1. Färbungen der Lymphozyten-Subpopulationen**

Insgesamt wurden 9 Färbungen (Tab. 2.4.) durchgeführt, für die zwischen  $5 \cdot 10^5$  und  $1,5 \cdot 10^6$  PBMC pro Färbung eingesetzt wurden. Falls die Gesamtzellzahl nicht für alle Färbungen ausreichte, wurden einzelne Färbungen weggelassen (in folgender Reihenfolge: Nr. 1, 9, 5, 4, 7, 6, 10, 2, 3).

Um den *intermediate affinity state* der Bindung von LFA-1 auf T-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen bei der Färbung Nr. 10 vor der Färbung mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit dem rekombinanten Fusionsprotein ICAM-1/F<sub>c</sub> (R&D Systems) inkubiert. ICAM-1/F<sub>c</sub> besteht aus der extrazellulären Domäne von humanem ICAM-1 und dem F<sub>c</sub>-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers; nach der Bindung von ICAM-1 an LFA-1 kann der F<sub>c</sub>-Teil und damit indirekt LFA-1 im *intermediate affinity state* durch Färbung mit einem entsprechenden Antikörper detektiert werden. Dazu wurden die Zellen in die entsprechende, mit FACS-Puffer benetzte Vertiefung einer 96 Well-Spitzboden-Multititerplatte (Hartenstein) pipettiert, zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 150 µl ICAM-1-Bindungspuffer (Dulbecco's PBS, 2% [v/v] FBS, 10 mM HEPES; Biochrom; 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, bevor das Zellpellet in 100 µl ICAM-1/F<sub>c</sub>-Lösung (20 µg/ml in ICAM-1-Bindungspuffer) resuspendiert wurde. Nach 15 min Inkubation bei 4°C wurden 50 µl ICAM-1-Bindungspuffer zugegeben, die Multititerplatte zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit 150 µl ICAM-1-Bindungspuffer gewaschen, bevor sie mit der entsprechenden Antikörper-Kombination gefärbt wurden (siehe Tab. 2.4.).

Bei der Färbung Nr. 9 wurde neben 3 Antikörpern auch das fluoreszenzmarkierte Protein Annexin V eingesetzt, das mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, einen frühzeitigen Zelloberflächenmarker für Apoptose<sup>57</sup>, bindet. Da dieser Vorgang von Ca<sup>2+</sup>-Ionen abhängig ist, musste für die Färbung ein spezieller Puffer verwendet werden. Dazu wurden die Zellen vorab in die entsprechende, mit FACS-Puffer benetzte Vertiefung einer 96 Well-Spitzboden-Multititerplatte pipettiert, zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 150 µl Annexin V-Bindungspuffer (10 mM HEPES/NaOH [pH 7,4], 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen, bevor sie mit der entsprechenden Antikörper-Kombination gefärbt wurden (siehe Tab. 2.4.).

Bei den anderen 7 Färbungen wurden die Zellen in die entsprechenden, mit FACS-Puffer benetzten Vertiefungen einer 96 Well-Spitzboden-Multititerplatte pipettiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor sie direkt mit den entsprechenden Antikörper-Kombinationen gefärbt wurden (siehe Tab. 2.4.).

Die jeweiligen Spezifitäten, konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, Klone, Isotypen und Hersteller der für die 9 Färbungen verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 2.3. zusammengefasst.

**Tab. 2.3. Für die Färbungen der Lymphozyten-Subpopulationen verwendete Antikörper.**

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Isotyp	Hersteller
Annexin V	PE	-	-	Becton Dickinson
CCR7	PE	3D12	Ratte IgG2a	Becton Dickinson
CCR8	APC	191704	Ratte IgG2b	R&D Systems
CD3	PerCP	SK7	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD3	APC	SK7	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD4	PerCP	SK3	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD5	FITC	UCHT2	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD8	PE	SK1	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD8	PerCP	SK1	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD13	FITC	TÜK1	Maus IgG1	Caltag
CD14	FITC	TÜK4	Maus IgG2a	Caltag
CD19	APC	HD37	Maus IgG1	DAKO
CD20	PerCP	L27	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD25	APC	2A3	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD28	APC	CD28.2	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD45RA	FITC	HI100	Maus IgG2b	Becton Dickinson
CD56	PE	B159	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD69	PE	FN50	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD154	APC	TRAP1	Maus IgG1	Becton Dickinson
$\gamma\delta$ TCR	FITC	5A6.E9	Maus IgG1	Caltag
HLA-DR	FITC	G46-6	Maus IgG2a	Becton Dickinson
humaner IgG1 F <sub>c</sub> -Teil	FITC	polyklonal	Ziege IgG F(ab') <sub>2</sub> - Fragmente	Dianova

Für die 9 Färbungen wurden diese Antikörper in folgenden Kombinationen und Verdünnungen bzw. Volumina eingesetzt (Tab. 2.4.):

**Tab. 2.4. 4-Farben-Färbungen der Lymphozyten-Subpopulationen** (alle Angaben beziehen sich auf die Färbung der PBMC einer Probe).

Nr.	FITC	$\mu$ l	PE	$\mu$ l	PerCP	$\mu$ l	APC	$\mu$ l	FACS-Puffer ( $\mu$ l)
1	CD5	10	CD69	10	CD20	10	CD19	10	60
2	$\gamma\delta$ TCR	5	CD8	10	CD4	10	CD3	2,5	73

Nr.	FITC	µl	PE	µl	PerCP	µl	APC	µl	FACS-Puffer (µl)
3	CD13/CD14	5/5	CD56	10	CD3	10	CD19	10	60
4	HLA-DR	10	CD69	10	CD8	10	CD25	2,5	68
5	HLA-DR	10	CD69	10	CD4	10	CD25	2,5	68
6	CD45RA	10	CCR7	10	CD8	10	CD28	10	60
7	CD45RA	10	CCR7	10	CD4	10	CCR8	20	50
9	CD45RA	10	Annexin V	2,5	CD20	10	CD28	10	68 <sup>1)</sup>
10	humaner IgG1 F <sub>c</sub> -Teil	3	CD8	10	CD4	10	CD154	10	67 <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Annexin V-Bindungspuffer

<sup>2)</sup> ICAM-1-Bindungspuffer

Für die eigentliche Färbung wurden die Zellpellets in je 100 µl der entsprechenden Antikörper-Kombination resuspendiert. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit bei 4°C wurden je 50 µl des entsprechenden Puffers zugegeben, die Multititerplatte zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden je einmal mit 150 µl des entsprechenden Puffers gewaschen, bevor sie je nach ursprünglich eingesetzter Zellzahl in je 200 – 300 µl des entsprechenden Puffers aufgenommen und in 1 ml Polypropylen-Röhrchen (Micronic) überführt wurden. Bis zur eigentlichen Messung am FACS-Gerät wurden die Zellsuspensionen bei 4°C gelagert.

#### 2.3.4.2. Färbung der regulatorischen T-Zellen

Zur eindeutigen Bestimmung der T<sub>reg</sub>-Zellen wurde der *Human Regulatory T Cell Staining Kit* (eBioscience) in Kombination mit einem zusätzlichen anti-CD3 Antikörper verwendet. Die Durchführung erfolgte nach einem geringfügig modifizierten Protokoll des Herstellers. Im einzelnen wurden dazu zwischen  $2 \cdot 10^6$  und  $3 \cdot 10^6$  PBMC in ein 2 ml Schnappdeckel-Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor die Zellen mit der Antikörper-Kombination für die extrazelluläre Färbung gefärbt wurden (siehe Tab. 2.6.).

Die Spezifitäten, konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, Klone, Isotypen und Hersteller der für die Färbung der T<sub>reg</sub>-Zellen verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 2.5. zusammengefasst.

**Tab. 2.5. Für die Färbung der T<sub>reg</sub>-Zellen verwendete Antikörper.**

Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	PerCP	SK7	Maus IgG1	Becton Dickinson
CD4	FITC	RPA-T4	Maus IgG1	eBioscience
CD25	APC	BC96	Maus IgG1	eBioscience
Foxp3	PE	PCH101	Ratte IgG2a	eBioscience

Für die Färbung wurden diese Antikörper in folgenden Verdünnungen bzw. Volumina eingesetzt (Tab. 2.6.):

**Tab. 2.6. 4-Farben-Färbung der T<sub>reg</sub>-Zellen** (alle Angaben beziehen sich auf die Färbung der PBMC einer Probe).

Nr.	FITC	µl	PE	µl	PerCP	µl	APC	µl	FACS-Puffer (µl)
13	CD4/CD25 <sup>1)</sup>	20	Foxp3 <sup>2)</sup>	20	CD3	10	CD4/CD25 <sup>1)</sup>	-	120 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Die Antikörper-Kombination CD4/CD25 war bereits als gebrauchsfertiges Gemisch im *Human Regulatory T Cell Staining Kit* enthalten.

<sup>2)</sup> Der Foxp3-Antikörper wurde nicht zu der Antikörper-Mischung für die extrazelluläre Färbung (CD3/CD4/CD25) pipettiert, sondern erst bei der nachfolgenden intrazellulären Färbung eingesetzt.

<sup>3)</sup> Es wurde der im *Human Regulatory T Cell Staining Kit* enthaltene FACS-Puffer verwendet.

Für die extrazelluläre Färbung wurde das Zellpellet in 150 µl der entsprechenden Antikörper-Kombination (CD3/CD4/CD25) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit bei 4°C wurden 1,5 ml FACS-Puffer (eBioscience) zugegeben, das Reaktionsgefäß zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden durch Resuspendieren in 1 ml frisch angesetztem *Fixation/Permeabilization*-Puffer (eBioscience) und 30 min Inkubation in Dunkelheit bei 4°C fixiert und gleichzeitig für die nachfolgende intrazelluläre Färbung permeabilisiert. Anschließend wurde 0,7 ml *Permeabilization*-Puffer (eBioscience) zugegeben, das Reaktionsgefäß zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 1,7 ml *Permeabilization*-Puffer gewaschen. Um die unspezifische Bindung des aus der Ratte stammenden Foxp3-Antikörpers bei der nachfolgenden intrazellulären Färbung zu verhindern, wurde das Zellpellet in 100 µl *Permeabilization*-Puffer / 2% [v/v] Rattenserum (eBioscience) resuspendiert und 15 min in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden direkt 20 µl Foxp3-Antikörper zugegeben, und die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach weiteren 30 min In-

kubation in Dunkelheit bei 4°C wurden 1,7 ml *Permeabilization*-Puffer zugegeben, das Reaktionsgefäß zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 1,7 ml *Permeabilization*-Puffer gewaschen, bevor sie je nach ursprünglich eingesetzter Zellzahl in 300 – 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und in 1 ml Polypropylen-Röhrchen überführt wurden. Bis zur eigentlichen Messung am FACS-Gerät wurde die Zellsuspension bei 4°C gelagert.

### **2.3.5. Durchflusszytometrische Aufnahme der gefärbten PBMC**

Für die Messung der einzelnen Färbungen wurde ein FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson) verwendet, das für die Detektion von 4 Fluoreszenzfarbstoffen mit 2 Lasern (488 und 633 nm Anregungswellenlänge) ausgestattet war. Durch Verwendung von entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörpern wurden vorab für jede Färbung optimierte *Instrument Settings* etabliert, bei der eigentlichen Messung wurde jedoch aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden PBMC-Zahl pro Blutprobe auf den Einsatz der Isotyp-Kontrollantikörper verzichtet. Die Aufnahme erfolgte vollautomatisch mit Hilfe einer mit dem Programm CellQuest Pro (Becton Dickinson) erstellten speziellen Aufnahmemaske, die für jede Färbung definierte Aufnahme-*Gates* enthielt. Damit wurden bei jeder Färbung nach Möglichkeit  $1 \cdot 10^4$  –  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen einer bestimmten Lymphozyten-Subpopulation aufgenommen, um eine aussagekräftige statistische Auswertung durchführen zu können.

### **2.3.6. Analyse der FACS-Rohdaten**

Die am FACSCalibur-Gerät aufgenommenen Rohdaten wurden mit dem Programm CellQuest Pro ausgewertet. Dabei wurde für jede Färbung eine standardisierte Auswertungsvorlage verwendet, mit deren Hilfe einzelne Lymphozyten-Subpopulationen anhand bestimmter Kombinationen von Zelloberflächenantigenen erfasst wurden (Tab. 2.7.):

**Tab. 2.7. Bei der Auswertung erfasste Lymphozyten-Subpopulationen und korrespondierende Kombinationen von Zelloberflächenantigenen.**

Nr.	Lymphozyten-Subpopulation	Kombination von Zelloberflächenantigenen
1	CD5 <sup>-</sup> B-Zellen	CD19 <sup>+</sup> /CD20 <sup>+</sup> /CD5 <sup>-</sup>
	CD5 <sup>+</sup> B-Zellen	CD19 <sup>+</sup> /CD20 <sup>+</sup> /CD5 <sup>+</sup>
2	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
	γ/δ T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> / γ/δ TCR <sup>+</sup>
3	T-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD13 <sup>-</sup> /CD14 <sup>-</sup>
	NKT-Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> /CD13 <sup>-</sup> /CD14 <sup>-</sup>
	NK-Zellen	CD56 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD13 <sup>-</sup> /CD14 <sup>-</sup>
	B-Zellen	CD19 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> /CD13 <sup>-</sup> /CD14 <sup>-</sup>
4	CD69 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>
	CD25 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>
	HLA-DR <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>
5	CD69 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>
	CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>
	HLA-DR <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>
6	CD8 <sup>+</sup> naive T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>
	CD8 <sup>+</sup> T <sub>CM</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>+</sup>
	CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>-</sup>
	CD8 <sup>+</sup> T <sub>EMRA</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>+</sup> /CD28 <sup>-</sup>
7	CD4 <sup>+</sup> naive T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>+</sup> /CCR7 <sup>+</sup>
	CD4 <sup>+</sup> T <sub>CM</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>+</sup>
	CD4 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>-</sup>
	CD4 <sup>+</sup> T <sub>H2</sub> -Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CCR8 <sup>+</sup>
9	Apoptotische naive T-Zellen	CD45RA <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> /Annexin V
	Apoptotische B-Zellen	CD20 <sup>+</sup> /Annexin V
10	LFA-1 <sup>i+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /LFA-1 <sup>i</sup> /ICAM-1 <sup>+</sup>
	CD154 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> /CD154 <sup>+</sup>
	LFA-1 <sup>i+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /LFA-1 <sup>i</sup> /ICAM-1 <sup>+</sup>
	CD154 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> /CD154 <sup>+</sup>
13	CD4 <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> -Zellen	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /Foxp3 <sup>+</sup>

i: *intermediate affinity state*

Die Auswertung lieferte den prozentualen Anteil jeder Lymphozyten-Subpopulation an allen aufgenommenen Ereignissen bzw. an der entsprechenden übergeordneten Subpopulation. Die Apoptose der B- und naiven T-Zellen wurde mit Hilfe der MFI der Annexin V-Färbung dieser Zellen bestimmt.

Diese Daten sowie die Blutbilder wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Blutabnahme-Zeitpunkte durch die Firma Metronomia (München) in die validierte klinische Datenbank Clintrial 4.5 (Phase Forward) eingegeben und bildeten die Grundlage für die weiteren Berechnungen.

### 2.3.7. Berechnungen und Endauswertung

Alle Berechnungen wurden mit den Programmen Excel (Microsoft) oder SigmaPlot (Systat) durchgeführt. Da neben den relativen Werten die absoluten Zellzahlen einzelner Lymphozyten-Subpopulationen eine große Rolle für die Beurteilung der Ergebnisse spielten, wurden diese aus den in der Analyse der FACS-Rohdaten ermittelten prozentualen Anteilen berechnet. Dazu wurde die absolute Lymphozyten-Zahl  $N(\text{Lymphozyten})$  mit der Summe der prozentualen Anteile der T-, B- und NK-Zellen (%T-Zellen, etc.) korreliert, da sich die Lymphozyten überwiegend aus diesen drei Subpopulationen zusammensetzen. Die Berechnung der absoluten T-Zellzahl  $N(\text{T-Zellen})$  erfolgte dann zum Beispiel nach folgender Formel:

$$N(\text{T-Zellen}) = \frac{\%T\text{-Zellen}}{\%T\text{-Zellen} + \%B\text{-Zellen} + \%NK\text{-Zellen}} \cdot N(\text{Lymphozyten})$$

Die absoluten Zellzahlen der anderen Lymphozyten-, der B- und T-Zell- sowie der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell-Subpopulationen ließen sich analog berechnen. Das Verhältnis der absoluten Zellzahl einer Subpopulation zur entsprechenden übergeordneten Zellpopulation (z.B.  $CD8^+$   $T_{EM}$ -Zellen zu  $CD8^+$  T-Zellen) lieferte dann auch die relative Zellzahl der jeweiligen Subpopulation.

In der Endauswertung wurden die Leukozyten- und Lymphozyten-, die B- und T-Zell- sowie die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell-Subpopulationen jeweils in absoluten Zellzahlen angegeben, die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zell-Aktivierung sowie -Adhäsion dagegen jeweils in Prozentwerten der entsprechenden übergeordneten Zellpopulation. Für die Apoptose der B- und naiven T-Zellen wurden die MFI-Werte der Annexin V-Färbung dieser Zellen ohne weitere Berechnungen direkt aus der Datenbank übernommen.

Durch Kombination dieser Werte mit den Blutabnahme-Zeitpunkten konnte der Verlauf jeder Leukozyten- und Lymphozyten-Subpopulation über den Behandlungszeitraum hinweg dargestellt werden.

## 2.4. Quantifizierung von MT103 in humanem Serum

Die MT103-Konzentration in Serumproben der Patienten wurde mit einem validierten pharmakokinetischen Bioassay ermittelt. Dabei handelte es sich primär um einen zellbasierten, MT103-vermittelten Zytotoxizitätstest, bei dem nachfolgend die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche der als Effektorzellen verwendeten T-Zellen bestimmt wurde. Da die Aktivierung der T-Zellen und damit auch die CD69-Expression mit der in den Assay eingesetzten MT103-Konzentration korrelierte, konnten mit Hilfe einer Standardkurve die MT103-Konzentrationen in den Serumproben berechnet werden.

Die Serumproben wurden analog zu den Blutproben für die FACS-Analysen abgenommen, in den Studienzentren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert und gesammelt auf Trockeneis verschickt. Für den Zytotoxizitätstest wurden  $2,5 \cdot 10^5$  HPBALL T-Zellen (DSMZ ACC-483) in einer 96 Well-Rundboden-Multititerplatte (Hartenstein) mit  $2,5 \cdot 10^4$  Raji B-Zellen (ATCC CCL-86) gemischt. Zu den einzelnen Ansätzen wurden entweder kein MT103 (Leerwert), serielle Verdünnungen einer definierten MT103-Ausgangskonzentration (Standardkurve) oder die in gepooltem humanem Serum entsprechend vorverdünnten Serumproben der Patienten zugegeben. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach 14 – 18 h Inkubation im Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) wurden die Zellen gewaschen und anschließend 30 min in Dunkelheit bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem anti-CD69 Antikörper (Becton Dickinson) gefärbt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und mit einem FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson) aufgenommen. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte durch Bestimmen der mittleren CD69-Fluoreszenzintensität (*Mean Values*) der T-Zellen. Nach Abziehen des Leerwerts konnte für die gemessenen Werte der Standardkurve eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve mit nicht-linearer Regression erstellt werden. Über den Bereich der konstanten Steigung dieser Kurve ließen sich die

unbekannten MT103-Konzentrationen in den Serumproben der Patienten interpolieren.

## 2.5. Quantifizierung von Zytokinen in humanem Serum

Die Messung der Zytokin-Konzentrationen wurde aus den für die Bestimmung der MT103-Konzentrationen abgenommenen Serumproben durchgeführt. Dabei wurden je nach Zytokin zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt.

### 2.5.1. Zytokin-Bestimmung durch CBA

Die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  wurden mit Hilfe des *Human  $T_H1/T_H2$  Cytokine CBA-II* Kits (Becton Dickinson) ermittelt. Dieser enthielt sechs *Bead*-Populationen, die durch ihre unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten getrennt voneinander ausgewertet werden konnten und durch spezifische Antikörper auf ihren Oberflächen jeweils ein bestimmtes Zytokin erkannten. Die Quantifizierung der an die *Beads* gebundenen Zytokine erfolgte durch sechs weitere fluoreszenzmarkierte Antikörper, deren Signalstärke mit der Serumkonzentration des jeweiligen Zytokins korrelierte.

Die Durchführung des Assays richtete sich nach dem Handbuch des Kits, wobei serumbedingt die Zytokin-Standardkurven und die Serumproben der Patienten in gepooltem humanem Serum verdünnt wurden. Dementsprechend wurde auch der im Kit enthaltene *Serum Enhancement Buffer* verwendet, um unspezifische Bindungsstellen für Serumproteine auf den *Beads* zu blockieren. Die vorbehandelten *Beads* wurden entweder mit gepooltem humanem Serum (Leerwert), seriellen Verdünnungen definierter Zytokin-Ausgangskonzentrationen (Standardkurven) oder den entsprechend vorverdünnten Serumproben gemischt. Nach Zugabe des Detektionsreagenz wurden die in Triplikaten durchgeführten Ansätze 3 h bei RT in Dunkelheit inkubiert, bevor die *Beads* gewaschen und mit einem FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson) aufgenommen wurden. Die Auswertung der FACS-

Daten erfolgte mit Hilfe der CBA Software (Becton Dickinson). Nach Abziehen des entsprechenden Leerwerts konnten für die gemessenen Werte der Standardkurven bei halb-logarithmischer Auftragung jeweils Dosis-Wirkungskurven mit linearer Regression erstellt werden, über die sich die Zytokin-Konzentrationen in den Serumproben der Patienten berechnen ließen.

### **2.5.2. Zytokin-Bestimmung durch ELISA**

Die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-8 und IL-12 (p70) wurden mit Hilfe des *Human IL-8 bzw. IL-12 ELISA Kits* (Diaclone) ermittelt. Dabei handelte es sich um *Sandwich-ELISA*, bei denen das jeweilige, durch einen spezifischen Antikörper immobilisierte Zytokin mit einem zweiten, biotinylierten Antikörper nachgewiesen wurde. Nach Bindung des Streptavidin-gekoppelten Enzyms HRP setzte dieses das farblose Substrat TMB zu einem Farbstoff um, der quantifiziert werden konnte und mit der Serumkonzentration des jeweiligen Zytokins korrelierte.

Die Durchführung der ELISA erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei serumbedingt die Zytokin-Standardkurven und die Serumproben der Patienten in gepooltem humanem Serum verdünnt wurden. In mit den entsprechenden Antikörpern beschichtete Flachboden-Multititerplatten wurden entweder gepooltes humanes Serum (Leerwert), serielle Verdünnungen definierter Zytokin-Ausgangskonzentrationen (Standardkurven) oder die entsprechend vorverdünnten Serumproben der Patienten pipettiert. Nach Zugabe des jeweiligen Detektionsantikörpers wurden die in Triplikaten durchgeführten Ansätze 1 h (IL-8) bzw. 3 h (IL-12) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Ansätze 30 min bei RT mit Streptavidin-gekoppelter HRP inkubiert, bevor die Multititerplatten erneut dreimal gewaschen wurden. Abschließend wurde das Substrat TMB zugegeben, die Farb-reaktion nach 12 – 15 min Inkubation bei RT abgestoppt und mit einem ELISA-Reader (BIO-TEK Instruments) gemessen. Nach Abziehen des entsprechenden Leerwerts konnten für die gemessenen Werte der Standardkurven jeweils Dosis-Wirkungsbeziehungen mit linearer Regression erstellt werden, über die sich die Zytokin-Konzentrationen in den Serumproben der Patienten berechnen ließen.

## 2.6. Bestimmung des zytotoxischen Potentials der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen

### 2.6.1. Isolierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen aus Vollblut

Zur Aufreinigung der PBMC aus Vollblut von gesunden Spendern wurde ein modifiziertes Ficoll-Protokoll verwendet (siehe 2.3.3.). Anschließend wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hilfe des *Dynal CD8 Negative Isolation Kits* (Invitrogen) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach einem geringfügig modifizierten Protokoll des Herstellers. Im einzelnen wurden dazu  $3 \cdot 10^8$  PBMC in 2,5 ml FACS-Puffer resuspendiert und mit 250  $\mu$ l des mitgelieferten Antikörper-Mix gemischt. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 25 ml FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 2,5 ml der mitgelieferten *Depletion Dynabeads* zugegeben, die zuvor zweimal mit FACS-Puffer gewaschen worden waren. Der Ansatz wurde 15 min bei RT und 15 min auf Eis geschüttelt und danach 5 min bei 4°C in den Dynal Magnet gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, und die darin enthaltenen Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Reinheit der so isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen betrug 91%.

Zur weiteren Aufreinigung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen wurden je  $4 \cdot 10^7$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen in je 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert, mit den in der Tabelle 2.8. angegebenen Antikörpern gemischt und 30 min bei 4°C inkubiert.

**Tab. 2.8. Für die Isolierung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen verwendete Antikörper**

CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation	Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller	$\mu$ l
Naive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD45RO	UCHL1	Maus IgG2a	Becton Dickinson	10
	CD11b	ICRF44	Maus IgG1	Becton Dickinson	10
CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD45RA	HI100	Maus IgG2b	Becton Dickinson	10
	CCR7	3D12	Ratte IgG2a	Becton Dickinson	5
CD8 <sup>+</sup> T <sub>EMRA</sub> <sup>-</sup> -Zellen	CD45RO	UCHL1	Maus IgG2a	Becton Dickinson	5
	CD28	CD28.2	Maus IgG1	Becton Dickinson	10

Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 3 ml FACS-Puffer aufgenommen. Je nach Isotyp der für die Depletion eingesetzten Antikörper wur-

den 300  $\mu$ l *Sheep anti-Mouse IgG Dynabeads* und/oder 300  $\mu$ l *Sheep anti-Rat IgG Dynabeads* zugegeben, die zuvor zweimal mit FACS-Puffer gewaschen worden waren. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis geschüttelt und danach 5 min bei 4°C in den Dynal Magnet gestellt. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig abgenommen, und die darin enthaltenen Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Reinheit der so isolierten naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen und der CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub>-Zellen betrug 98%, 95% bzw. 93%.

### 2.6.2. Radioaktive Markierung der Targetzellen

1\*10<sup>6</sup> Kato III-Zellen (ATCC HTB-103) wurden in 100  $\mu$ l Medium (RPMI 1640, 10% [v/v] FBS; Biochrom) resuspendiert und mit 50  $\mu$ l <sup>51</sup>Cr (1 mCi/ml; GE Healthcare) gemischt. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Medium gewaschen und in 1 ml Medium aufgenommen.

### 2.6.3. Zytotoxizitätstest

In einer 96 Well-Spitzboden-Multititerplatte (Hartenstein) wurden in 100  $\mu$ l Medium jeweils 1\*10<sup>4</sup> aufgereinigte Effektorzellen mit 1\*10<sup>3</sup> radioaktiv-markierten Targetzellen gemischt. Zu den einzelnen Ansätzen wurden entweder 100  $\mu$ l Medium (unspezifische Lyse), 100  $\mu$ l einer seriellen Verdünnung des EpCAM-spezifischen BiTE-Moleküls MT110 oder 100  $\mu$ l Saponin-Lösung (2% [v/v] Saponin in Medium; Becton Dickinson; [maximale Lyse]) zugegeben. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen abzentrifugiert, und die Menge des freigesetzten <sup>51</sup>Cr in 100  $\mu$ l Überstand mit einem Wizard B' 1480 Automatic Gamma Counter (Wallac) bestimmt. Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurden die um die unspezifische Lyse reduzierten Werte der BiTE-vermittelten Lyse ins Verhältnis zur maximalen Lyse gesetzt. Daraus konnten bei halb-logarithmischer Auftragung sigmoidale Dosis-Wirkungskurven erstellt werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Klinische Ergebnisse der Studie MT103-104

Primäres Studienziel war die Beurteilung der Sicherheit und Tolerierbarkeit von MT103 bei steigender Dosierung sowie die Identifizierung der MTD. Generell war MT103 gut verträglich. Die beobachteten Nebenwirkungen umfassten u.a. Leukopenie (65%), Lymphopenie (65%), Fieber (61%), Koagulationsstörungen (48%), Anämie (39%), Neutropenie (36%), Thrombopenie (36%), Kopfschmerzen (32%) und periphere Ödeme (32%). Diese Symptome waren leicht bis mittel schwer ausgeprägt, traten in den meisten Fällen zu Behandlungsbeginn auf und normalisierten sich während oder nach der MT103-Therapie. Sie konnten teilweise durch den Einsatz des Glucocorticoids Methylprednisolon reduziert werden. Lediglich bei 2 von 25 im Rahmen dieser Arbeit behandelten Patienten kam es zu schwereren Nebenwirkungen bzw. zu einer DLT. Bei Patient 102-003 führte der transiente, starke Anstieg der Leberenzyme (Grad 3) zu einer Therapieunterbrechung nach 14-tägiger MT103-Infusion. Nach einer 2-wöchigen Pause wurde der Patient erneut behandelt, allerdings nur weitere 3 Tage, da die Nebenwirkungen wieder auftraten. Eine durchgeführte Biopsie deutete darauf hin, dass sie auf die starke Leberinfiltration mit Lymphomzellen zurückzuführen waren, deren therapiebedingte Zerstörung indirekt zum starken Anstieg der Leberenzyme führte. Insofern waren diese Symptome mit klinischer Wirksamkeit verbunden und wurden daher nicht als DLT eingestuft. Bei Patient 102-004 zeigten sich zu Behandlungsbeginn schwerere Nebenwirkungen in Form transienter und voll reversibler Schwindel- und Verwirrungszustände (Grad 4), die letztlich zum Abbruch der MT103-Therapie führten. Die Ursache für diese Symptome lag wahrscheinlich in dem spezifischen Dosierungsschema „step“ dieser Kohorte für den Einstieg in die Behandlung und wird in Kapitel 3.5.1. ausführlich dargestellt. Aufgrund dieser DLT musste die Kohorte 4 *step* gemäß dem Studienprotokoll auf 6 auswertbare Patienten ausgeweitet werden. Trotz der aufgetretenen Nebenwirkungen stellte die Dosis 15 µg/ (m<sup>2</sup>\*24 h) keine MTD dar, so dass die Dosiseskulation fortgeführt werden konnte.

Sekundäres Studienziel war die Beurteilung der klinischen Wirksamkeit von MT103. Dazu wurde die durch die Behandlung erzielte Reduzierung des Volumens der befallenen Lymphknoten herangezogen. Dabei stellte eine Abnahme zwischen  $-25\%$  und  $-50\%$  eine *Minor Response* (MR) dar, zwischen  $-50\%$  und  $-80\%$  eine *Partial Response* (PR) und  $> -80\%$  eine *Complete Response* (CR). Größenschwankungen im Bereich von  $-25\%$  bis  $+50\%$  wurden als *Stable Disease* (SD) eingestuft, Volumen-Zunahmen  $> +50\%$  als *Progressive Disease* (PD). Neben den Lymphknoten wurde auch die Beseitigung der malignen B-Zellen im Knochenmark bewertet, da für die Diagnose einer CR neben der Abnahme der zuvor befallenen Lymphknoten auf die Größe eines normalen Lymphknotens (d.h. mindestens  $80\%$  Reduzierung bzw. Durchmesser  $< 1$  cm) auch die Lymphomfreiheit des Knochenmarks erforderlich war. Daher lieferte die Knochenmarksdiagnostik einen weiteren wichtigen Hinweis auf die klinische Aktivität von MT103 insbesondere beim Krankheitsbild des MCL.

Die folgende Tabelle 3.1. gibt einen Überblick über die Behandlungsdauer der zum Zeitpunkt dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten und die klinische Wirksamkeit der MT103-Therapie.

**Tab. 3.1. Diagnose, Behandlungsdauer und klinisches Ergebnis der zum Zeitpunkt dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten (siehe auch Tab. 2.2.).**

Kohorte	Patient	Diagnose	Behandlungsdauer <sup>1)</sup>	Klinisches Ergebnis		
				Lymphknoten <sup>2)</sup>	Knochenmark <sup>3)</sup>	Gesamt
1	101-001	IC	28	-7%	nein	SD
	101-002	MCL	28	+61%	n.b.	PD
	101-003	CLL	56	-36%	n.b.	MR
2	101-004	MCL	56	+37%	n.i.	SD
	101-005	MCL	28	+13%	n.b.	SD
	103-001	MCL	23	+96%	n.i.	PD
2 min	107-001	CLL	28	+7%	n.b.	SD
	108-001	MCL	25	+1%	n.i.	SD
	105-001	FL	28	+4%	n.i.	SD
3	102-001	MCL	30	+63%	n.i.	PD
	105-002	FL	28	+/-0%	n.b.	SD
	102-002	MCL	30	+8%	n.i.	SD
4 step	102-003	SLL	14 + 3	-57%	vollständig	<b>PR</b>
	109-001	MCL	28	-2%	n.i.	SD

Kohorte	Patient	Diagnose	Behandlungsdauer <sup>1)</sup>	Klinisches Ergebnis		
				Lymphknoten <sup>2)</sup>	Knochenmark <sup>3)</sup>	Gesamt
4 step	105-003	FL	56	-78%	teilweise	<b>PR</b>
	109-002	FL	56	-81%	vollständig	<b>CR</b>
	105-004	MZL	3	n.a.	n.i.	(PD)
	109-003	FL	31	+66%	n.i.	PD
	102-004	MCL	1,5	n.a.	n.i.	(SD)
4 ramp	109-004	FL	51	+8%	n.i.	SD
	109-005	MCL	53	+22%	nein	SD
	109-006	FL	58	-28%	vollständig	MR
	109-061	FL	29	-33%	vollständig	(MR)
4 flat	109-007	DLBCL	4	n.a.	n.i.	(PD)
	105-005	FL	39	-24%	n.b.	SD
	105-006	MW	56	-9%	teilweise	SD

1) Behandlungsdauer in Tagen

2) Veränderung der Lymphknotengröße gegenüber dem Ausgangswert vor der MT103-Therapie

3) Beseitigung des Knochenmarksbefalls nach der MT103-Therapie

n.a.: nicht auswertbar (da Behandlungsdauer < 7 Tage)

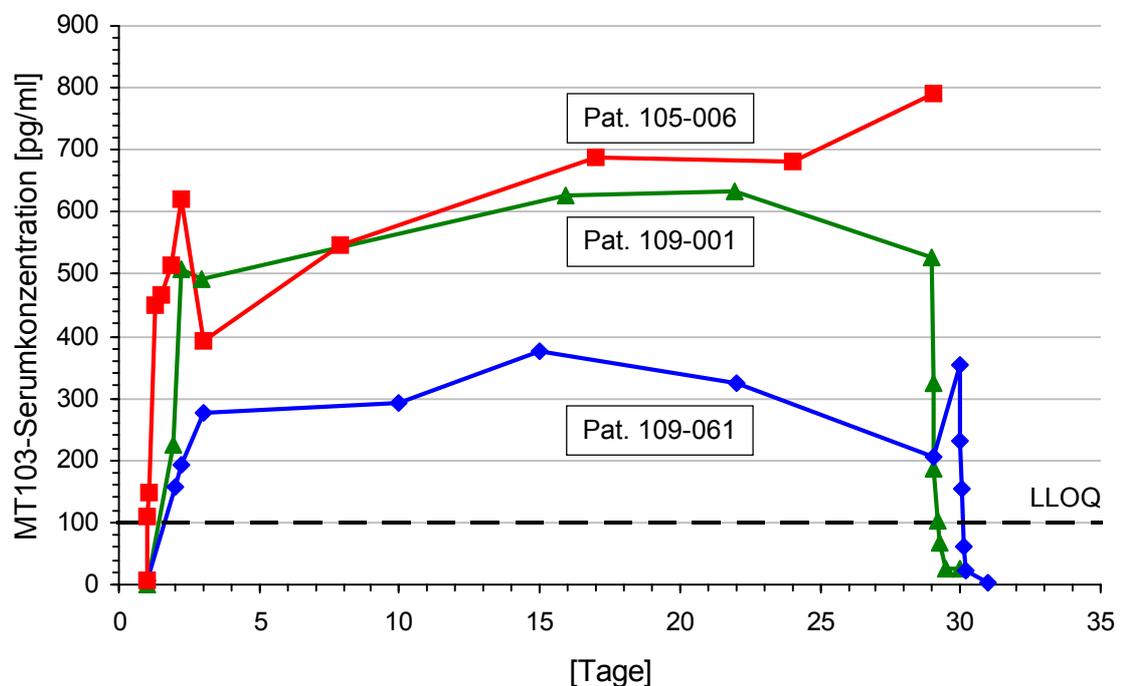
n.b.: nicht bestimmt (infiltriert, aber keine 2. Knochenmarksbiopsie nach der MT103-Therapie durchgeführt)

n.i.: nicht infiltriert (kein Knochenmarksbefall vor der MT103-Therapie)

Mehr als 80% der auswertbaren 22 Patienten erzielten eine SD oder besser, gegenüber 18% mit einer PD. Entsprechend den standardisierten Cheson-Kriterien<sup>55</sup> erreichten je 9% eine MR bzw. PR, 5% sogar eine CR. Ein erster Hinweis auf die klinische Aktivität von MT103 zeigte sich zwar bereits auf der ersten Dosisstufe; konsistent zu beobachten war die klinische Wirksamkeit von MT103 aber erst ab der vierten Dosisstufe (15 µg/(m<sup>2</sup>\*24 h)). Zudem konnte bei den Patienten auf dieser Dosisstufe erstmals eine vollständige Beseitigung des Knochenmarksbefalls (soweit vorhanden) festgestellt werden.

## 3.2. Pharmakokinetik

MT103 wurde als intravenöse Dauerinfusion (*continuous infusion*) verabreicht. Aufgrund der kurzen *in vivo* Halbwertszeit von MT103 (ca. 2 h) war zu erwarten, dass sich nach einer bestimmten Zeit ein Gleichgewicht zwischen infundiertem und über die Nieren ausgeschiedenem MT103 ausbilden würde. In diesem sogenannten *steady state* sollte dann eine konstante MT103-Serumkonzentration vorliegen. Der Zeitpunkt  $t_{ss}$ , an dem der *steady state* erreicht wurde, war abhängig vom gewählten Dosierungsschema beim Einstieg in die MT103-Therapie. In den Kohorten 1 bis 3 sowie 4 *flat*, in denen unmittelbar mit der jeweiligen Enddosis bzw. -flussrate begonnen wurde, war  $t_{ss}$  16 h nach Behandlungsbeginn erreicht. Im Gegensatz dazu wurde in der Kohorte 4 *step* zweimal ein *steady state* erreicht, nämlich einmal nach 16 h für die während der ersten 24 h verabreichte niedrige Einstiegsflussrate  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  und anschließend 40 h nach Behandlungsbeginn für die eigentliche Behandlungsflussrate  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$ , d.h. 16 h nach der Dosiserhöhung. In der Kohorte 4 *ramp*, in der die MT103-Flussrate während der ers-

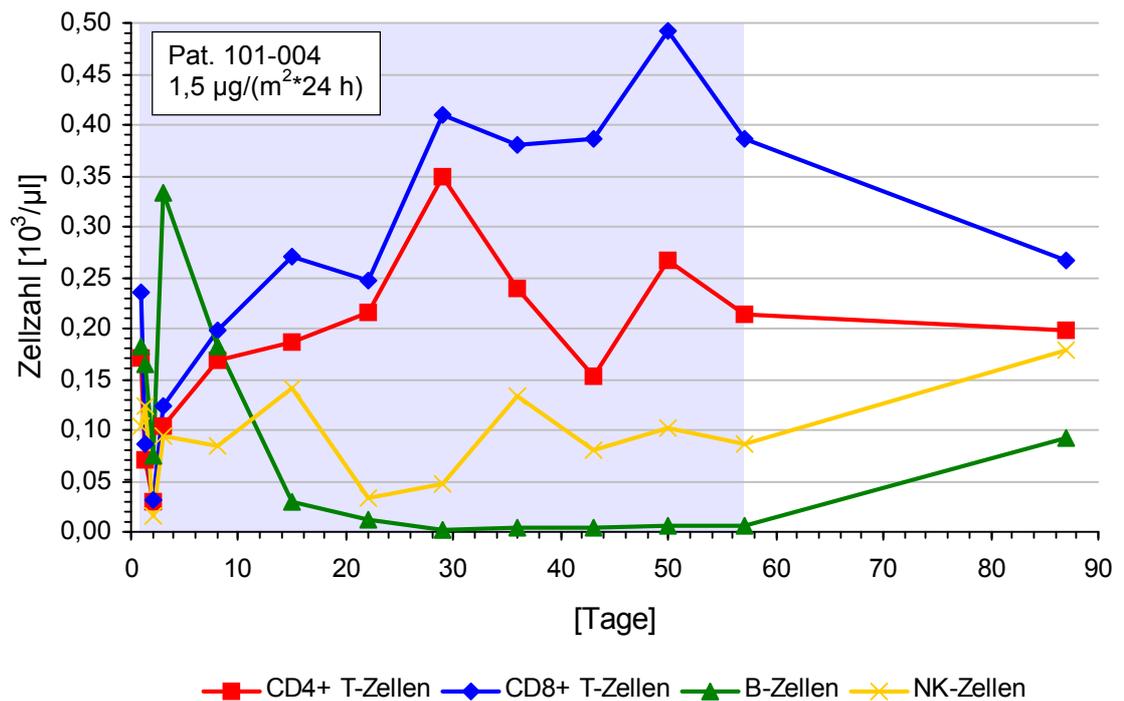
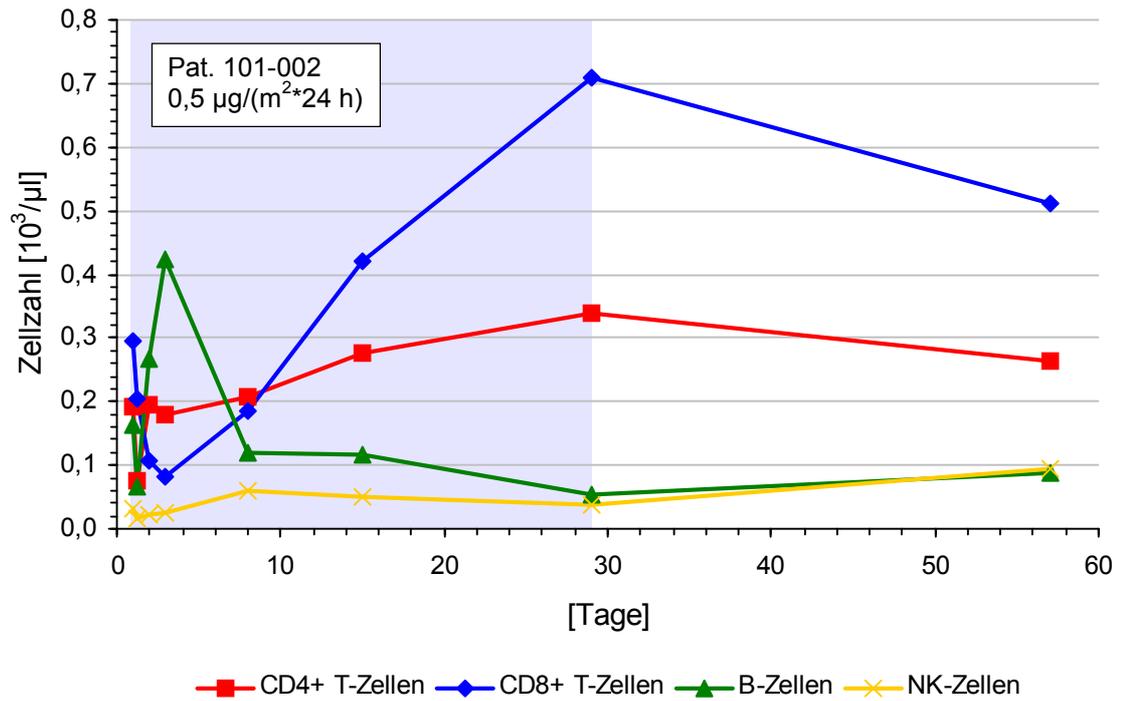


**Abb. 3.1. Pharmakokinetische Profile von 3 Patienten auf der Dosisstufe 4 ( $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$ ).** Gezeigt ist je ein repräsentativer Patient für die beim Einstieg in die MT103-Therapie verwendeten unterschiedlichen Dosierungsschemata *step* (Pat. 109-001), *ramp* (Pat. 109-061) und *flat* (Pat. 105-006).

ten 24 h linear auf die Enddosis gesteigert wurde, war  $t_{ss}$  nach 36 h erreicht. Die jeweiligen *steady state*-Werte wurden durch Extrapolation der gemessenen pharmakokinetischen Profile der Patienten ermittelt (Abb. 3.1.). Nach Erreichen des jeweiligen *steady state* blieb die MT103-Serumkonzentration über den gesamten weiteren Behandlungszeitraum hinweg auf einem für die jeweilige Dosisstufe typischen Niveau konstant. Eine Verdopplung der Behandlungsdosis führte entsprechend zu einer Verdopplung der gemessenen MT103-Serumkonzentration. Die nach Infusionsende bestimmte Abklingkinetik bestätigte die bereits im Tierversuch ermittelte *in vivo* Halbwertszeit von MT103 von ca. 2 h<sup>54</sup>, so dass die Serumkonzentration bei allen Dosisstufen bereits nach 12 h unterhalb des Detektionslimits lag. Bei einer 8-wöchigen Behandlung ergab sich ein analoger, entsprechend gestreckter Zeitverlauf der Pharmakokinetik.

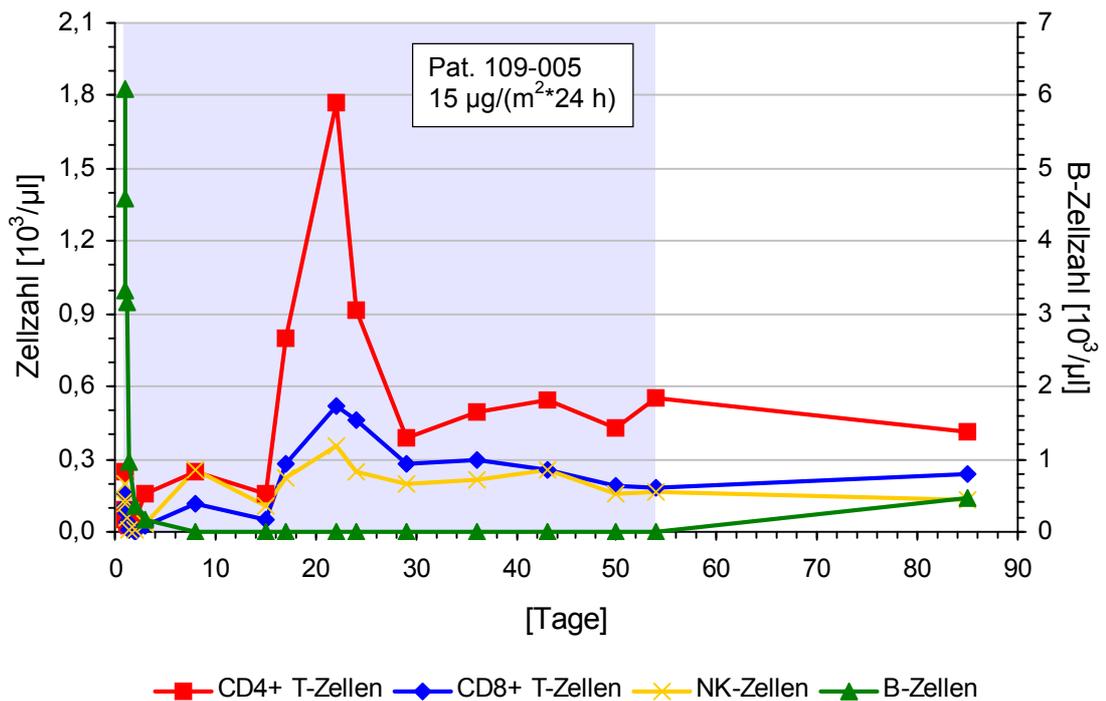
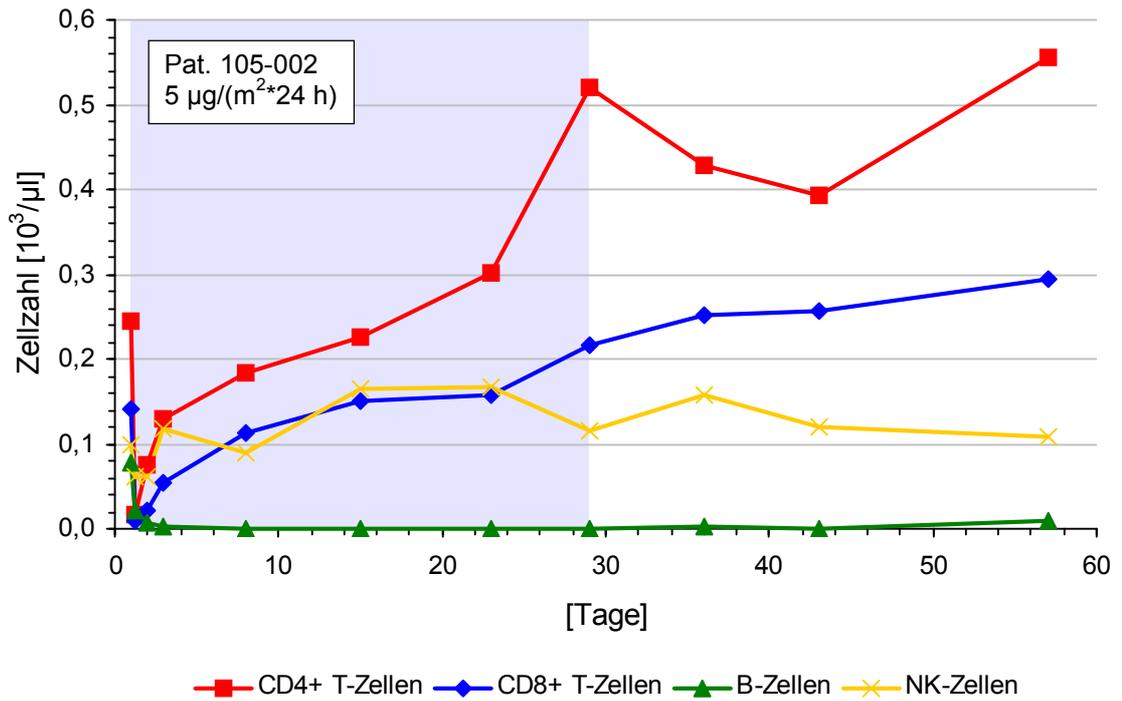
### **3.3. Verläufe der Lymphozyten-Subpopulationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dosisstufen**

Aufgrund des Wirkmechanismus wurde erwartet, dass die MT103-Therapie die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden B- und T-Zellen beeinflussen würde, wohingegen andere Zellpopulationen des Immunsystems wie z.B. die NK-Zellen nicht direkt betroffen sein sollten. Um diese spezifische Aktivität von MT103 sowie die Dosisabhängigkeit der zu beobachtenden Effekte beurteilen zu können, wurde der Verlauf einzelner Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut während der Behandlung gemessen. Im folgenden wird für jede Dosisstufe exemplarisch ein Patient dargestellt (Abb. 3.2.). Alle hier gezeigten Patienten hatten zu Behandlungsbeginn peripher zirkulierende B-Zellen. Patienten ohne periphere B-Zellen, d.h. solche, deren maligne B-Zellen nicht aus den Lymphomen ausgeschwemmt wurden und die u.a. aufgrund der multiplen Vorbehandlungen auch kaum noch normale B-Zellen in der Zirkulation aufwiesen, verhielten sich grundsätzlich ähnlich wie die Patienten mit peripheren B-Zellen. Einzig zu Behandlungsbeginn ergaben sich größere Unterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen, die in Kapitel 3.5. ausführlich dargestellt werden.



Seite 37 und 38:

**Abb. 3.2. Zeitliche Verläufe der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie der B- und NK-Zellen während der MT103-Therapie und der 4-wöchigen Nachbeobachtung.** Gezeigt ist je ein repräsentativer Patient der 4 durchgeführten Dosisstufen; die entsprechende MT103-Dosis ist angegeben. Der jeweilige Behandlungszeitraum ist blau hinterlegt.



Nach dem Infusionsbeginn kam es bei allen Patienten zu einem charakteristischen Abfall der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Vorgang erfolgte sehr schnell, so dass die T-Zellzahl meist nach 2 – 6 h ein Minimum erreichte, das teilweise mit dem vollständigen Verschwinden der T-Zellen aus der Zirkulation verbunden war. Dieser Effekt trat dosisunabhängig bereits auf der niedrigsten Dosisstufe auf und war auch bei steigender Dosis nicht stärker ausgeprägt. Das Verschwinden der T-

Zellen war jedoch nur transient, so dass sie meist nach einer Behandlungswoche wieder ihr ursprüngliches Niveau erreicht hatten. Insbesondere der Zeitpunkt der T-Zell-Rückkehr in die Zirkulation erwies sich an den Zeitpunkt des endgültigen Verschwindens zirkulierender B-Zellen gekoppelt, d.h. die T-Zell-Rückkehr war so lange verzögert, bis keine peripheren B-Zellen mehr vorhanden waren. Dies kann dadurch erklärt werden, dass an B-Zellen gebundenes MT103 ein Aktivierungssignal an T-Zellen liefert, das letztlich zu deren Auswandern aus den Blutgefäßen in das Gewebe führt. Nach der T-Zell-Rückkehr ins periphere Blut konnte im weiteren Behandlungsverlauf meist eine Expansion der T-Zellen beobachtet werden. Diese trat sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, war jedoch insbesondere bei Patienten, die ein klinisches Ansprechen auf die MT103-Therapie zeigten, bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen stärker ausgeprägt. Außerdem wurde bei Patienten mit einer 8-wöchigen Behandlungsdauer festgestellt, dass die Expansion vor allem in den ersten 4 Behandlungswochen stattfand, gefolgt von einer teilweisen Kontraktion des expandierten T-Zell-Pools und einer möglichen zweiten, meist jedoch schwächeren Expansion (siehe Kapitel 3.6.1.).

Dieser zeitliche Verlauf der T-Zellen hat zwei unterschiedliche Ursachen: Das anfängliche Verschwinden der T-Zellen aus der Zirkulation beruht auf einer Umverteilung. Dabei verlassen die T-Zellen das periphere Blut und adhären an die Gefäßwand bzw. wandern in das Gewebe ein. Die T-Zell-Rückkehr erfolgt in Abhängigkeit von der peripher vorhandenen B-Zellzahl. Erst wenn diese stark abgenommen hat, kommen die T-Zellen zurück, d.h. bei einer anfänglich großen B-Zellzahl dauert es durchschnittlich länger, bis die T-Zellen wieder im peripheren Blut erscheinen. Im Gegensatz dazu beruht das Verschwinden der B-Zellen aus der Zirkulation wahrscheinlich nicht auf einer vergleichbaren Umverteilung. Neben der direkten Lyse von B-Zellen im Blut durch MT103-aktivierte T-Zellen kommt dafür auch noch ein zweiter Mechanismus in Frage. Die in der Zirkulation befindlichen B-Zellen stehen im Gleichgewicht mit den im Gewebe und in den Lymphknoten vorhandenen (malignen) B-Zellen. Werden diese durch MT103-aktivierte T-Zellen abgetötet und damit der Tumor kleiner, sinkt gleichzeitig auch die B-Zellzahl im peripheren Blut. Die im weiteren Behandlungsverlauf auftretende Expansion der T-Zellen beruht auf einer durch die BiTE-Stimulierung ausgelösten Proliferation der

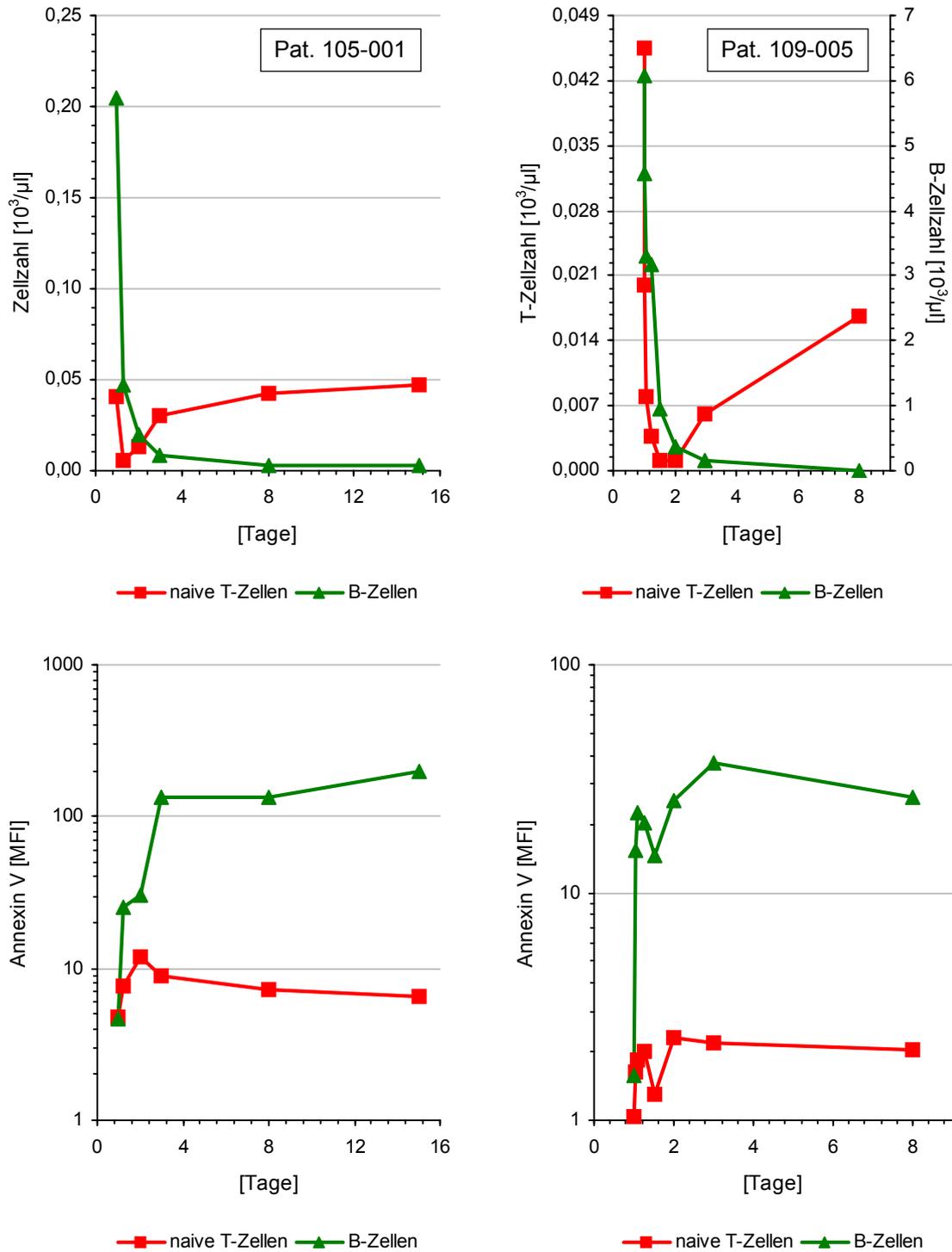
T-Zellen. Diese findet vor allem in den Lymphknoten bzw. im Tumorgewebe statt, lässt sich aber auch im peripheren Blut beobachten.

Im Gegensatz zu diesem für T-Zellen typischen Verlauf, der weitgehend unabhängig von der MT103-Dosis ist und mehr von der anfänglichen T-Zellzahl und der „Reaktionsbereitschaft“ der T-Zellen nach vorangegangenen Therapien abhängt, war die Depletion der B-Zellen direkt proportional zur MT103-Dosis. Während auf den ersten beiden Dosisstufen trotz einer eindeutigen Abnahme der zirkulierenden B-Zellen diese noch nicht vollständig eliminiert wurden, waren ab der Dosisstufe 3 ( $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$ ) im Verlauf der Behandlung keine peripheren B-Zellen mehr detektierbar. Die Geschwindigkeit der B-Zell-Depletion nahm mit steigender MT103-Dosis zu, wurde aber auch von der anfänglichen B-Zellzahl beeinflusst. Auf der Dosisstufe 3 dauerte es durchschnittlich noch 14 Tage, auf der Dosisstufe 4 konnten dagegen bei den meisten Patienten bereits nach 7 Tagen keine B-Zellen mehr nachgewiesen werden. 4 Wochen nach Behandlungsende erfolgte im Rahmen der Nachbeobachtung eine weitere Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen. In den meisten Fällen kehrte die T-Zellzahl auf den Ausgangswert vor der Behandlung zurück, während die B-Zellzahl auf niedrigem Niveau stagnierte oder wieder leicht anstieg. Bei Patienten, deren B-Zellen nach Behandlungsende deutlich zunahmen, handelte es sich ausschließlich um maligne,  $\text{CD5}^+$  Lymphomzellen, die nach Absetzen von MT103 und dem damit verbundenen Wegfall des Therapie-drucks wieder aus dem Tumor ausgeschwemmt wurden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wies auf eine unvollständige Zerstörung des Tumors hin, die u.U. durch eine unzureichende T-Zell-Infiltration des Tumorgewebes aufgrund schlechter Zugänglichkeit begünstigt war.

Als weitere Lymphozyten-Subpopulation wurden auch die NK-Zellen untersucht. Da sie nicht direkt am BiTE-vermittelten Wirkmechanismus beteiligt sind, zeigten sie bei den meisten Patienten auch keine auffälligen Effekte, sondern schwankten während der Behandlung um ihren Ausgangswert. Dies beweist die hohe Spezifität von MT103 sowie den gerichteten Wirkmechanismus der BiTE-Moleküle, der andere Komponenten des Immunsystems relativ wenig beeinflusst.

### 3.4. MT103-induzierte B-Zell-Apoptose

T-Zellen, die durch MT103 aktiviert werden, zerstören B-Zellen durch die Ausschüttung löslicher Mediatoren wie Perforin und Granzyme B oder durch die Expression von FasL<sup>58, 59</sup>. Beide Mechanismen führen zum apoptotischen Zelltod der B-Zellen. Das Frühstadium der Apoptose lässt sich durch eine Färbung mit Annexin V nachweisen, das mit hoher Affinität an Phosphatidylserin-Lipide bindet. Diese befinden sich bei intakten Zellen ausschließlich auf der zytosolischen Membraninnenseite, gelangen jedoch bei Verlust der Membranintegrität auch auf die extrazelluläre Außenseite. Während die Zerstörung der B-Zellen beabsichtigt ist, stellt sich gleichzeitig die Frage, ob auch die naiven T-Zellen anerg bzw. apoptotisch werden würden, da bei der BiTE-Stimulierung das für die Aktivierung normalerweise benötigte co-stimulatorische Signal durch CD28 fehlt. In den Experimenten zeigte sich, dass die zu Behandlungsbeginn beobachtete B-Zell-Depletion tatsächlich mit einer Verschiebung der mittleren Annexin V-Fluoreszenzintensität der B-Zellen verbunden war (Abb. 3.3.). Nach einem anfänglich starken Anstieg erreichte die MFI das bis zu 30-fache des Ausgangswerts vor Behandlungsbeginn und blieb bis zur vollständigen B-Zell-Depletion auf diesem hohen Niveau. Dieser Zusammenhang wies darauf hin, dass das Verschwinden der B-Zellen aus der Zirkulation auf eine Depletion durch Apoptose und nicht auf eine reine Umverteilung zwischen mehreren Kompartimenten zurückzuführen war. Dagegen zeigten die naiven T-Zellen den in Kapitel 3.3. beschriebenen charakteristischen Zellverlauf. Zu Behandlungsbeginn verließen sie schnell das periphere Blut und kehrten erst nach erfolgter B-Zell-Depletion wieder in die Zirkulation zurück. Im Gegensatz zu den B-Zellen handelte es sich aber hier beim Verschwinden nicht um eine Depletion durch Apoptose, da einerseits die naiven T-Zellen bereits nach kurzer Zeit wieder im Blut nachgewiesen werden konnten und da andererseits die Verschiebung der Annexin V-MFI sehr gering ausfiel. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MT103 spezifisch zur Apoptose und damit zur Zerstörung von B-Zellen führte, während die naiven T-Zellen nicht beeinflusst wurden.

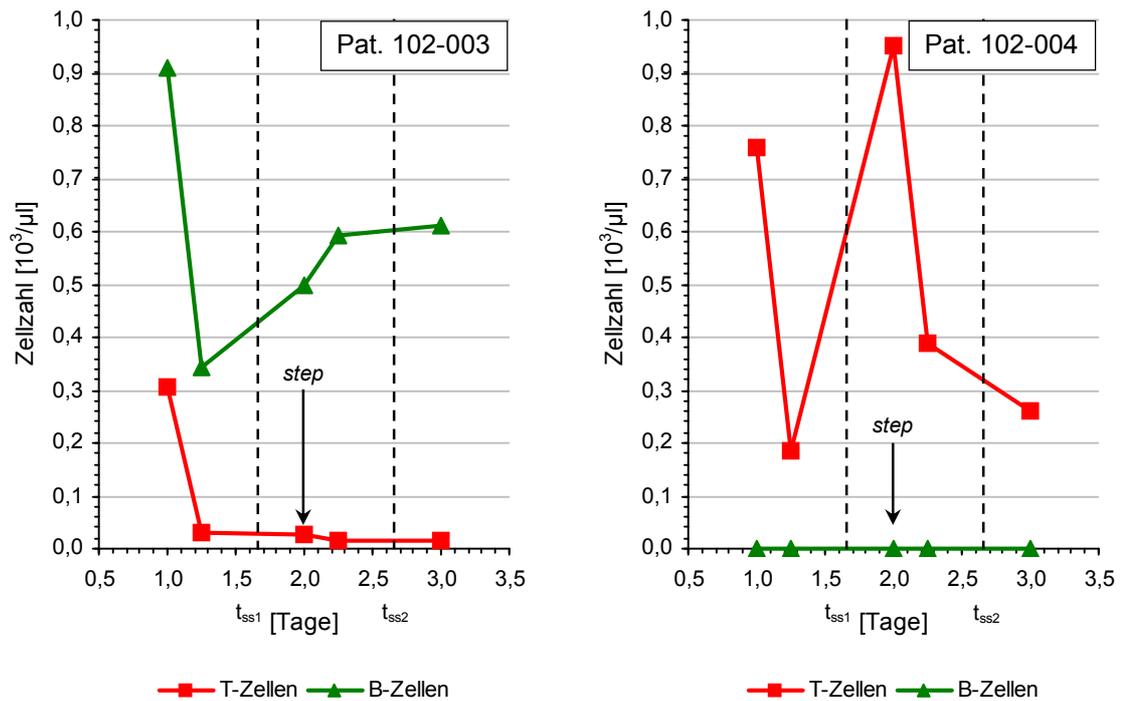


**Abb. 3.3. Korrelation zwischen B-Zell-Depletion und –Apoptose.** Gezeigt sind die absoluten Zellverläufe (oben) und die mittlere Annexin V-Fluoreszenzintensität (unten) der naiven T-Zellen und der B-Zellen bei zwei repräsentativen Patienten. Die Darstellungen enden jeweils zum Zeitpunkt der vollständigen B-Zell-Depletion.

## 3.5. T-Zell-Effekte während der Einstiegsphase

### 3.5.1. T-Zell-Verläufe in Abhängigkeit der B-Zellzahl bei unterschiedlichen Einstiegsvarianten

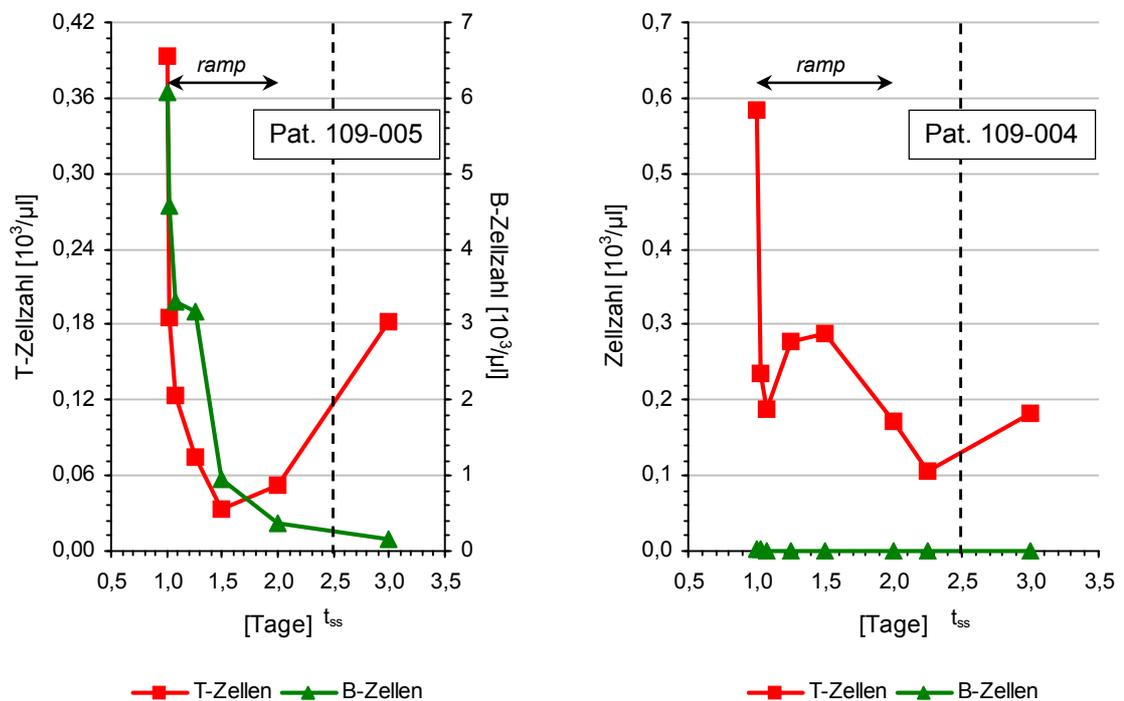
Die Einstiegsphase erstreckte sich bis zum Erreichen des jeweiligen *steady state* der MT103-Serumkonzentration. Je nach der gewählten Einstiegsvariante *step*, *ramp* oder *flat* wurde dieser zu unterschiedlichen Zeitpunkten  $t_{ss}$  erreicht (40 h, 36 h bzw. 16 h nach Behandlungsbeginn; siehe Kapitel 3.2.). Aufgrund der niedrigen MT103-Dosis erhielten die Patienten auf den ersten 3 Dosisstufen bei Infusionsbeginn unmittelbar die jeweilige Enddosis (Einstiegsvariante *flat*). Die T-Zell-Verläufe dieser Patienten zeigten während der Einstiegsphase kein auffälliges Verhalten. Um Nebenwirkungen beim Einstieg, insbesondere durch eine starke Zytokin-Ausschüttung, zu minimieren, wurde ab der folgenden Dosisstufe eine Adaptation durch stufenweise Erhöhung der MT103-Dosis durchgeführt (Einstiegsvariante *step*). Dabei wurde zunächst 24 h die Einstiegsdosis  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  verabreicht, bevor auf die eigentliche Behandlungsdosis  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  gesteigert wurde. Für das Verständnis der T-Zell-Verläufe waren die folgenden beiden Punkte wichtig: Einerseits musste zwischen Patienten mit und solchen ohne zirkulierende B-Zellen zu Behandlungsbeginn unterschieden werden, da dies Einfluss auf die Rückkehrkinetik der T-Zellen nach ihrem anfänglichen Verschwinden hatte. Andererseits spielte der Zeitpunkt  $t_{ss}$  des Erreichens des jeweiligen *steady state* eine Rolle. Bei Patient 102-003 wurden trotz einer deutlichen Abnahme nach Infusionsbeginn während der gesamten Einstiegsphase periphere B-Zellen detektiert (Abb. 3.4.). Die T-Zellen zeigten den bereits beschriebenen typischen Verlauf. Sie verschwanden schnell aus der Zirkulation und kehrten aufgrund der vorhandenen B-Zellen bis zum Erreichen von  $t_{ss2}$  nicht zurück. Insofern hatte die Dosissteigerung nach 24 h keinen Einfluss auf den T-Zell-Verlauf. Im Gegensatz dazu konnten bei Patient 102-004 während der gesamten Einstiegsphase keine peripheren B-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.). Dementsprechend unterschied sich auch die T-Zell-Kurve deutlich von der des Patienten 102-003. Nach dem steilen Abfall der Zellzahl zu Behandlungsbeginn kehrten die T-Zellen nach Erreichen von  $t_{ss1}$  auf



**Abb. 3.4. Einstiegsszenarien in der Kohorte 4 step bei je einem repräsentativen Patienten mit (links) und ohne (rechts) periphere B-Zellen.** Dabei bezeichnet  $t_{ss1}$  den Zeitpunkt, an dem der *steady state* der Einstiegsdosis  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erreicht wurde, *step* die Dosissteigerung und  $t_{ss2}$  den Zeitpunkt, an dem der *steady state* der Behandlungsdosis  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erreicht wurde.

ihr ursprüngliches Niveau im Blut zurück. Die folgende Dosissteigerung von 5 auf  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  führte erneut zu einem sehr schnellen Verschwinden von ca. 60% der T-Zellen aus der Zirkulation. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt (nach ca. 38 h) aufgetretenen Nebenwirkungen musste die MT103-Therapie bei Patient 102-004 abgebrochen werden. Die Nebenwirkungen standen wahrscheinlich in Zusammenhang mit dem zweimaligen, in kurzem zeitlichen Abstand erfolgten Verschwinden der T-Zellen aus der Zirkulation, das jeweils mit Kontakt und dadurch mit Stress des Blutgefäß-Endothels verbunden war (siehe Kapitel 4.1.). Jede Dosisänderung hatte also auf die im peripheren Blut vorhandenen T-Zellen den Effekt, dass sie aus der Zirkulation verschwanden. Der Unterschied zwischen Patient 102-003 und Patient 102-004 bestand in der An- bzw. Abwesenheit von zirkulierenden B-Zellen, die die Rückkehr der T-Zellen nach deren anfänglichem Verschwinden verhinderten, so dass diese zum Zeitpunkt der Dosissteigerung nach 24 h nicht im peripheren Blut waren.

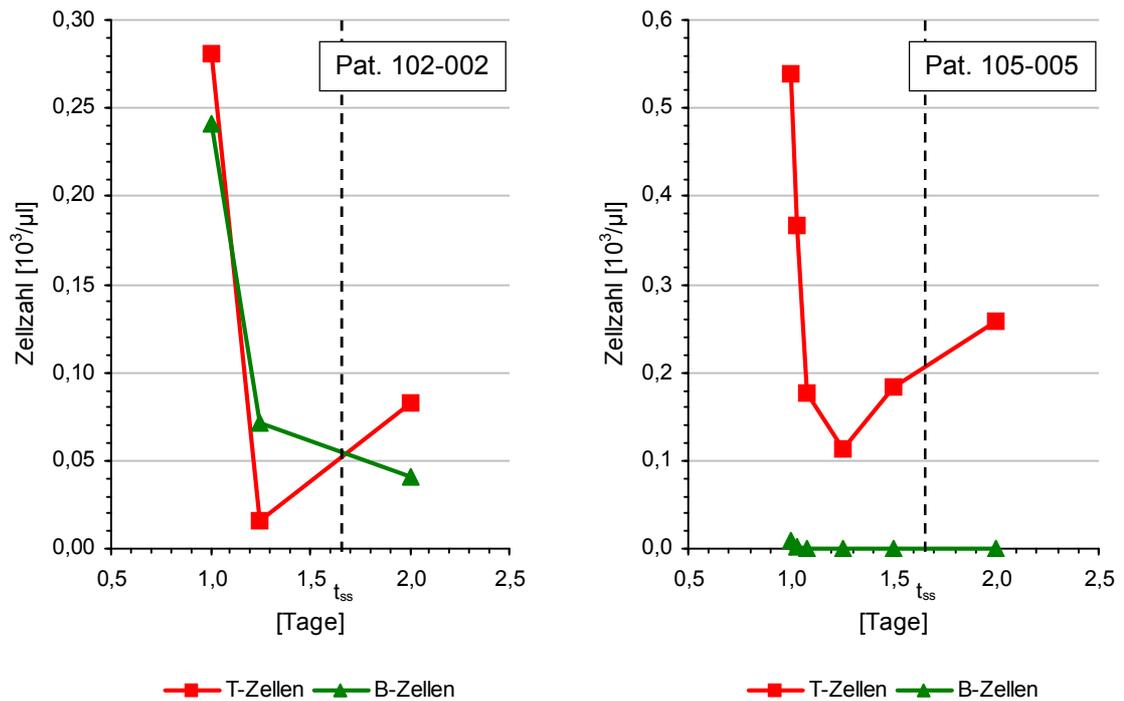
Während der initiale „Dosisprung“ bei Infusionsbeginn nicht zu vermeiden war, sollte in der folgenden Kohorte keine zusätzliche abrupte Dosissteigerung durchgeführt werden, um bei Patienten ohne zirkulierende B-Zellen kein erneutes Verschwinden der T-Zellen und möglicherweise damit verbundene Nebenwirkungen auszulösen. Deshalb wurde die Einstiegsvariante *ramp* eingeführt, bei der die MT103-Dosis während der ersten 24 h der Behandlung linear von 0 auf 15  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  gesteigert wurde. Bei Patient 109-005 waren während der gesamten Einstiegsphase mehr B- als T-Zellen im peripheren Blut vorhanden (Abb. 3.5.). Dabei nahmen die B-Zellen kontinuierlich bis Tag 3 ab. Die T-Zellen verschwanden geringfügig schneller und erreichten bereits an Tag 1,5 ein Minimum. Sie kehrten jedoch nicht unmittelbar in die Zirkulation zurück, sondern blieben zunächst auf diesem niedrigen Niveau. Erst nach dem Erreichen von  $t_{\text{ss}}$  und der nahezu vollständigen Depletion der B-Zellen im peripheren Blut konnten sie wieder in der Zirkulation detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine Dosisänderung mehr stattfand, kam es zu keinem erneuten Verschwinden der T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnten bei Patient 109-004 wieder keine peripheren B-Zellen



**Abb. 3.5. Einstiegszenarien in der Kohorte 4 *ramp* bei je einem repräsentativen Patienten mit (links) und ohne (rechts) periphere B-Zellen.** Dabei bezeichnet *ramp* den Zeitraum der linearen Dosissteigerung von 0 auf 15  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  und  $t_{\text{ss}}$  den Zeitpunkt, an dem der *steady state* der Behandlungsdosis erreicht wurde.

nachgewiesen werden (Abb. 3.5.). Die T-Zell-Kurve wies eine gewisse Ähnlichkeit mit der des Patienten 102-004 auf. Nach dem anfänglich schnellen Verschwinden der T-Zellen kehrten diese teilweise noch während der linearen Dosissteigerung bzw. vor dem Erreichen von  $t_{ss}$  in die Zirkulation zurück. Dadurch waren sie einer weiteren Dosisänderung ausgesetzt, die zu ihrem erneuten Verschwinden führte. Dieser Effekt trat im Vergleich zu Patient 102-004 zwar in deutlich abgeschwächter Form auf, brachte aber weiterhin das Risiko möglicher Nebenwirkungen mit sich. Deshalb war auch die Einstiegsvariante *ramp* für Patienten ohne periphere B-Zellen noch nicht optimal.

Zur weiteren Reduzierung des Risikos wurde daher trotz der relativ hohen MT103-Dosis in der folgenden Kohorte wieder die Einstiegsvariante *flat* eingesetzt. Dabei erhielten die Patienten unmittelbar die Behandlungsdosis  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$ , wodurch der Zeitraum bis zum Erreichen von  $t_{ss}$  von 36 h auf 16 h gesenkt werden konnte. Dies bedeutete insbesondere, dass T-Zellen, die 16 h nach Infusionsbeginn in die Zirkulation zurückkehrten, keiner weiteren Dosisänderung ausgesetzt waren und damit nicht zum erneuten Verschwinden veranlasst wurden. Tatsächlich zeigten die T-Zellen bei Patient 105-005, der wieder keine peripheren B-Zellen besaß, einen entsprechenden Verlauf (Abb. 3.6.). Innerhalb der ersten 6 h der Behandlung verschwanden ca. 80% der T-Zellen aus der Zirkulation, um anschließend deutlich langsamer wieder zurückzukehren. Da bei der Einstiegsvariante *flat* Änderungen der MT103-Serumkonzentration 12 h nach Infusionsbeginn nur noch sehr gering ausfielen und  $t_{ss}$  bereits nach 16 h erreicht wurde, war kein erneutes Auswandern der T-Zellen zu beobachten. Damit konnte bei Patienten ohne periphere B-Zellen zwar nicht die schnelle Rückkehr der T-Zellen nach dem ersten Verschwinden verhindert werden, durch das frühzeitige Erreichen von  $t_{ss}$  wurde jedoch ein erneutes Auswandern vermieden. Dies reduzierte die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von damit verbundenen Nebenwirkungen deutlich. Zum Vergleich ist in Abbildung 3.6. auch ein Patient mit peripheren B-Zellen dargestellt. Allerdings gehörte dieser zu Kohorte 3, da zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit noch kein Patient mit peripheren B-Zellen auf der Dosisstufe  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  mit der Einstiegsvariante *flat* behandelt worden war. Daher liegen für diesen Patienten auch deutlich weniger Messpunkte während der Einstiegsphase vor. B- und T-Zellverläufe entsprechen weitestgehend denen der anderen gezeigten Patienten



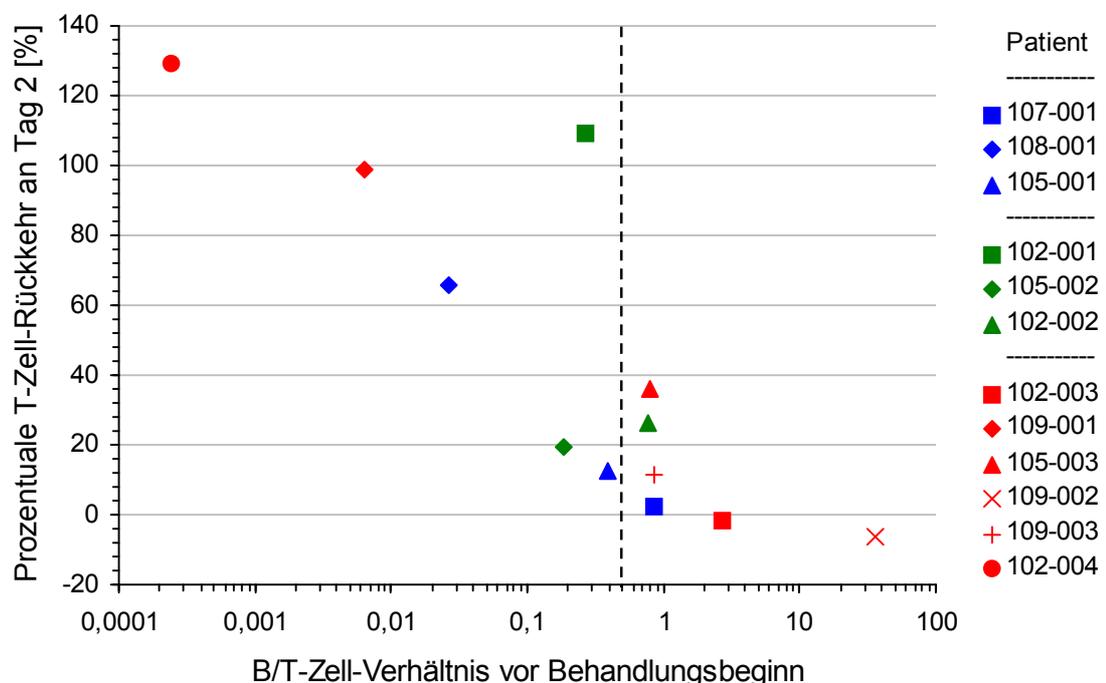
**Abb. 3.6. Einstiegsszenarien in den Kohorten 3 bzw. 4 *flat* bei je einem repräsentativen Patienten mit (links) und ohne (rechts) periphere B-Zellen.** Dabei bezeichnet  $t_{ss}$  den Zeitpunkt, an dem der *steady state* der jeweiligen Behandlungsdosis 5 bzw. 15  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erreicht wurde.

mit peripheren B-Zellen, da sie bei dieser Patientengruppe relativ unabhängig von der gewählten Einstiegsvariante waren. Die B-Zellen verschwanden kontinuierlich aus der Zirkulation, während die T-Zellen direkt nach Infusionsbeginn schnell verschwanden, um erst nach der Depletion der B-Zellen und dem Erreichen von  $t_{ss}$  zurückzukehren. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die T-Zellverläufe sowohl von Patienten mit als auch von Patienten ohne periphere B-Zellen bei der Einstiegsvariante *flat* relativ ähnlich aussahen und ein zweites Verschwinden der T-Zellen aus der Zirkulation verhindert werden konnte.

### 3.5.2. Korrelation zwischen B-Zellzahl und T-Zell-Rückkehrkinetik

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Einstiegsvarianten deuteten darauf hin, dass zwischen dem zu Behandlungsbeginn existenten Verhältnis von B- zu T-Zellen einerseits und der Rückkehrkinetik der T-Zellen nach ihrem anfänglichen Verschwinden andererseits ein Zusammenhang bestand. Die Rückkehrkinetik wurde

durch die prozentuale T-Zell-Rückkehr an Tag 2 ausgedrückt. Dazu wurde die Differenz zwischen dem 24 h- und dem 6 h-Wert der T-Zellen ins Verhältnis zur Differenz zwischen den Werten vor Behandlungsbeginn und nach 6 h gesetzt. Dieser Quotient konnte bei allen Patienten ermittelt werden und stellte ein Maß für die Geschwindigkeit der T-Zell-Rückkehr dar. Bei halblogarithmischer Auftragung ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem B/T-Zell-Verhältnis und der prozentualen T-Zell-Rückkehr an Tag 2 (Abb. 3.7.). Patienten mit einem kleinen B/T-Zell-Verhältnis, d.h. solche ohne periphere B-Zellen, zeigten bereits an Tag 2 eine ausgeprägte Rückkehr der T-Zellen in die Zirkulation, teilweise sogar über den Ausgangswert hinaus. Im Gegensatz dazu kehrten bei Patienten mit einem großen B/T-Zell-Verhältnis, d.h. bei Patienten mit peripheren B-Zellen, vergleichsweise wenig T-Zellen bereits an Tag 2 zurück. Wenn man nur die Fälle betrachtet, in denen mehr als 50% der anfangs vorhandenen T-Zellen vor Erreichen des jeweiligen Zeitpunkts  $t_{ss}$  zurückgekehrt waren, hatten fast alle ein B/T-Zell-Verhältnis, das kleiner als 0,1 war. Da diese Patienten während der Einstiegsphase ein größeres Risiko für Nebenwirkungen besitzen, sollten sie mit der Einstiegsvariante



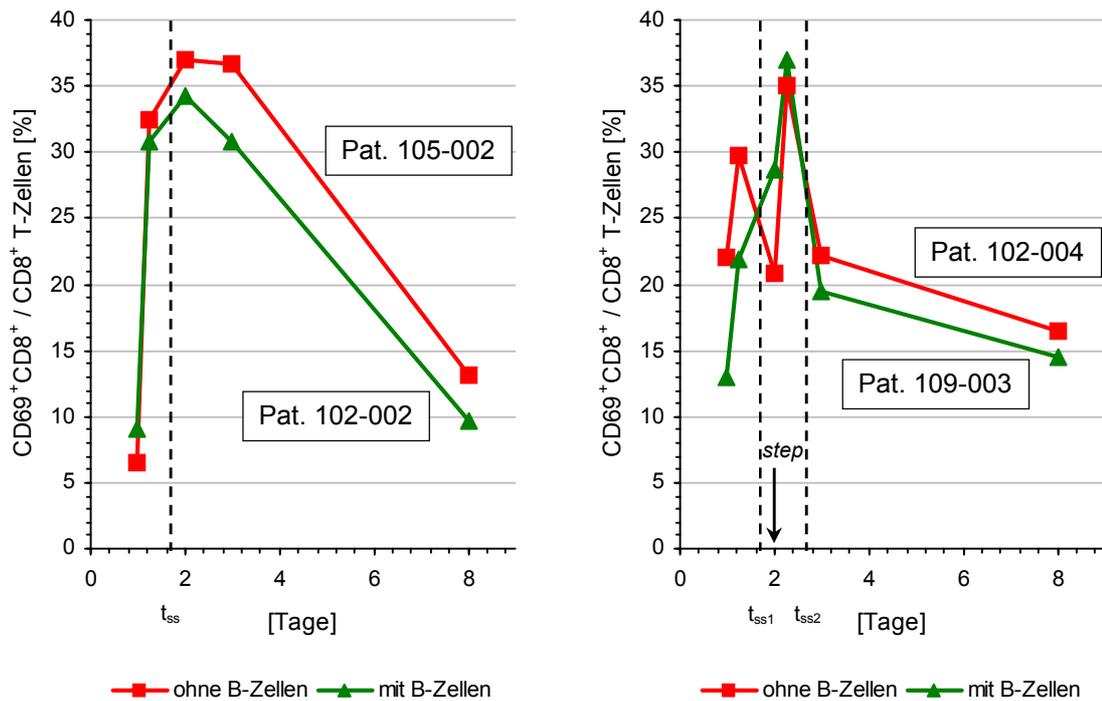
**Abb. 3.7. Lineare Korrelation zwischen dem B/T-Zell-Verhältnis und der T-Zell-Rückkehrkinetik.** Letztere wird durch die prozentuale T-Zell-Rückkehr an Tag 2 ausgedrückt (Einzelheiten zur Berechnung im Text). Patienten mit einem B/T-Zell-Verhältnis unter 0,5 besitzen während der Einstiegsphase ein potentiell größeres Risiko für Nebenwirkungen.

*flat* behandelt werden. Folglich wurden im Laufe der Studie neue Patienten, deren B/T-Zell-Verhältnis unter 0,5 lag (d.h. solche, die mehr als doppelt so viele zirkulierende T- wie B-Zellen aufwiesen), aus Sicherheitsaspekten als Patienten ohne periphere B-Zellen eingestuft und dementsprechend der Kohorte 4 *flat* zugeordnet.

### 3.5.3. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung während der Einstiegsphase

Die T-Zell-Aktivierung wurde getrennt nach CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Im Folgenden wird exemplarisch die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt, da bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ähnliche Effekte, aber meist in abgeschwächterer Form auftraten. In Zusammenhang mit dem Einstieg in die MT103-Therapie spielte der Aktivierungsmarker CD69 eine wichtige Rolle, da die CD69-Expression an der Auswanderung und der Rückkehr der T-Zellen aus dem Lymphgewebe beteiligt ist<sup>29</sup>. Insbesondere scheint eine transiente Erhöhung der CD69-Expression den Kontakt von T-Zellen mit Endothelzellen anzuzeigen; dies wurde v.a. bei Patienten ohne zirkulierende B-Zellen deutlich. Auch die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR wurden bei einigen Patienten (mit vielen zirkulierenden B-Zellen) während der Einstiegsphase hochreguliert, als mittel- bzw. langfristige Aktivierungsmarker besitzen sie jedoch eine größere Aussagekraft für die Effektorphase und werden daher in diesem Zusammenhang besprochen (siehe Kapitel 3.6.4.).

Wie schon bei den T-Zell-Profilen wirkten sich die unterschiedlichen Einstiegsvarianten und das Vorhandensein zirkulierender B-Zellen auch auf den CD69-Verlauf aus (Abb. 3.8.). Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass der Prozentsatz der CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Infusionsbeginn um das 2- bis 5-fache anstieg und zwischen Tag 2 und 3 sein Maximum erreichte. Anschließend fiel er bis zum Ende der ersten Behandlungswoche wieder auf sein ursprüngliches Niveau zurück. Im Gegensatz zur Einstiegsvariante *flat* zeigte der CD69-Verlauf bei der Variante *step* jedoch anfangs einen flacheren Anstieg und ein geringfügig verzögertes Erreichen des Maximums. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier die maximale MT103-Serumkonzentration stufenweise und erst 40 h nach Infusionsbeginn ( $t_{ss2}$ ) erreicht wurde. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass das Verschwinden der T-Zellen aus der Zirkulation bei der Einstiegsvariante *step* über einen längeren Zeitraum



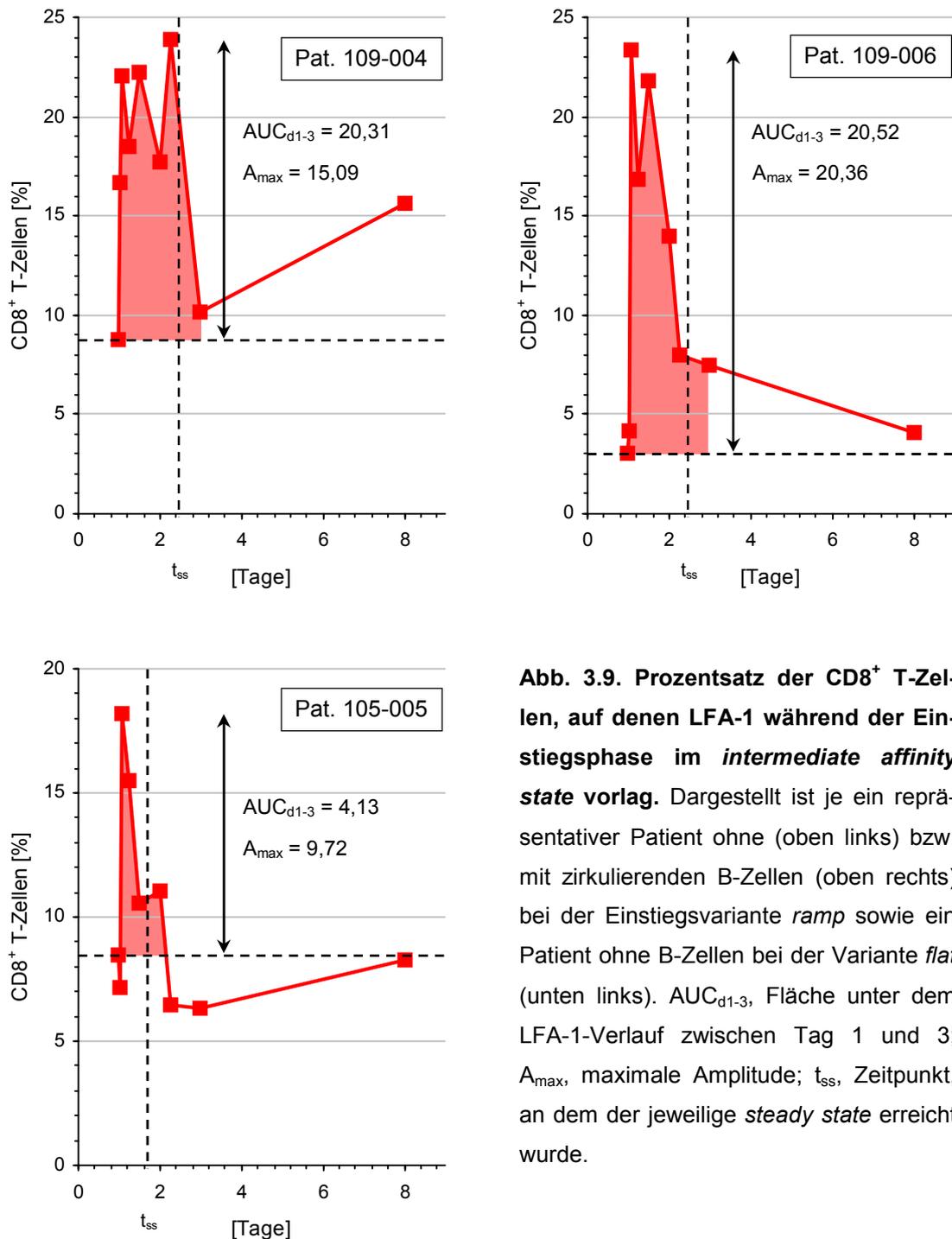
**Abb. 3.8. Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Einstiegsphase.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD69-Verlauf) von je einem Patienten mit bzw. ohne zirkulierende B-Zellen für die Einstiegsvarianten *flat* (links) und *step* (rechts). Dabei bezeichnen  $t_{ss}$ ,  $t_{ss1}$  und  $t_{ss2}$  die Zeitpunkte, an denen der *steady state* der jeweiligen MT103-Dosis 5 bzw. 15  $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erreicht wurde, *step* zeigt die Dosissteigerung an.

gestreckt wurde. Außerdem wirkte sich bei dieser Einstiegsvariante erneut die Abwesenheit zirkulierender B-Zellen auf den CD69-Verlauf aus. Während die prozentualen Anteile der CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Variante *flat* mit bzw. ohne B-Zellen weitgehend deckungsgleich verliefen, zeigten sich bei der Variante *step* deutliche Unterschiede. Dabei war der CD69-Verlauf bei Patient 102-004 (ohne zirkulierende B-Zellen) komplementär zum entsprechenden T-Zell-Verlauf (siehe Abb. 3.4.). Zu Behandlungsbeginn stieg die CD69-Aktivierung an, um nach Erreichen des ersten *steady state* ( $t_{ss1}$ ) wieder auf den Ausgangswert abzusinken. Nach der Dosissteigerung an Tag 2 nahm der Prozentsatz der CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen erneut stark zu und erreichte 30 h nach Infusionsbeginn sein Maximum. Der nachfolgende Rückgang der CD69-Aktivierung ist wahrscheinlich auf den Abbruch der MT103-Therapie nach 38 h aufgrund der oben beschriebenen Nebenwirkungen zurückzuführen. Trotzdem zeigt der Vergleich des T-Zell- und des CD69-Verlaufs bei diesem Patienten eine deutliche Korrelation zwischen dem Auswandern

der T-Zellen aus der Zirkulation und der gleichzeitig erhöhten CD69-Expression. Insofern kann letztere als allgemeiner Indikator für die T-Zell-Aktivierung durch Endothelkontakt sowie für das Auswandern der T-Zellen aus dem peripheren Blut angesehen werden, da sich die CD69-Aktivierung zeitlich mit dem bei allen Patienten beobachteten Verschwinden der T-Zellen zu Behandlungsbeginn deckte.

#### 3.5.4. Erhöhte Adhäsivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Sowohl die T-Zell- als auch die CD69-Verläufe zeigten, dass die T-Zellen direkt nach Infusionsbeginn aus dem zirkulierenden Blut an das Gefäß-Endothel adhärten und eventuell auch in das Gewebe übertraten. Es wurde daher vermutet, dass die Adhäsivität der T-Zellen bei diesem Vorgang anstieg, damit sie in Kontakt mit den Endothelzellen treten konnten. Eine daran beteiligte, wichtige Komponente ist das Adhäsionsmolekül LFA-1 auf der Oberfläche von T-Zellen, das in mehreren Affinitätsstadien vorliegen kann. Nach dem Wechsel in den *intermediate affinity state* bildet es eine stabile Bindung mit ICAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen aus und ermöglicht damit den T-Zellen das Auswandern aus der Zirkulation. In den ab Kohorte 4 *ramp* durchgeführten Experimenten wurde der Übergang von LFA-1 in den *intermediate affinity state* durch Färbung mit einem rekombinanten ICAM-1-Protein nachgewiesen. Bei der Mehrheit der Patienten stieg der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auf denen LFA-1 im *intermediate affinity state* vorlag, kurz nach Infusionsbeginn um das 2- bis 7-fache an und machte durchschnittlich 20% der gesamten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus (Abb. 3.9.). Im weiteren Verlauf ließen sich drei Szenarien unterscheiden: Bei Patient 109-004 (Einstiegsvariante *ramp*, ohne zirkulierende B-Zellen) schwankte der Anteil während der folgenden 28 h um das erreichte Niveau und fiel erst an Tag 3 und damit nach Erreichen von  $t_{ss}$  wieder auf den Ausgangswert zurück. Dies weist darauf hin, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen über einen relativ langen Zeitraum hinweg das Potential besaßen, an die Endothelzellen zu binden. Auch der entsprechende T-Zell-Verlauf (siehe Abb. 3.5.) zeigte bereits, dass die T-Zellen bis 30 h nach Infusionsbeginn vermehrt an das Gefäß-Endothel adhärten bzw. das zirkulierende Blut verließen. Damit decken sich die Aussagen dieser beiden Verläufe. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen



**Abb. 3.9. Prozentsatz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auf denen LFA-1 während der Einstiegsphase im *intermediate affinity state* vorlag.** Dargestellt ist je ein repräsentativer Patient ohne (oben links) bzw. mit zirkulierenden B-Zellen (oben rechts) bei der Einstiegsvariante *ramp* sowie ein Patient ohne B-Zellen bei der Variante *flat* (unten links).  $AUC_{d1-3}$ , Fläche unter dem LFA-1-Verlauf zwischen Tag 1 und 3;  $A_{max}$ , maximale Amplitude;  $t_{ss}$ , Zeitpunkt, an dem der jeweilige *steady state* erreicht wurde.

mit höher affinem LFA-1 bei Patient 109-006 (Einstiegsvariante *ramp*, mit zirkulierenden B-Zellen) nur 10 h auf seinem Maximum und fiel bereits an Tag 2 und damit vor Erreichen von  $t_{ss}$  auf ein gegenüber dem Ausgangswert leicht erhöhtes Niveau zurück (Abb. 3.9.). Der Zeitraum, in dem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine stärkere Adhäsivität besaßen und mit den Endothelzellen in Wechselwirkung treten konnten, war also im Vergleich deutlich kürzer. Dieser Effekt zeigte sich auch bei Pati-

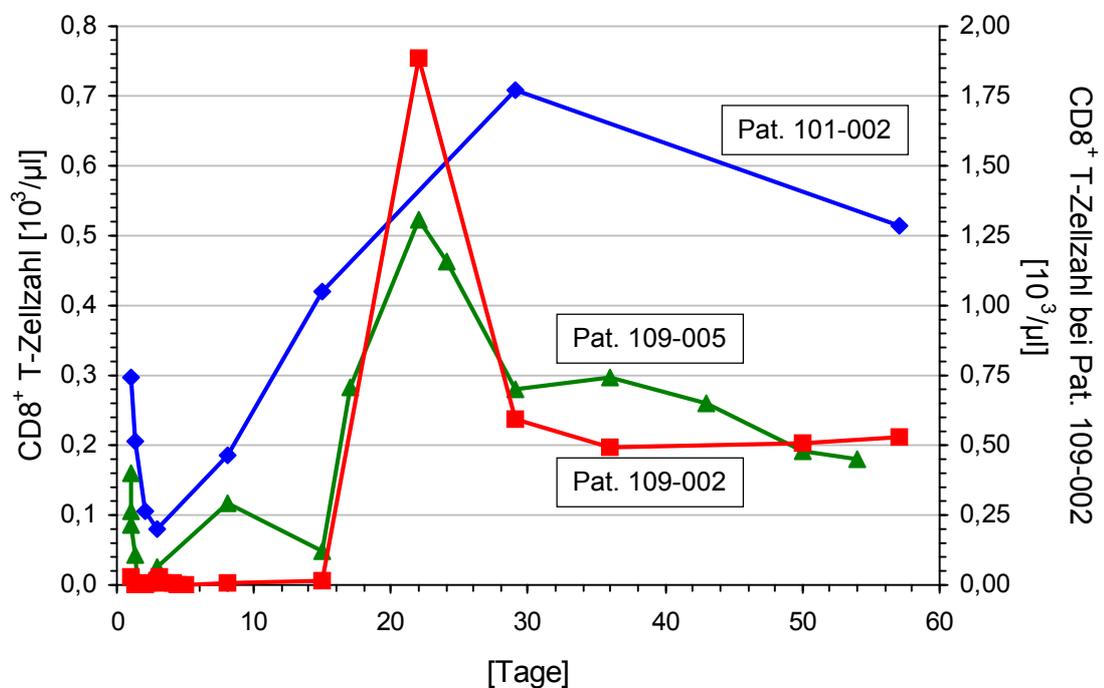
enten ohne zirkulierende B-Zellen, die mit der Einstiegsvariante *flat* behandelt wurden. So erreichte der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit höher affinem LFA-1 bei Patient 105-005 ebenfalls 2 h nach Infusionsbeginn sein Maximum, fiel dann jedoch unmittelbar wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 3.9.). Außerdem spiegelte sich der unterschiedlich lange Zeitraum erhöhter Adhäsivität auch in der auf die maximale Amplitude normierten Fläche unter dem jeweiligen LFA-1-Verlauf zwischen Tag 1 und 3 wider. Dieser Quotient beträgt bei den Patienten 109-004, 109-006 und 105-005 1,36, 1,01 bzw. 0,43. Im Vergleich zur Einstiegsvariante *flat* führte damit die Variante *ramp*, insbesondere in Abwesenheit zirkulierender B-Zellen, zu einem deutlich längeren Zeitraum, in dem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine stärkere Adhäsivität aufwiesen. Die erhöhte Affinität von LFA-1 ist ein Hinweis auf die Wechselwirkung zwischen Blutgefäß-Endothel und T-Zellen sowie auf das aktive Verschwinden letzterer aus der Zirkulation. Aufgrund der damit möglicherweise verbundenen Nebenwirkungen sollte dieser Vorgang durch Verwendung der Einstiegsvariante *flat* möglichst kurz gehalten werden.

## 3.6. T-Zell-Effekte während der Effektorphase

### 3.6.1. Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Auf die vergleichsweise kurze Einstiegsphase folgte die Effektorphase, die sich von Tag 8 bis zum jeweiligen Behandlungsende erstreckte. Während dieses Zeitraums fand in den Tumorkläsionen die Eliminierung der (malignen) B-Zellen durch BiTE-aktivierte T-Zellen statt. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, führte die Aktivierung u.a. zu einer Proliferation der T-Zellen. Diese fiel je nach Patient unterschiedlich stark aus und trat sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch den CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf (siehe Abb. 3.2.). In ca. 75% der Fälle war jedoch die Proliferation bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgeprägter als bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen; erstere leisten aufgrund ihres höheren zytotoxischen Potentials vermutlich auch einen größeren Beitrag zur BiTE-vermittelten Lyse der B-Zellen. Daher werden nachfolgend nur die CD8<sup>+</sup> T-Zellverläufe betrachtet. Nach dem schnellen Verschwinden unmittelbar nach Infusionsbeginn kehrten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen meist noch innerhalb der ersten Behand-

lungswoche in die Zirkulation zurück (Abb. 3.10.). Dabei korrelierte der Zeitpunkt der T-Zell-Rückkehr mit dem Verschwinden der B-Zellen aus dem peripheren Blut. Letzteres ist wahrscheinlich nicht nur auf die direkte Lyse der im Blut befindlichen B-Zellen zurückzuführen, sondern die ausgewanderten T-Zellen zerstörten die malignen B-Zellen in den Tumorknoten, so dass diese keine weiteren B-Zellen ins Blut ausschwemmen. Erst nach einer Reduktion der Tumormasse würden die T-Zellen nicht mehr in den befallenen Lymphknoten bzw. im Knochenmark zurückgehalten und wieder in der Zirkulation erscheinen. Daher handelte es sich in der ersten und teils auch zweiten Behandlungswoche vermutlich um Umverteilungseffekte zwischen verschiedenen Kompartimenten, aber noch nicht um T-Zell-Proliferation. Von einer echten Expansion ist erst dann auszugehen, wenn die  $CD8^+$  T-Zellzahl deutlich über ihren Ausgangswert steigt. Dies war bei einigen Patienten bereits am Ende der zweiten Behandlungswoche der Fall, trat jedoch meist erst in der dritten und vierten Woche auf (Abb. 3.10.). Dabei nahm die  $CD8^+$  T-Zellzahl durchschnittlich um den Faktor 2 bis 5 zu; in Einzelfällen (z.B. Pat. 109-002) wurde eine bis zu 60-fache Steigerung beobachtet. Gegen Ende der vierten Behandlungswoche erfolgte bei ca. 90% der Patienten trotz weiterhin bestehender

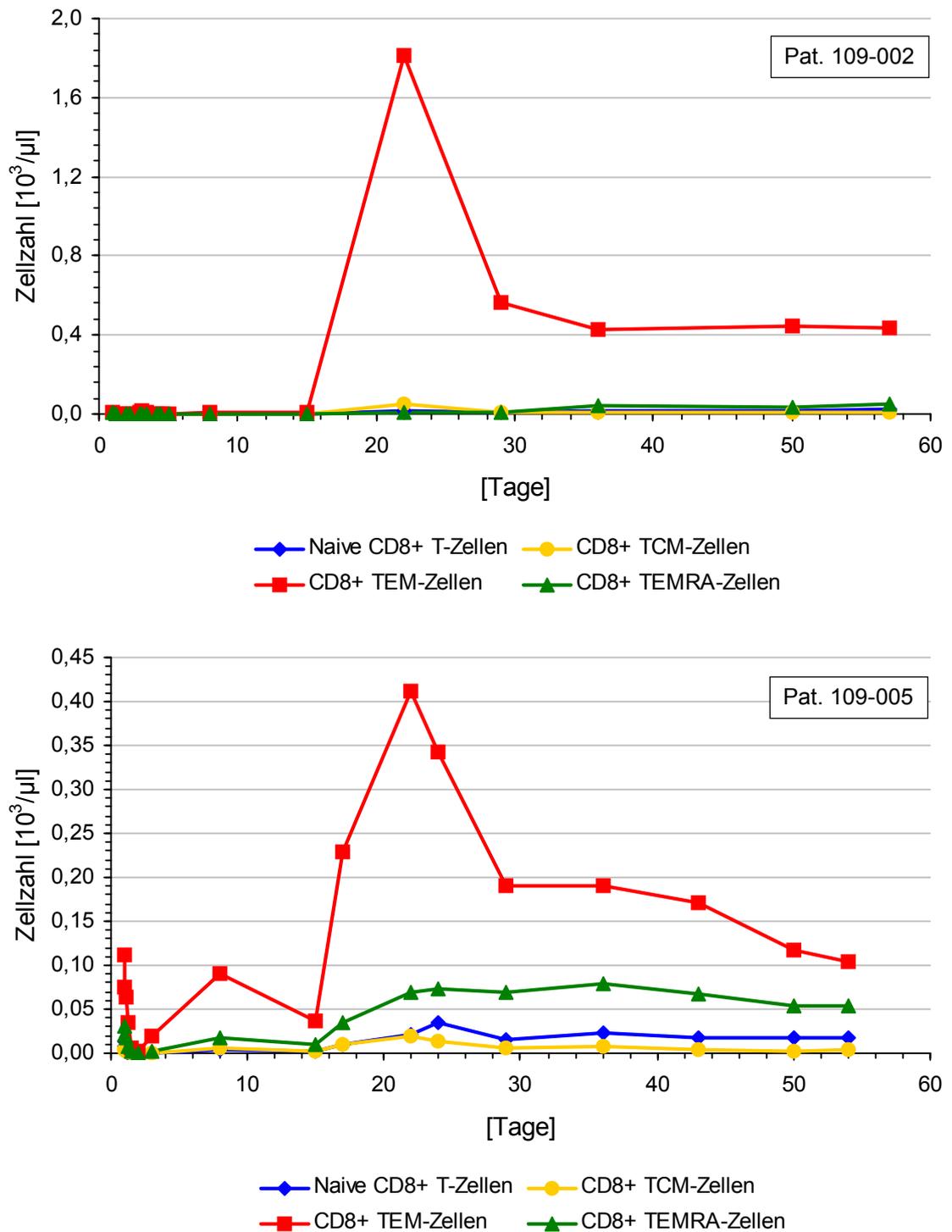


**Abb. 3.10. Expansion der  $CD8^+$  T-Zellen in der dritten Therapiwoche.** Dargestellt sind drei repräsentative Patienten mit 4- (Pat. 101-002) bzw. 8-wöchiger Behandlungsdauer (Pat. 109-002 und 109-005).

Anwesenheit von MT103 ein Rückgang der CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl auf das jeweilige Ausgangsniveau. Zwar kam es bei einigen Patienten mit 8-wöchiger Behandlungsdauer auch in der zweiten Therapiehälfte zu einer erneuten Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber diese Expansion fiel im Vergleich zu den Effekten in der dritten und vierten Woche deutlich geringer aus. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion unabhängig von der Behandlungsdauer vorwiegend in der dritten Therapiewoche stattfand und durch MT103 nicht entscheidend verlängert werden konnte. Eine anfänglich große CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl im peripheren Blut begünstigte wahrscheinlich die Expansion während der Behandlung, war jedoch nicht unbedingt erforderlich, da die Expansion hauptsächlich in den Tumorkläsionen ablief und daher von der dort vorliegenden Zellzahl abhängig war. So konnten z.B. bei Patient 109-002 zu Behandlungsbeginn fast keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Zirkulation detektiert werden, aber nach der Tumorkläyse in der dritten Woche erreichten sie eine der höchsten bisher gemessenen CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen überhaupt. Damit ist auch gezeigt, dass die im peripheren Blut beobachtbaren Effekte nicht notwendig für effiziente T-Zell-Reaktionen in den Tumorkläsionen sind.

### **3.6.2. CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen bilden das für die Expansion verantwortliche CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subset**

Die Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der dritten Behandlungswoche bestätigte den Wirkmechanismus von MT103, der auf der Aktivierung und Zytotoxizität von BiTE-stimulierten T-Zellen beruht. Um das zytotoxische Potential genauer zuordnen zu können, wurde die Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer jeweiligen T-Zell-Subsets untersucht. Nach dem Modell der linearen T-Zell-Differenzierung sollte die Expansion vorwiegend von den proliferationskompetenten T<sub>CM</sub><sup>-</sup> und T<sub>EM</sub><sup>-</sup> Subsets ausgehen<sup>41</sup>. Dagegen würde man erwarten, dass die Zahl der T<sub>EMRA</sub>-Zellen relativ konstant bliebe, da dieses T-Zell-Subset entweder nicht proliferiert oder dabei in T<sub>EM</sub>-Zellen übergeht<sup>45</sup>. Allerdings sind T<sub>EMRA</sub>-Zellen aufgrund ihres großen zytotoxischen Potentials<sup>43</sup> in Zusammenhang mit einem möglichen klinischen Ansprechen auf die MT103-Therapie zu beachten. In Abbildung 3.11. ist die Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subsets der Patienten 109-002 und

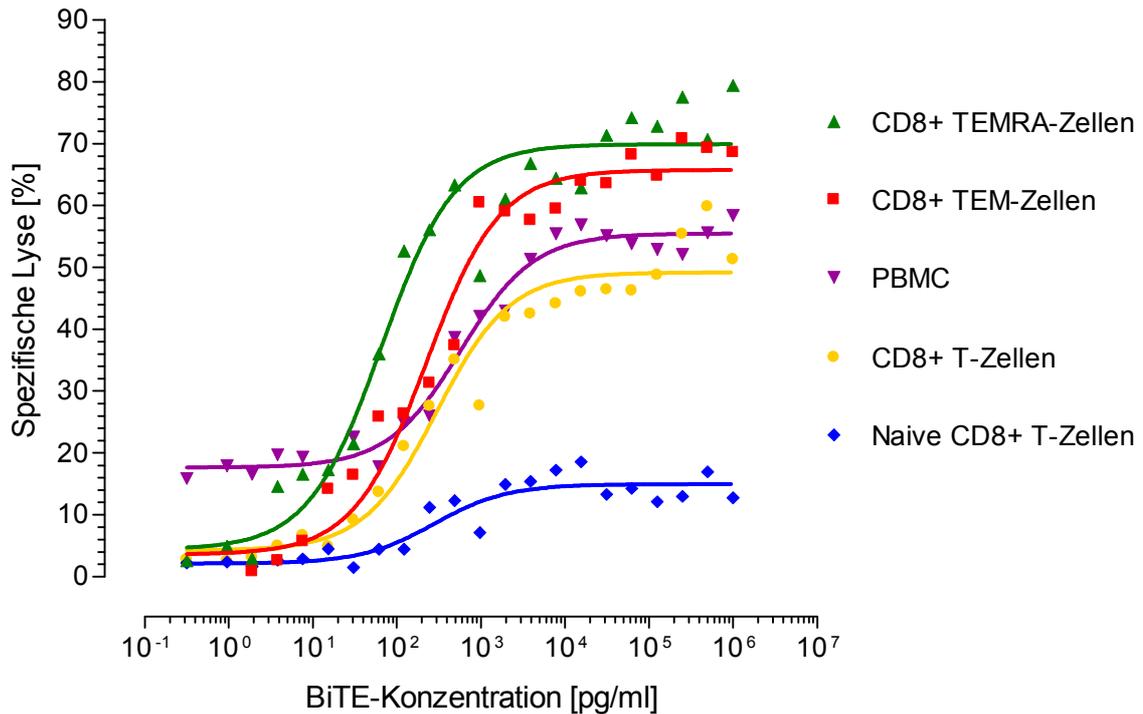


**Abb. 3.11. Präferentielle Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen.** Dargestellt sind jeweils die Verläufe der drei CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zell-Subsets und der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen von zwei repräsentativen Patienten mit 8-wöchiger Behandlungsdauer. Der Vergleich mit Abbildung 3.10. zeigt, dass eine Korrelation zwischen dem entsprechenden Verlauf der Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dem der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen besteht, d.h. Expansion bzw. Kontraktion sowie die absoluten Zellzahlen sind nahezu identisch. Die zwei anderen CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zell-Subsets und die naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen dagegen bei der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion nur eine untergeordnete Rolle.

109-005 dargestellt. Der direkte Vergleich mit den Verläufen in Abbildung 3.10. zeigte, dass die Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nahezu ausschließlich auf die zeitgleiche Zunahme der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen zurückzuführen war. Während diese signifikante Korrelation bei ca. 85% der Patienten festgestellt wurde, expandierten in ca. 15% der Fälle die CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub>-Zellen stärker als das CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subset (Daten nicht gezeigt). Allerdings war dieser Effekt teilweise auch durch die schlechte gegenseitige Abgrenzung der beiden Subsets durch den Marker CD45RA bedingt. Naive T-Zellen spielten bei der Expansion keine Rolle, da sie dafür neben dem BiTE-vermittelten TCR-Signal auch noch ein co-stimulatorisches Signal bräuchten. Außerdem konnte eine deutliche Expansion des T<sub>CM</sub>-Subsets nur bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden; diese machte dort jedoch zum Teil bis zu 50% der gesamten Zunahme aus (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist damit ein Hinweis auf den eher regulatorischen als zytotoxischen Charakter der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegeben, wenn sie nach der BiTE-vermittelten Aktivierung weniger Effektorzellen als die CD8<sup>+</sup> T-Zellen bilden. Generell lässt sich aber sagen, dass die unter MT103-Therapie aufgetretene T-Zell-Expansion, insbesondere der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, auf den Zuwachs des T<sub>EM</sub>-Subsets zurückzuführen war.

### 3.6.3. CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen besitzen ein großes zytotoxisches Potential

Aufgrund der starken Expansion des CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subsets stellte sich die Frage, inwiefern diese Zellen für die klinische Wirksamkeit von MT103 verantwortlich waren. Um das zytotoxische Potential der einzelnen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subsets *in vitro* zu bestimmen, wurden diese aus Vollblut von gesunden Spendern aufgereinigt und anschließend in einen Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub>-Zellen über das größte zytotoxische Potential verfügten, gefolgt von den CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen (Abb. 3.12.). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass insbesondere CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub>-Zellen bereits im nicht-aktivierten Zustand große Mengen Perforin und Granzyme B gespeichert haben<sup>43</sup>. Beide Subsets wiesen eine deutlich höhere Zytotoxizität als die nicht-aufgetrennten Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Dies spiegelte sich sowohl in der vergleichsweise größeren maximalen spezifischen Lyse (70% bzw. 66% vs. 48%) als auch im kleineren EC<sub>50</sub>-Wert wider



**Abb. 3.12.** BiTE-vermittelte *in vitro* Zytotoxizität der angegebenen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subsets, der Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der nicht-aufgetrennten PBMC. Ein großes zytotoxisches Potential ist sowohl durch eine große maximale spezifische Lyse als auch durch einen kleinen EC<sub>50</sub>-Wert gekennzeichnet.

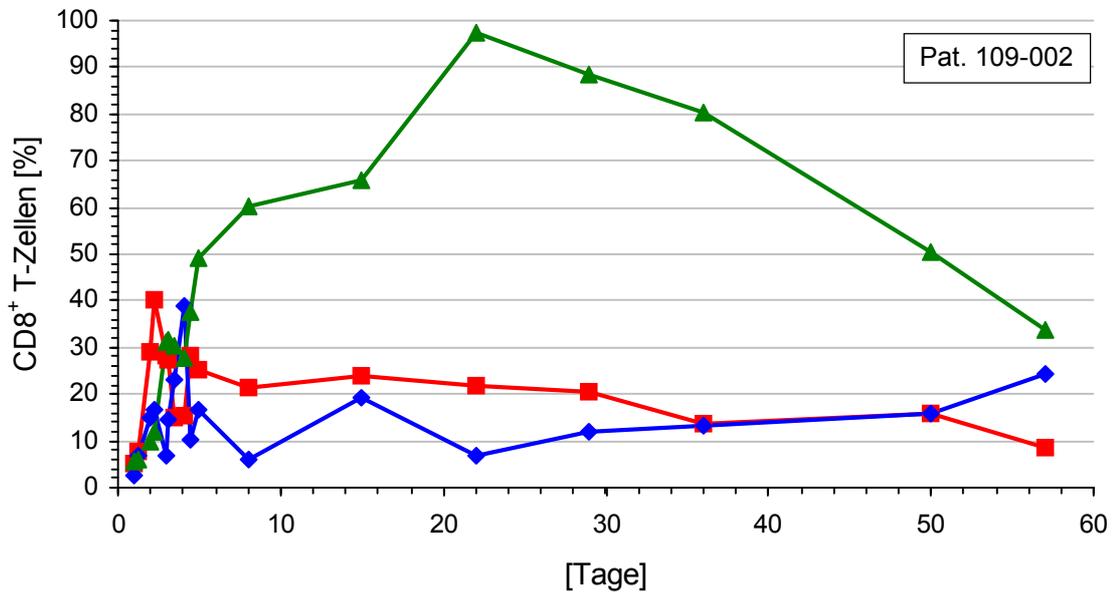
( $0,7 \cdot 10^2$  pg/ml bzw.  $2,3 \cdot 10^2$  pg/ml vs.  $3,2 \cdot 10^2$  pg/ml). Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen besaßen dagegen fast kein zytotoxisches Potential; d.h. je nach Größe ihres Anteils an den CD8<sup>+</sup> T-Zellen würden sie also deren Gesamt-Zytotoxizität reduzieren. Da jedoch bei den meisten Patienten nur wenige naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert wurden, und zudem die Zahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen weitgehend der der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen entsprach, konnte das zytotoxische Potential der Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen dem des CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subsets gleichgesetzt werden. Damit stellten die selektive Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen sowie ihre große Zytotoxizität wichtige Voraussetzungen für die klinische Wirksamkeit von MT103 dar.

### 3.6.4. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung während der Effektorphase

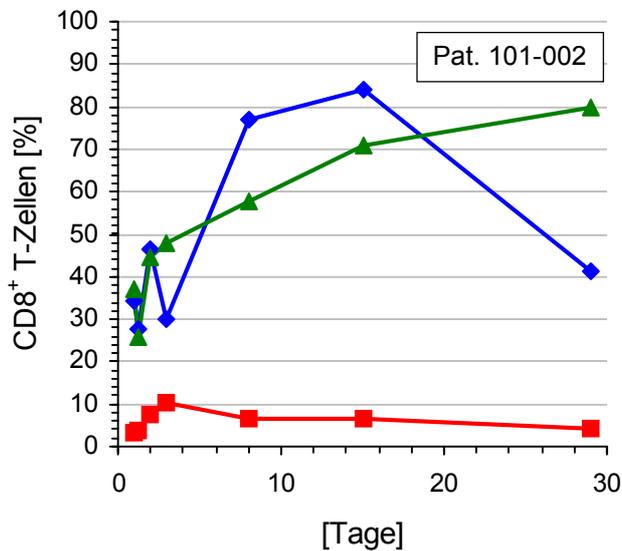
Im Gegensatz zur Einstiegsphase (siehe Kapitel 3.5.3.) spielte der Aktivierungsmarker CD69 in der Effektorphase keine Rolle. Nach dem schnellen Anstieg der CD69-Expression unmittelbar nach Infusionsbeginn und dem noch während der ersten Behandlungswoche folgenden Rückgang auf das ursprüngliche Niveau traten unabhängig von der weiteren Therapiedauer meist keine zusätzlichen Maxima auf. Diese kurzzeitige Erhöhung der CD69-Expression war wahrscheinlich auf die Änderung der BiTE-vermittelten T-Zell-Stimulierung bis zum Erreichen des *steady state* zurückzuführen. Dagegen zeigte die konstante Stimulierung während der Effektorphase keine Auswirkungen auf die CD69-Expression. Erst nach einer Behandlungspause, in der die T-Zell-Aktivierung quasi zurückgesetzt wurde, kam es bei erneuter Stimulierung wieder zu einer transient erhöhten CD69-Expression (Daten nicht gezeigt).

In der Effektorphase waren insbesondere die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR von Bedeutung (Abb. 3.13.). Gegen Ende der ersten bzw. zu Beginn der zweiten Behandlungswoche exprimierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt CD25. Erst diese  $\alpha$ -Kette bildet gemeinsam mit der konstitutiv exprimierten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette den funktionellen IL-2-Rezeptor, der es T-Zellen ermöglicht, den autokrin sezernierten Wachstumsfaktor IL-2 zu binden und anschließend zu proliferieren<sup>60</sup>. Dies erklärt auch, warum das Maximum der CD25-Expression vor der eigentlichen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion auftrat und die CD25-Expression zum Zeitpunkt der im peripheren Blut detektierbaren Expansion in der dritten Behandlungswoche bereits wieder rückläufig war. Im Gegensatz dazu zeigte die HLA-DR-Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen weitgehend kongruenten Verlauf zur CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion (Abb. 3.13.). Insbesondere die Maxima dieses langfristigen Aktivierungsmarkers und der entsprechenden Expansion fielen zusammen (vgl. Abb. 3.10.: Pat. 109-002 Tag 22 und Patient 101-002 Tag 29). Dabei deutete der zwischen 80% und 100% liegende Anteil an HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf eine effiziente und dauerhafte T-Zell-Aktivierung durch MT103 zu diesem Zeitpunkt der Behandlung hin. Weiterhin unterstützte diese Beobachtung die Aussage, dass die für die Expansion verantwortlichen CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen ein großes zytotoxisches Potential besitzen. Damit lieferte

die Analyse der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR in der Effektorphase auch einen wichtigen Hinweis auf die klinische Aktivität von MT103.



■ CD69+CD8+ / CD8+ T-Zellen    ◆ CD25+CD8+ / CD8+ T-Zellen  
▲ HLA-DR+CD8+ / CD8+ T-Zellen

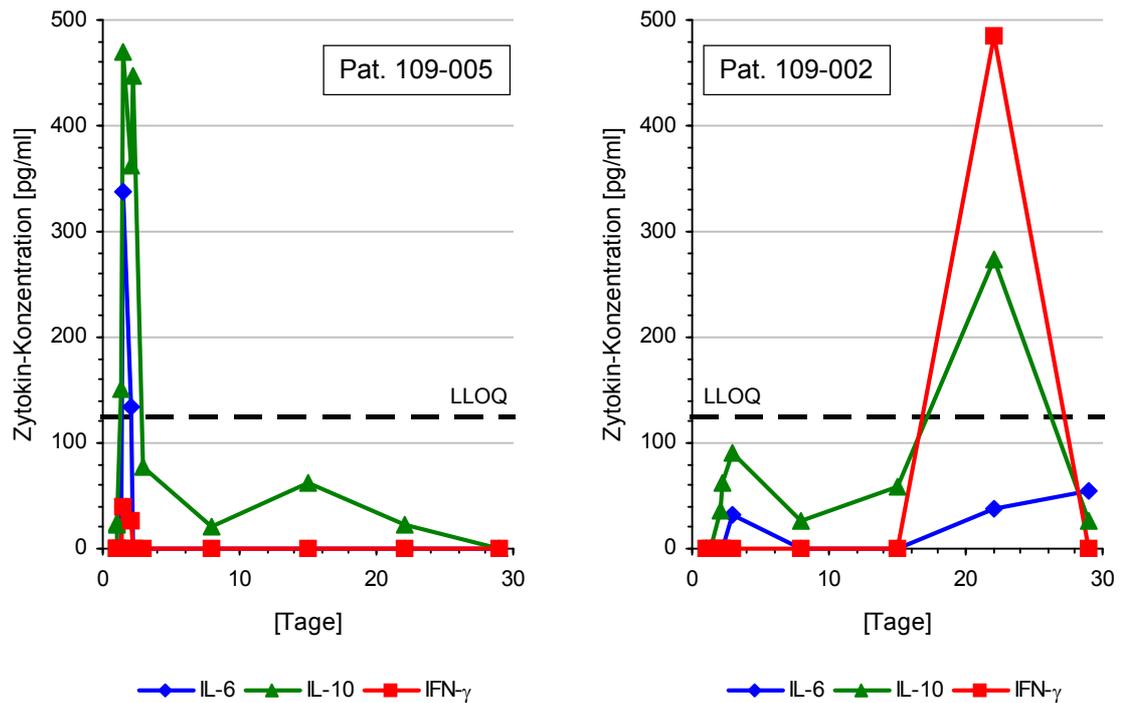


■ CD69+CD8+ / CD8+ T-Zellen  
◆ CD25+CD8+ / CD8+ T-Zellen  
▲ HLA-DR+CD8+ / CD8+ T-Zellen

**Abb. 3.13. Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und HLA-DR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Effektorphase.** Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellen von je einem repräsentativen Patienten mit 4- (unten) bzw. 8-wöchiger Behandlungsdauer (oben).

### 3.6.5. T-Zell-assoziierte Zytokin-Sekretion

Um den Zusammenhang zwischen der MT103-induzierten Zytokin-Ausschüttung durch aktivierte T-Zellen einerseits und den T-Zell-Reaktionen, aber auch möglichen Nebenwirkungen zu Behandlungsbeginn andererseits beurteilen zu können, wurden die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu definierten Zeitpunkten gemessen. Bei den Patienten der Kohorten 1 bis 2 *min* war keine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Zytokine möglich, da die Konzentrationen ausnahmslos unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Dies könnte einerseits auf die sehr niedrige MT103-Dosis dieser Kohorten zurückzuführen sein, andererseits aber auch auf die anfangs eingesetzte hohe Methylprednisolon-Dosis, die gerade zu Behandlungsbeginn die T-Zell-Aktivierung und damit die Zytokin-Ausschüttung unterdrückte. Bei den Patienten der Kohorten 3 bis 4 *flat* konnten die oben genannten Zytokine teilweise im Serum detektiert werden. Allerdings lagen nur die Konzentrationen von IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  signifikant über der Nachweisgrenze und lieferten daher aussagekräftige Verläufe. Wie anhand von Patient 109-005 exemplarisch dargestellt, wurde IL-10 überwiegend zu Behandlungsbeginn ausgeschüttet (Abb. 3.14.). Die innerhalb von 12 h bis 24 h erreichte maximale Serumkonzentration lag zwischen 160 pg/ml und 1531 pg/ml und fiel in den folgenden 48 h wieder unter die Nachweisgrenze. IL-6 zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf, wenn auch bei weniger Patienten und in abgeschwächter Form mit Maximalwerten zwischen 223 pg/ml und 365 pg/ml (Abb. 3.14.). Diese Verläufe korrelierten in der Einstiegsphase mit denen des Aktivierungsmarkers CD69 und des Adhäsionsmoleküls LFA-1 und sind auf die simultane, starke T-Zell-Aktivierung zu Behandlungsbeginn zurückzuführen. Möglicherweise wird das hemmende Zytokin IL-10 in einer negativen Rückkopplungsschleife ausgeschüttet, um ein Überschießen der initialen T-Zell-Reaktion zu verhindern. IL-10 könnte aber auch durch die Glucocorticoid-Prämedikation induziert worden sein. In der nachfolgenden Effektorphase spielte IL-10 nur eine untergeordnete Rolle, so dass die für die Eliminierung der B-Zellen notwendige T-Zell-Aktivität nicht gehemmt wurde. Vielmehr konnte in dieser Behandlungsphase bei mehreren Patienten das pro-inflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  detektiert werden, das dabei maximale Serumkonzentrationen zwischen 129 pg/ml und 740 pg/ml erreichte. So zeigte der IFN- $\gamma$ -

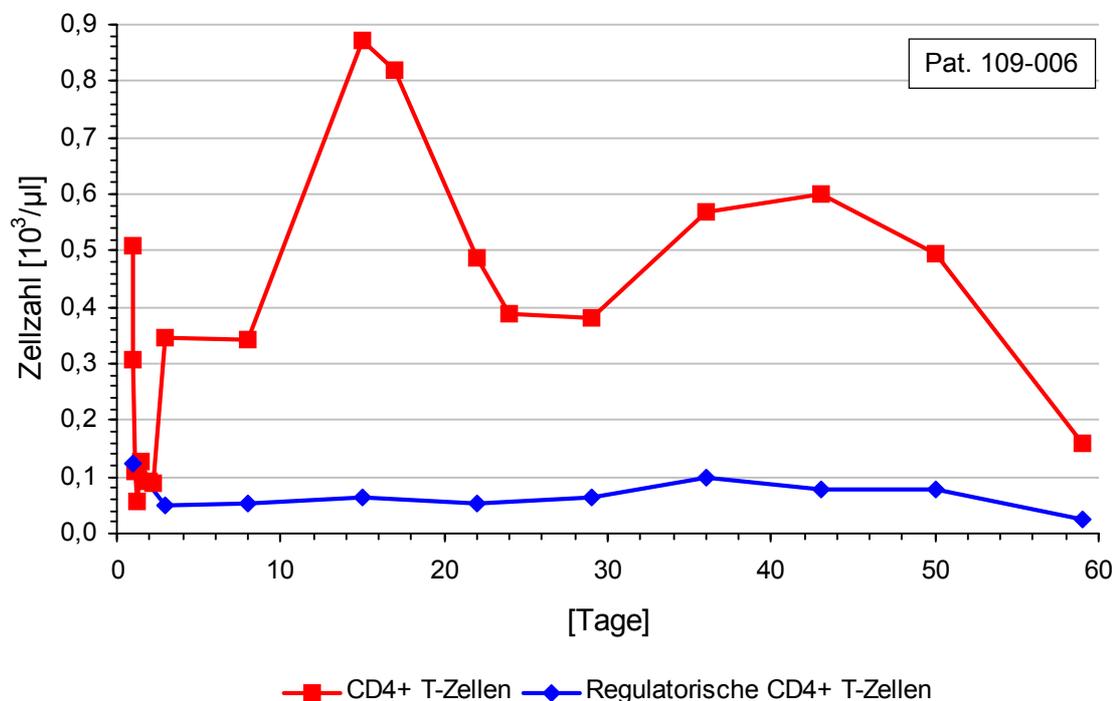


**Abb. 3.14. Sekretion der T-Zell-assoziierten Zytokine IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$ .** Dargestellt sind die Verläufe der jeweiligen Serumkonzentration von zwei repräsentativen Patienten mit 8-wöchiger Behandlungsdauer. Da die Zytokin-Konzentrationen in der zweiten Therapiehälfte durchgängig unterhalb der Nachweisgrenze lagen, sind nur die Verläufe bis einschließlich Tag 29 gezeigt.

Verlauf bei Patient 109-002 an Tag 22 ein Maximum (Abb. 3.14.), das genau mit der bei diesem Patienten beobachteten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion und -Aktivierung zusammenfiel (siehe Kapitel 3.6.1. und 3.6.4.). IFN- $\gamma$  aktiviert u.a. Makrophagen, Tumorzellen zu phagozytieren<sup>61</sup>, und unterstützt damit die BiTE-vermittelte Tumolyse durch T-Zellen. Die Korrelation zwischen simultaner T-Zell-Expansion, Aktivierung sowie Zytokin-Sekretion einerseits und der Depletion der malignen B-Zellen andererseits untermauerte *in vivo* den hocheffizienten Wirkmechanismus des BiTE-Moleküls MT103.

### 3.6.6. Regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind an der T-Zell-Expansion nicht beteiligt

Eine Population des adaptiven Immunsystems, die die zytotoxische Aktivität der T-Zellen beeinflussen könnte und daher bei der Aufklärung des Wirkmechanismus von MT103 zu berücksichtigen war, bildeten die regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen). Diese Zellen, deren natürliche Funktion in der Supprimierung autoreaktiver T-Zellen besteht<sup>62</sup>, könnten auch die Effizienz der BiTE-vermittelten Tumorlyse reduzieren. Neben dem inhibierenden Effekt ist bekannt, dass CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen *in vitro* ein sehr geringes Potential besitzen, zu proliferieren<sup>62</sup>. Dies wird teilweise durch die für CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen charakteristische, konstitutiv hohe CD25-Expression kompensiert, die eine effiziente Bindung des Wachstumsfaktors IL-2 ermöglicht. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen *in vivo* durchaus proliferationskompetent sein können<sup>63</sup>. Da eine funktionelle Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen aus den Blutproben nicht möglich war, wurde ab Kohorte 4



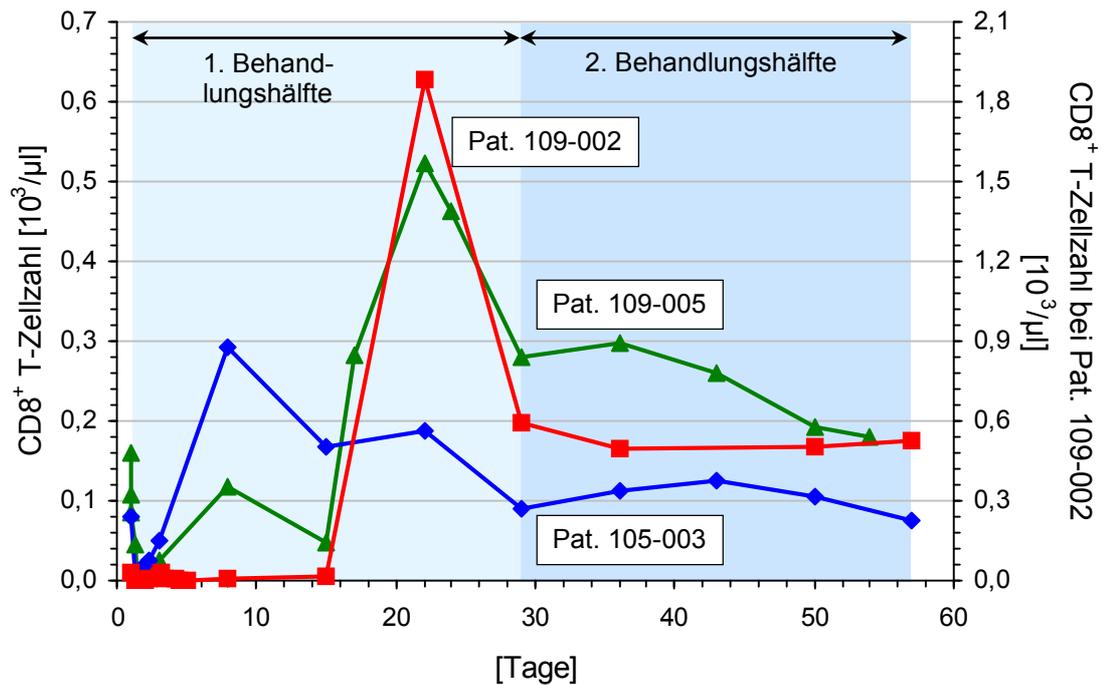
**Abb. 3.15. Zeitlicher Verlauf der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber dem der CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Subpopulation.** Während der 8-wöchigen Behandlung des repräsentativen Patienten 109-006 blieben die CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen auf ihrem ursprünglichen, niedrigen Niveau und zeigten insbesondere keine Expansion.

*ramp* zumindest der Verlauf ihrer Zellzahl während der MT103-Therapie bestimmt und mit dem der Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen. Dabei konnte entgegen der bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen evidenten Expansions- und Kontraktionseffekte bei keinem Patienten eine simultane Zunahme der CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Subpopulation beobachtet werden (Abb. 3.15.). Vielmehr blieb deren Zellzahl weitgehend konstant auf dem bereits vor Infusionsbeginn existenten, niedrigen Ausgangswert. Daher führte die Stimulierung durch MT103 wahrscheinlich nicht zur Aktivierung und Proliferation der potentiell supprimierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bereits in den Tumorkläsionen vorhandene CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen negativ auf die BiTE-induzierten Effektormechanismen auswirkten. Die geringe Anzahl der im peripheren Blut nachweisbaren CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen sowie die effiziente Aktivierung und Expansion der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Kapitel 3.6.4. und 3.6.1.) sprechen jedoch gegen einen signifikanten inhibierenden Einfluss der CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen auf die BiTE-vermittelte Tumorklyse.

## 3.7. Klinische Implikationen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Daten

### 3.7.1. Länge eines Behandlungszyklus

Neben der nebenwirkungsarmen Einstiegsvariante *flat* (siehe Abschnitt 3.5.) ließen sich aus den CD8<sup>+</sup> T-Zell-Verläufen weitere Erkenntnisse zum Design der MT103-Therapie ableiten, um die klinische Applikation zu optimieren und damit den Nutzen für die Patienten zu maximieren. In bezug auf die Länge eines Behandlungszyklus wird in der Krebstherapie allgemein davon ausgegangen, dass – abgesehen von der Entstehung von Resistenzen – die Dauer direkt mit der Effizienz korreliert. Daher hatten Patienten, die nach 4-wöchiger Behandlung mindestens eine *Stable Disease* erreichten, die Option, die MT103-Therapie weitere 4 Wochen fortzusetzen. Danach musste eine mindestens 4-wöchige Pause erfolgen, bevor mit einem zusätzlichen Behandlungszyklus begonnen werden konnte. Da die Verlängerungsoption in vielen Fällen ausgenutzt wurde, dauerte ein Behandlungszyklus dann insgesamt 8 Wochen. Allerdings stellte sich die Frage, ob sich das Konzept „je länger, desto effizienter“ ohne weiteres auf die MT103-Therapie



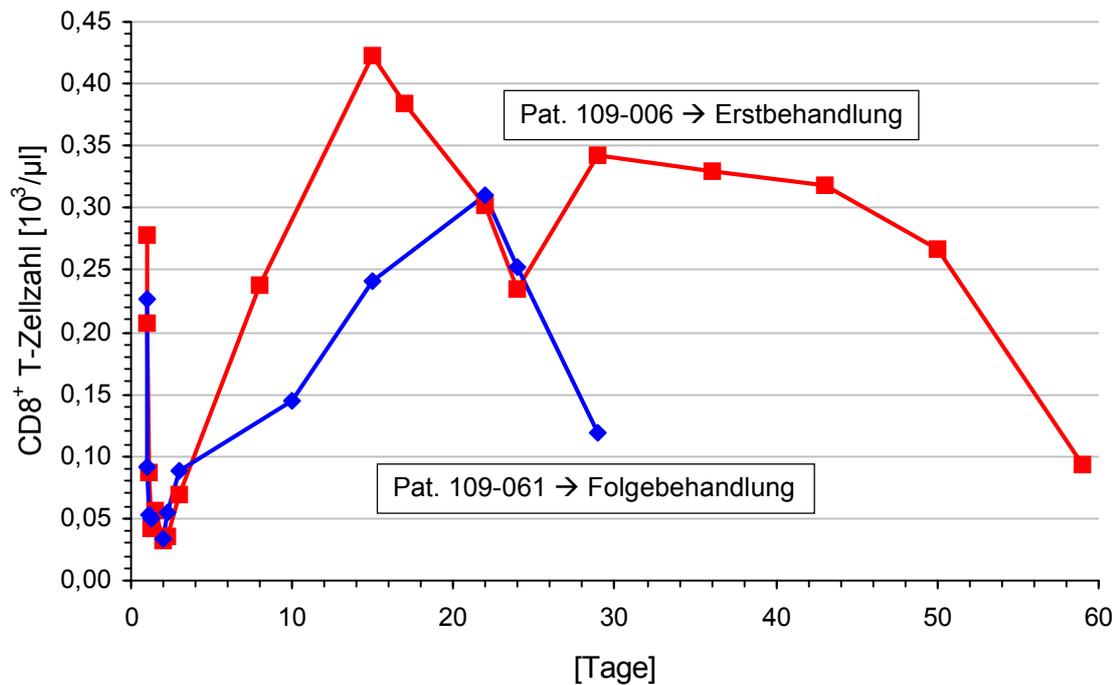
**Abb. 3.16. Reduzierte T-Zell-Aktivität in der zweiten Hälfte eines 8-wöchigen Behandlungszyklus.** Dargestellt ist jeweils der Verlauf der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von drei repräsentativen Patienten, deren MT103-Therapie um 4 Wochen verlängert wurde. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Expansion findet überwiegend zwischen Tag 8 und 22 statt, wohingegen der Zeitraum zwischen Tag 22 und 57 von Kontraktion und Homöostase der CD8<sup>+</sup> T-Zellen geprägt ist.

übertragen lässt, deren Wirksamkeit funktionale zytotoxische T-Zellen voraussetzt. Dazu wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Verläufe und die klinischen Ergebnisse von Patienten mit 8-wöchiger Behandlungsdauer betrachtet (Abb. 3.16.). Wie in Kapitel 3.6.1. ausführlich dargestellt wurde, kam es vorwiegend in der dritten Therapiewoche zur Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die auf die Proliferation des zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subsets zurückzuführen war (siehe Kapitel 3.6.2.). Am Ende der vierten Behandlungswoche fiel jedoch bei mehr als 80% der Patienten die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl wieder auf den jeweiligen Ausgangswert und stagnierte während der weiteren 4-wöchigen Behandlung auf diesem Niveau. Trotz der vorhandenen Stimulierung durch MT103 fand also keine erneute T-Zell-Expansion statt. Auch die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen war in der zweiten Behandlungshälfte rückläufig bzw. sehr niedrig (siehe Abb. 3.13. Patient 109-002). Damit lieferten die repräsentativen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Daten keinen Hinweis auf eine starke T-Zell-Aktivität zwischen Tag 29 und 57 der 8-wöchigen Behandlung. Diese Beobachtung wurde außerdem durch den klinischen Befund unterstützt, dass die Tumorgroße (bei einem Ansprechen auf die MT103-Therapie) in der zweiten Be-

handlungshälfte nur noch geringfügig reduziert wurde (siehe Kapitel 3.7.3.). Sowohl die immunologischen als auch die klinischen Ergebnisse zeigten keinen eindeutigen Nutzen eines verlängerten 8-wöchigen Behandlungszyklus, so dass aufgrund der vorliegenden Arbeit eine 4-wöchige Zyklusdauer vorgeschlagen wird.

### 3.7.2. Länge der Pause zwischen zwei Behandlungszyklen

Neben der Zyklusdauer (siehe Kapitel 3.7.1.) stellt die Länge der Pause zwischen zwei Behandlungszyklen einen weiteren wichtigen Faktor für die optimale Gestaltung der MT103-Therapie dar. Ähnlich einer sekundären Immunantwort sollte dabei das Ziel sein, bei einer Folgebehandlung eine schnellere und stärkere T-Zell-Reaktion als bei einer vorangegangenen (Erst-) Behandlung zu induzieren. Für die Beurteilung dieser Fragestellung konnten zwei Fälle aus der laufenden Studie herangezogen werden. Patienten, die nach einem Behandlungszyklus mindestens eine *Stable Disease* erreichten, hatten die Option, nach einer mindestens 4-wöchigen Pause einen weiteren Zyklus zu erhalten. Ein solches *Additional Treatment* wurde bei Patient 109-006 durchgeführt; es bestand aus einem zusätzlichen 4-wöchigen Behandlungszyklus nach einer 6-wöchigen Pause. Damit handelte es sich um eine vergleichsweise lange Unterbrechung nach der 8-wöchigen Erstbehandlung. Der Vergleich zwischen der Erst- und der Folgebehandlung zeigte bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellverläufen dieses Patienten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.17.). In beiden Fällen kam es nach dem schnellen anfänglichen Verschwinden der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Zirkulation zur Rückkehr und einer mäßigen Expansion in der zweiten und dritten Behandlungswoche; in der vierten Woche folgte dann ein Rückgang auf den jeweiligen Ausgangswert. Während des ersten Behandlungszyklus expandierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen um 52% von 278 Zellen/ $\mu$ l (Vorwert) auf 422 Zellen/ $\mu$ l (Tag 15). Beim zweiten Zyklus nahm die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl von 226 Zellen/ $\mu$ l (Vorwert) auf 310 Zellen/ $\mu$ l (Tag 22) zu; das entspricht einer prozentualen Steigerung von 37%. Die insgesamt etwas langsamere und schwächere Expansion beim *Additional Treatment* ist wahrscheinlich auf die durch die Erstbehandlung bereits reduzierte Tumormasse zurückzuführen, die damit eine kleinere Aktivierungsmatrix bot. Prinzipiell verliefen jedoch die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen bei

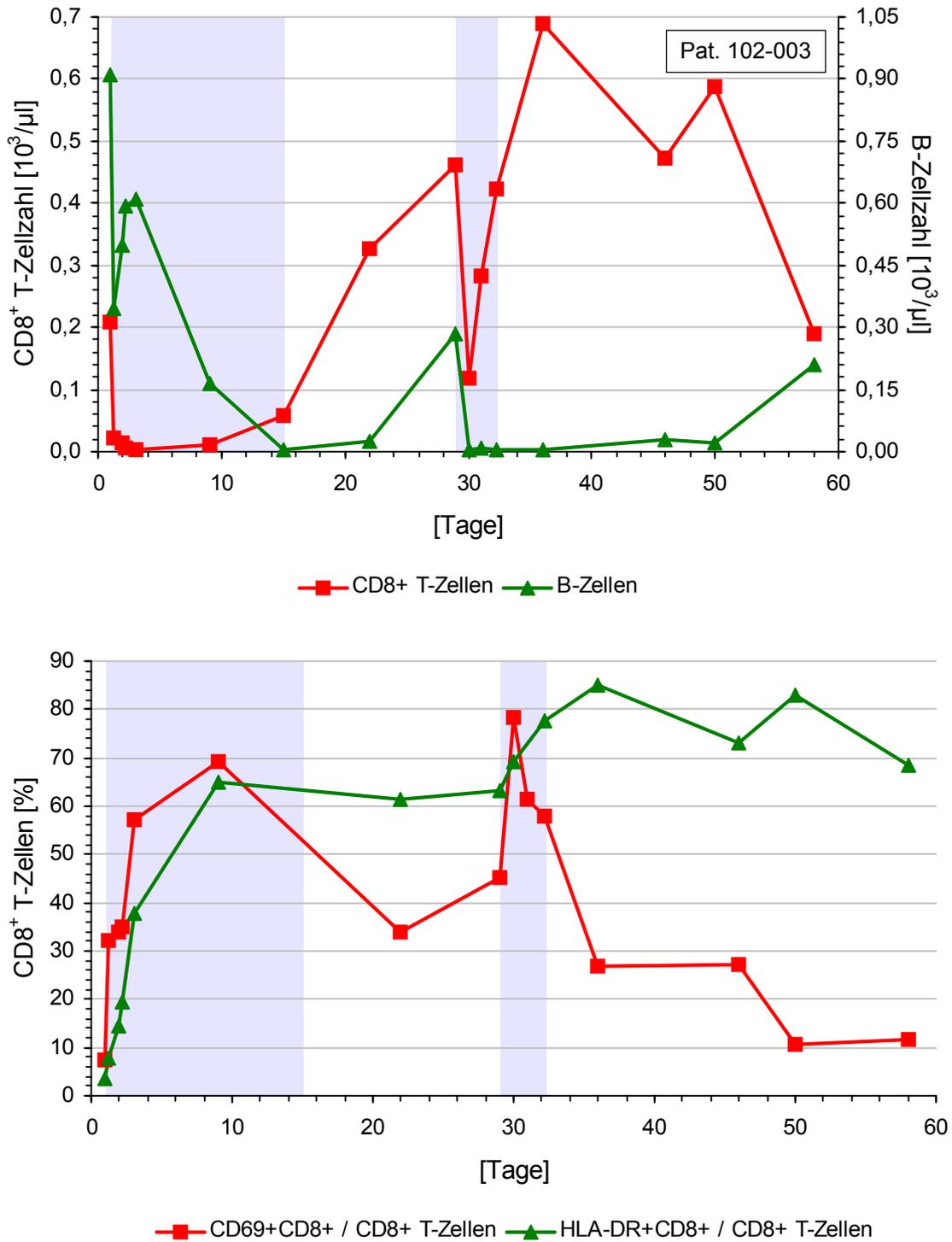


**Abb. 3.17. Keine verstärkte T-Zell-Antwort bei der Folgebehandlung nach einer 6-wöchigen Pause zwischen den beiden Behandlungszyklen.** Dargestellt ist der Verlauf der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der 8-wöchigen Erst- und der 4-wöchigen Folgebehandlung von Patient 109-006. Für das *Additional Treatment* erhielt der Patient die Nummer 109-061.

beiden Behandlungszyklen auf einem absolut wie prozentual analogen Niveau; insbesondere konnte unter diesen Voraussetzungen bei der Folgebehandlung kein Verstärkungseffekt beobachtet werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die BiTE-induzierte T-Zell-Antwort durch die relativ lange Pause wieder vollständig in den Grundzustand zurückgesetzt wurde. Bei dem zweiten Behandlungszyklus stimmten dann sowohl der Verlauf als auch die Amplitude der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Reaktionen weitgehend mit denen des ersten Zyklus überein.

Dieser Fall zeigte, dass eine 6-wöchige Pause zu lang war, um bei einer Folgebehandlung eine schnellere und stärkere T-Zell-Antwort zu erzielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwar kein weiteres *Additional Treatment* durchgeführt, aber der Therapieverlauf von Patient 102-003 lieferte ebenfalls Hinweise auf die richtige Länge der Behandlungspause. Dieser Patient wurde zunächst 2 Wochen behandelt, bevor die MT103-Infusion aufgrund stark erhöhter Leberwerte unterbrochen werden musste. Nach einer 2-wöchigen Pause hatten sich diese soweit normalisiert, dass der Patient weitere 3½ Tage behandelt werden konnte. Damit lag ein vergleichsweise kurzer Zeitraum zwischen den beiden Behandlungsab-

schnitten. Während des ersten Abschnitts verschwanden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb von 48 h vollständig aus der Zirkulation und kehrten näherungsweise erst an Tag 19 auf ihr ursprüngliches Niveau (209 Zellen/ $\mu$ l) zurück (Abb. 3.18.). Diese T-Zell-Kinetik beruhte auf der anfänglich sehr großen B-Zellzahl im peripheren Blut, die die frühere Rückkehr der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Zirkulation wahrscheinlich verhinderte (siehe Kapitel 3.5.1.). Bis zum Ende der Behandlungspause führten die Expansion und damit verbundene Umverteilungseffekte zu einer Zunahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl im peripheren Blut auf 461 Zellen/ $\mu$ l. Zu diesem Zeitpunkt konnten auch wieder B-Zellen im Blut nachgewiesen werden. Beim *Restart* der MT103-Behandlung an Tag 29 verschwanden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen erneut sehr rasch aus der Zirkulation und fielen dabei innerhalb von 24 h auf ein Minimum von 117 Zellen/ $\mu$ l. Im Gegensatz zum ersten Behandlungsabschnitt kehrten sie jedoch viel schneller zurück; so erreichte die Zellzahl bereits am Ende des zweiten Abschnitts an Tag 32½ wieder den entsprechenden Ausgangswert. Anschließend folgte bis Tag 36 eine Expansion auf ein Behandlungsmaximum von 689 Zellen/ $\mu$ l. Damit zeigte sich, dass beim *Restart* sowohl die Kinetik des Verschwindens der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (24 h vs. 48 h) als auch die ihrer Rückkehr auf das jeweilige Ursprungsniveau (2½ Tage vs. 16 Tage) deutlich schneller ablief. Außerdem war die Expansion, bezogen auf die dafür benötigte Zeit, nach dem zweiten Behandlungsabschnitt stärker (65 Zellen/( $\mu$ l\*Tag) vs. 25 Zellen/( $\mu$ l\*Tag)). Neben dem Zellverlauf deutete auch die Expression der Aktivierungsmarker auf eine effektivere CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im zweiten Behandlungsabschnitt hin (Abb. 3.18.). CD69 und HLA-DR konnten 7 Tage nach dem ersten Infusionsbeginn auf 69% bzw. 65% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. In der Behandlungspause ging der Anteil an CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf 34% zurück, während der längerfristige Aktivierungsmarker HLA-DR das erreichte Niveau hielt. Beim nachfolgenden *Restart* stiegen die CD69- und HLA-DR-Expression erneut an; sie kamen 1 bzw. 7 Tage nach dem zweiten Infusionsbeginn auf Maximalwerte von 78% bzw. 85%. Damit waren mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert als zu einem vergleichbaren Zeitpunkt im ersten Behandlungsabschnitt. Außerdem ließ sich HLA-DR trotz beendeter MT103-Infusion über die gesamte Nachbeobachtungsphase hinweg auf durchschnittlich 77% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Auch diese hohe und langanhaltende Expression wies auf die Steigerung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung durch eine relativ kurze Pause zwischen zwei Behandlungsabschnitten hin. Ein weiteres Indiz für die verstärkte T-Zell-Reaktivität beim

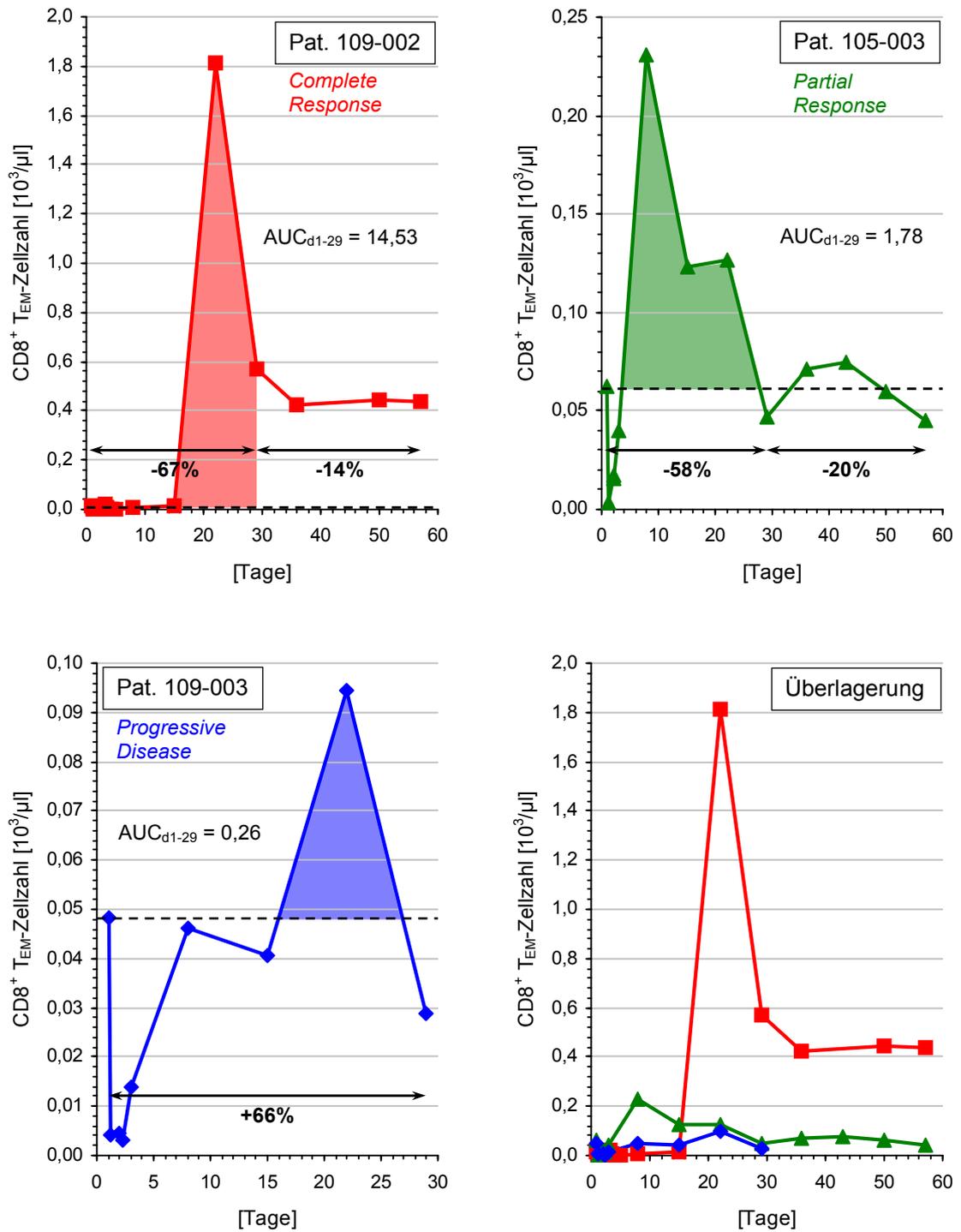


**Abb. 3.18. Verstärkte T-Zell-Antwort beim *Restart* der MT103-Behandlung nach einer 2-wöchigen Pause.** Dargestellt sind die Verläufe der CD8<sup>+</sup> T- und der B-Zellen (oben) sowie die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und HLA-DR auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (unten) von Patient 102-003. Die blau hinterlegten Bereiche markieren die beiden Behandlungsabschnitte, die durch eine 2-wöchige Pause voneinander getrennt waren.

*Restart* lieferte die sehr schnelle und über den eigentlichen Behandlungszeitraum hinausgehende B-Zell-Depletion. Im Gegensatz zu einer langen ( $\geq 4$ -wöchigen) Pause zwischen zwei Behandlungszyklen kann also eine kurze (2-wöchige) Pause die Aktivierung und Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärken und damit die Effizienz der MT103-Behandlung erhöhen. Möglicherweise lässt sich dadurch auch eine Steigerung der T-Zell-Antwort von Zyklus zu Zyklus erzielen.

### **3.7.3. Korrelation zwischen der Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen und der klinischen Wirksamkeit**

Für die Beurteilung der Wirksamkeit der MT103-Therapie war die mittels Computertomographie ermittelte Veränderung der Tumorgroße ausschlaggebend. Dazu wurde die Zu- oder Abnahme des Volumens von 6 befallenen Referenzlymphknoten nach 4 und ggf. 8 Wochen Behandlung bestimmt und in Prozent des Ausgangswerts vor Therapie angegeben. Können Zeitraum und Stärke einer eventuellen Reduktion des Tumorumfanges in Korrelation mit einem Parameter der FACS-Analysen gebracht werden, um neben der klinischen Beurteilung auch einen biologischen Marker für die Effizienz der MT103-Therapie zur Verfügung zu haben? Die Auswertung der FACS-Daten ergab, dass sich dafür insbesondere der Verlauf der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen eignet (Abb. 3.19.). Die drei Patienten 109-003, 105-003 und 109-002 erreichten am jeweiligen Behandlungsende nach 4 bzw. 8 Wochen eine *Progressive Disease*, *Partial Response* bzw. *Complete Response*. Entsprechend dem progredienten Krankheitsverlauf konnte bei Patient 109-003 keine Abnahme des Tumorumfanges festgestellt werden. Bei den anderen zwei Patienten erfolgte die stärkste Reduktion der Tumorgroße in den ersten 4 Wochen der Behandlung: -58% bei Patient 105-003 und -67% bei Patient 109-002. In den zweiten 4 Wochen kam es dagegen nur noch zu einer weiteren Abnahme um -20% bzw. -14%. Damit lag der Schwerpunkt der BiTE-vermittelten Tumolyse innerhalb der ersten 4 Wochen der MT103-Therapie. Dies spiegelte sich auch in den Verläufen der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen der Patienten 105-003 und 109-002 wider. So fand bei diesen beiden Patienten jeweils in den ersten 4 Wochen der Behandlung eine deutliche Expansion des CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subsets statt, die damit zeitlich mit der ausgeprägten Reduktion



**Abb. 3.19. Korrelation zwischen T-Zell-Expansion und Wirksamkeit.** Dargestellt sind die Verläufe der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen der repräsentativen Patienten 109-002, 105-003 und 109-003. Die jeweiligen prozentualen Veränderungen des Tumorzellvolumens sowie das erzielte klinische Gesamtergebnis sind angegeben. Die Überlagerung verdeutlicht die unterschiedlichen Maßstäbe der einzelnen Graphiken. AUC<sub>d1-29</sub>, auf den jeweiligen Ausgangswert bezogene Fläche unter der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zell-Kurve zwischen Tag 1 und 29.

des Tumorzellvolumens zusammenfiel. Dagegen schwankten die CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen in den zweiten 4 Wochen um den Ausgangswert bzw. stagnierten auf einem im Vergleich zur vorangegangenen Expansion deutlich niedrigeren Niveau. Insbesondere kam es nicht zu einer erneuten Expansion, was ebenfalls mit der nur geringen zusätzlichen Abnahme der Tumorzellgröße in diesem Zeitraum korrelierte. Bei Patient 109-003 war die Zunahme der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen generell nur sehr schwach ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die Proliferation dieses zytotoxischen T-Zell-Subsets eine Voraussetzung für die klinische Wirksamkeit der MT103-Therapie bildet. Dabei hängt die Stärke des Ansprechens sowohl von der absoluten CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellzahl als auch von der prozentualen Zunahme gegenüber dem Ausgangswert ab. So erreichte Patient 109-002 nicht nur die höchste CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellzahl während der MT103-Behandlung (1810 Zellen/ $\mu$ l), sondern erzielte auch die größte Steigerung gegenüber dem Wert vor Behandlungsbeginn (Faktor 150). Diese zwei Parameter gingen auch in die Berechnung der *Area under the Curve* (AUC) ein, die der auf den jeweiligen Ausgangswert bezogenen Fläche unter der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zell-Kurve entspricht und ein Maß für die Expansionsstärke darstellt. Die AUC, ermittelt von Tag 1 bis 29, beträgt bei den Patienten 109-003, 105-003 und 109-002 0,26, 1,78 bzw. 14,53. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den entsprechenden klinischen Befunden der Patienten (PD, PR bzw. CR) und unterstreicht die große Bedeutung einer ausgeprägten Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen für die optimale Wirksamkeit von MT103. Insofern scheint die AUC einen biologischen Marker für die Effizienz der MT103-Therapie zu bilden. Dabei besteht eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Zeitpunkt und Stärke der T-Zell-Expansion einerseits und der Reduktion der Tumorzellgröße andererseits, so dass die gemessenen FACS-Daten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des *in vivo* Wirkmechanismus von MT103 liefern.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der Phase I-Studie MT103-104 die Reaktionen des Immunsystems auf die Therapie mit dem BiTE-Molekül MT103 untersucht. Die Behandlung führte bei 68% der auswertbaren Patienten zu einer Krankheitsstabilisierung (SD oder MR), in 14% der Fälle sogar zu einem objektiven klinischen Ansprechen mit einer ausgeprägten Reduktion des Tumorumfanges (PR oder CR). Die dabei aufgetretenen Nebenwirkungen waren leicht bis mittelschwer ausgeprägt, gut kontrollierbar und vollständig reversibel. Nur bei einem Patienten musste die Behandlung aufgrund von Nebenwirkungen mit ZNS-Beteiligung vorzeitig beendet werden. Die MTD wurde in dieser Arbeit jedoch noch nicht erreicht.

Die Analyse der durch MT103 induzierten *in vivo* Effekte erfolgte durch Bestimmung einzelner Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut der Patienten. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass sich die B-NHL vor allem in den Lymphknoten und im Knochenmark manifestieren<sup>5</sup>. Dabei schwemmen einige Subtypen massiv maligne B-Zellen ins Blut aus, während bei anderen Patienten praktisch keine zirkulierenden B-Zellen nachweisbar sind. Auch die gemessenen Parameter der T-Zellen geben nur den Zustand der im Blut vorhandenen Zellen wider, so dass eine lokal begrenzte Aktivierung und Expansion in einem befallenen Lymphknoten unter Umständen nicht oder erst verspätet erfasst wird. Die Validität der FACS-Analysen beruht also auf der Annahme, dass sich aufgrund der Lymphozyten-Rezirkulation ein Gleichgewicht zwischen den Zellzahlen im Blut und denen im lymphatischen System einstellt, so dass beide miteinander korrelieren<sup>64</sup>. Damit können aus den im Blut messbaren Veränderungen indirekt auch Aussagen über entsprechende Effekte in den Lymphknoten und im Knochenmark abgeleitet werden. Umgekehrt ist die Abwesenheit signifikanter Veränderungen im Blut nicht unbedingt gleichbedeutend mit dem Ausbleiben von T-Zell-Reaktionen in den Lymphknoten und im Knochenmark. Insofern sind die im Blut messbaren Effekte hinreichend, aber nicht notwendig für eine Wirkung von MT103 in den vom Lymphom befallenen Regionen. Da zwischen letzterer und dem klinischen Ansprechen ein direkter Zusammenhang besteht, können die im peripheren Blut ge-

messenen Effekte auch als Hinweis auf die klinische Wirksamkeit der MT103-Therapie gewertet werden. Dies bestätigte sich bei der Analyse der Patientendaten. Während Patienten ohne ausgeprägte T-Zell-Expansion progredient waren oder maximal eine SD erreichten, zeigten Patienten mit einer deutlichen T-Zell-Expansion ein klinisches Ansprechen in Abhängigkeit von deren Stärke. Trotzdem sollte bei der Beurteilung der Ergebnisse immer berücksichtigt werden, dass mit Hilfe der FACS-Analytik die durch MT103 induzierten und für das Verständnis des Wirkmechanismus relevanten Effekte nicht direkt in den vom Lymphom befallenen Regionen gemessen werden können.

Für die Diskussion der Sicherheit und Effizienz der MT103-Therapie ist es wichtig, die unterschiedlichen Einstiegsszenarien, die Behandlungsdauer sowie die maßgeblich beteiligten T-Zell-Subpopulationen zu betrachten.

#### **4.1. Einstiegsvarianten in die MT103-Therapie**

Im Verlauf der Studie zeigte sich, dass die Einstiegsphase für die Beurteilung der Verträglichkeit von MT103 eine deutlich größere Rolle spielt als die nachfolgende Effektorphase, da die Mehrzahl der beobachteten Nebenwirkungen unmittelbar zu Behandlungsbeginn auftrat. Sie sind höchstwahrscheinlich auf die MT103-induzierte T-Zell-Aktivierung und das damit verbundene schnelle Verschwinden der T-Zellen aus dem peripheren Blut zurückzuführen. Eine in diesem Zusammenhang diskutierte Zytokin-Ausschüttung kann dagegen als Ursache weitgehend ausgeschlossen werden, da zu Behandlungsbeginn bis auf das immunsupprimierende IL-10 keine Zytokine detektiert werden konnten. Dies liegt auch an der Applikation des Glucocorticoids Methylprednisolon, das die Zytokin-Ausschüttung aktivierter T-Zellen hemmt<sup>65</sup>. Da es in einem Mausmodell bei intraperitonealer Injektion des BiTE-Moleküls MT110 zu starken Zytokin-assoziierten Nebenwirkungen kommt (B. Schlereth, persönliche Kommunikation), ist zumindest bei Vorhandensein von B-Zellen im peripheren Blut eine Steroid-Applikation vor Behandlungsbeginn notwendig, um einen möglichen „Zytokin-Sturm“ zu vermeiden<sup>66</sup>. Im Kontext dieser Steroid-Applikation ist auch zu diskutieren, ob sie für das schnelle Verschwinden der T-Zellen direkt nach Behandlungsbeginn verantwortlich ist<sup>67</sup>. In diesem Fall

sollten die T-Zellen bei allen Patienten nach 2 bis 3 Tagen in die Zirkulation zurückkehren, wenn das Steroid verstoffwechselt und ausgeschieden worden ist. Dies konnte jedoch so nicht beobachtet werden. Vielmehr besteht eine Korrelation zwischen der T-Zell-Rückkehr und der gleichzeitigen Depletion der B-Zellen im peripheren Blut. Letztere kann bei einer großen Tumorlast bis zu 14 Tage in Anspruch nehmen (siehe Abb. 3.18.). Insofern ist wahrscheinlich nicht die Steroid-Applikation, sondern die MT103-induzierte Aktivierung für das schnelle Verschwinden der T-Zellen zu Behandlungsbeginn ausschlaggebend.

Um die zugrundeliegenden Abläufe zu verstehen, muss man zwischen Patienten mit ( $T/B < 2$ ) und solchen ohne B-Zellen ( $T/B \geq 2$ ) im peripheren Blut unterscheiden. Bei ersteren stellen die mit MT103 bedeckten zirkulierenden B-Zellen eine Aktivierungsmatrix für T-Zellen dar. Die simultane Bindung von MT103 an CD3 führt zur Entstehung von *CD3-Clustern*, zur Ausbildung einer immunologischen Synapse sowie zur Signaltransduktion in den Zellkern und damit zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen<sup>51</sup>. Dies äußerte sich u.a. in der erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69, im Übergang des Adhäsionsmoleküls LFA-1 in den *intermediate affinity state* und nachfolgend in der temporären Extravasation der T-Zellen aus dem Blut. Die ausgewanderten T-Zellen kehrten erst in die Zirkulation zurück, als im Blut keine B-Zellen mehr nachweisbar waren, da wahrscheinlich das Lymphom aufgrund des Therapiedrucks zu diesem Zeitpunkt keine B-Zellen mehr ausschwemmte. Dagegen kann MT103 bei Patienten ohne periphere B-Zellen ausschließlich an CD3 auf den zirkulierenden T-Zellen binden. Da die für eine Quervernetzung notwendigen CD19-Moleküle fehlen, kommt es nicht zur Entstehung von *CD3-Clustern* und zur Ausbildung einer immunologischen Synapse<sup>51</sup>. Allerdings löst wahrscheinlich bereits die MT103-Bindung eine Konformationsänderung im zytoplasmatischen Teil von CD3 aus. Diese führt aufgrund der fehlenden *Cluster*-Bildung zwar nicht zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen, kann sich aber durchaus auf das Zytoskelett auswirken. Einerseits existiert nämlich über das Protein Nck eine Verbindung zum intrazellulären Teil von CD3, andererseits ist das Zytoskelett durch das Adapter-Protein Talin an den intrazellulären Teil von LFA-1 gekoppelt<sup>68, 69</sup>. Es ist also vorstellbar, dass die Konformationsänderung im zytoplasmatischen Teil von CD3 eine Konformationsänderung von LFA-1 nach sich zieht, ohne dass daran eine mehrstufige Signaltransduktion wie bei der voll-

ständigen Aktivierung der T-Zellen beteiligt ist. Vielmehr handelt es sich dabei um eine Pseudoaktivierung, die durch eine transient erhöhte Adhäsivität aufgrund des Übergangs von LFA-1 in den *intermediate affinity state* gekennzeichnet ist. Dies ermöglicht es den T-Zellen dann, mit Blutgefäß-Endothelzellen zu interagieren<sup>70</sup>. Im Gegensatz zu vollständig aktivierten T-Zellen kommt es aber wahrscheinlich nur zu einer kurzzeitigen Adhäsion ohne nachfolgende Extravasation, so dass die T-Zellen innerhalb von 24 h wieder in der Zirkulation erscheinen.

Unabhängig von einer Extravasation der T-Zellen findet also immer eine Adhäsion an das Blutgefäß-Endothel statt, die wahrscheinlich die mit MT103 assoziierten Nebenwirkungen auslösen kann. Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten bedeuten prinzipiell Stress für das betroffene Endothel<sup>71</sup>. Solange dieser Vorgang nur lokal begrenzt auftritt, kommt es allerdings nicht zu schwerwiegenden Nebenwirkungen. Infolge der MT103-induzierten T-Zell-Aktivierung adhären jedoch alle zirkulierenden T-Zellen nahezu gleichzeitig an das Blutgefäß-Endothel. Diese simultane und umfassende T-Zell-Adhäsion kann letztlich eine vorübergehende Störung der Endothel-Integrität zur Folge haben. Einerseits kann dadurch die Barrierefunktion des Endothels beeinträchtigt werden, so dass Flüssigkeit aus dem Blut in die umliegenden Gewebe einsickert<sup>72</sup>. Die durch dieses sog. *vascular leak* hervorgerufenen Ödeme wurden bei mehreren Patienten beobachtet. Andererseits werden die Endothelzellen durch die T-Zell-Adhäsion ebenfalls aktiviert<sup>73</sup>. Infolgedessen erhöhen sie die Expression von Adhäsionsmolekülen und Selektinen, was wiederum ihre Adhäsivität für Lymphozyten und Neutrophile steigert. Ferner sind aktivierte Endothelzellen in der Lage, die Expression von Cyclooxygenase 2 zu induzieren<sup>74</sup>. Dieses Enzym fördert die Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub>, das letztlich im Hypothalamus eine Erhöhung der Körpertemperatur bewirkt. Dies erklärt auch das bei vielen Patienten – unabhängig von der anfänglichen B-Zellzahl und damit einer möglichen Zytokin-Ausschüttung – aufgetretene Fieber zu Behandlungsbeginn. In Übereinstimmung mit dem rückläufigen Endothel-Stress klingt es jedoch nach 2 bis 3 Tagen wieder ab. Außerdem können aktivierte Endothelzellen die Expression prokoagulatorischer Moleküle wie z.B. Gewebethromboplastin induzieren<sup>75</sup>. Dadurch kann es zu transienten Mikrozirkulationsstörungen in den Kapillargefäßen kommen, die mit einer reduzierten Durchblutung der betroffenen Areale verbunden sind. Treten diese Mikrozirkulationsstörungen im Gehirn auf, hat dies

u.U. die bei Patient 102-004 beobachteten neurologischen Symptome (Verwirrtheit und Sprachschwierigkeiten) zur Folge. Alle hier beschriebenen Nebenwirkungen sind transient und vollständig reversibel. Da sie aber zu einem vorzeitigen Therapieabbruch führen können, müssen sie auf jeden Fall vermieden werden. Dafür wird einerseits ein erweitertes Applikationsschema für Steroide diskutiert, um die Endothel-Integrität aufrecht zu erhalten<sup>76</sup>. Andererseits stehen die durch Endothel-Stress verursachten Nebenwirkungen in direktem Zusammenhang mit der Adhäsion der T-Zellen an das Blutgefäß-Endothel; deshalb muss sie auf ein Minimum reduziert werden. Je häufiger und stärker die T-Zell-Adhäsion stattfindet, desto wahrscheinlicher und ausgeprägter können auch die Nebenwirkungen sein.

Was ist die Ursache für die wiederholte Adhäsion der T-Zellen an das Blutgefäß-Endothel und wie kann sie minimiert werden? Die Ergebnisse der hier durchgeführten FACS-Analysen sprechen dafür, dass T-Zellen durch den Übergang von LFA-1 in den *intermediate affinity state* ihre Adhäsivität erhöhen, wenn sie einer Änderung der Stimulusstärke über CD3 ausgesetzt sind. Zu Behandlungsbeginn erfolgt eine solche Änderung durch die kontinuierlich steigende MT103-Serumkonzentration; erst nach Erreichen des *steady state* bleibt die Serumkonzentration und damit die Stimulusstärke weitgehend konstant. Daher lässt sich eine einmalig erhöhte T-Zell-Adhäsivität in den ersten 12 h der Behandlung nicht vermeiden, die zum schnellen Verschwinden der T-Zellen aus dem peripheren Blut führt. Im Gegensatz zu Patienten mit zirkulierenden B-Zellen, bei denen dieses Verschwinden aufgrund der vollständigen T-Zell-Aktivierung mit einer langanhaltenden Extravasation einhergehen dürfte, kommt es bei Patienten ohne zirkulierende B-Zellen wahrscheinlich nur zu einer Adhäsion der T-Zellen an das Blutgefäß-Endothel. Diese T-Zellen kehren dann innerhalb der ersten 24 h der Behandlung in die Zirkulation zurück. Sind sie dabei einer erneuten Änderung der Stimulusstärke wie z.B. durch eine weitere Zunahme der MT103-Serumkonzentration ausgesetzt, führt dies wahrscheinlich wieder zu einer Adhäsion an das Blutgefäß-Endothel. Dieser wiederholte Endothel-Kontakt der T-Zellen kann letztlich Endothel-Stress auslösen und so die beschriebenen klinischen Nebenwirkungen nach sich ziehen. Deshalb sollte der Einstieg in die MT103-Therapie möglichst so gestaltet werden, dass es nur zu einer einmaligen (nicht vermeidbaren) Adhäsion der T-Zellen kommt. Dies ist unabhängig von der gewählten Einstiegsvariante bei Patienten mit zirkulieren-

den B-Zellen der Fall, die dementsprechend deutlich weniger Nebenwirkungen zeigten. Allerdings würde sich die Anzahl der behandelbaren Patienten durch eine Beschränkung auf solche mit B-Zellen reduzieren, so dass diese Möglichkeit nicht praktikabel ist. Außerdem könnte bei vielen Patienten trotz eines möglichen Fortbestehens des Tumors kein weiterer Behandlungszyklus angeschlossen werden, da die Depletion der zirkulierenden B-Zellen meistens 4 Wochen über das Therapieende hinaus anhält. Daher musste für Patienten ohne B-Zellen eine Einstiegsvariante gefunden werden, die auch auf höheren Dosisstufen einen risikoarmen Therapiebeginn gewährleistet. Ziel dabei war es, den *steady state* der jeweiligen MT103-Serumkonzentration noch vor der Rückkehr der T-Zellen in die Zirkulation zu erreichen, damit diese keiner erneuten Konzentrationsänderung ausgesetzt werden. Aus diesem Grund erweist sich die Einstiegsvariante *step* als ungeeignet. Zwar kehrt ein Großteil der T-Zellen erst dann in die Zirkulation zurück, als der *steady state* der Einstiegsdosis  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  bereits erreicht ist. Da jedoch die Dosis danach sprunghaft auf  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  erhöht wird, erfolgt auf jeden Fall eine Änderung des MT103-induzierten Stimulus, die die beschriebenen Nebenwirkungen nach sich ziehen kann. Auch die Einstiegsvariante *ramp* ist noch mit einem relativ großen Risiko verbunden, da dabei die Dosis in den ersten 24 h der Behandlung kontinuierlich von 0 auf  $15 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  gesteigert und somit der *steady state* erst nach 36 h erreicht wird. Trotz einer möglicherweise stärkeren Zytokin-Ausschüttung bei Patienten mit initial vielen zirkulierenden B-Zellen bietet die Einstiegsvariante *flat* zurzeit den sichersten Therapiebeginn für Patienten ohne B-Zellen. In diesem Fall kehren die meisten T-Zellen erst nach Erreichen des *steady state* in die Zirkulation zurück, so dass sie nur das einmalige Adhäsions-signal unmittelbar nach Behandlungsbeginn erhalten. Dieser minimierte Endothel-Stress ist jedoch in der Regel nicht mit schwereren Nebenwirkungen verbunden. Daher sollten alle im weiteren Verlauf der Studie eingeschlossenen Patienten mit der Einstiegsvariante *flat* behandelt werden.

## 4.2. Behandlungsdauer und –pausen

Für die Interpretation der MT103-induzierten T-Zell-Aktivierung und –Expansion in der Effektorphase muss man zunächst den Verlauf der natürlichen Immunantwort betrachten. Diese erstreckt sich für das adaptive Immunsystem von der Antigen-erkennung bis zur Rückkehr in die Homöostase über einen ca. 4-wöchigen Zeitraum<sup>77, 78</sup>. Dabei kommt es zu einer selektiven Aktivierung und nachfolgenden Expansion antigenspezifischer T-Zellen, die sicherstellt, dass das Antigen effizient und vollständig eliminiert wird. Anschließend erfolgt durch apoptotischen Zelltod eine Kontraktion der expandierten Effektorpopulation, so dass die T-Zellzahl wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurückgeht. Gleichzeitig werden persistierende, antigenspezifische Memory-T-Zellen gebildet, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere und stärkere Immunantwort auslösen. Eine ähnliche Abfolge von Expansion und nachfolgender Kontraktion konnte auch bei den MT103-induzierten T-Zellverläufen beobachtet werden, was trotz unterschiedlicher Ausgangsstimuli eine gewisse Analogie der zugrundeliegenden Mechanismen vermuten lässt. Wie kann diese Erkenntnis für eine effiziente Gestaltung der MT103-Therapie genutzt werden? Ziel sollte eine möglichst starke Expansion bzw. große Absolutzahl der zytotoxischen  $T_{(EM)}$ -Zellen sein, die dann für die Zerstörung der Lymphomzellen zur Verfügung stehen. Um dies auch bei einer anfänglich geringen Expansions-tendenz zu erreichen, sollten die Behandlungszyklen der MT103-Therapie so aufgebaut werden, dass sich die  $T_{(EM)}$ -Zellzahl zu Beginn eines jeden Zyklus auf einem höheren Ausgangsniveau als zu Beginn des jeweils vorangegangenen Zyklus befindet. Dieses „Aufschaukeln“ der  $T_{(EM)}$ -Zellzahl ist von zwei Parametern abhängig: einerseits der Behandlungsdauer und andererseits der Länge der Pause zwischen zwei Behandlungszyklen.

Laut derzeitigem Studienprotokoll haben Patienten, die nach der initialen 4-wöchigen Behandlung mindestens eine SD erreichen, die Option, weitere 4 Wochen mit MT103 behandelt zu werden. Allerdings sprechen einige Beobachtungen gegen diese 8-wöchige Behandlungsdauer. Bei Patienten mit klinischer Wirksamkeit waren durchschnittlich 71% der Tumorreduktion bereits nach den ersten 4 Wochen messbar. Die zweiten 4 Wochen der Behandlung trugen dagegen nur noch 29% zum Gesamtergebnis bei. Dieser allgemeine Befund wird auch durch einen Effekt

bei Patientin 105-006 unterstützt. Der bei dieser Patientin diagnostizierte Morbus Waldenström produzierte große Mengen eines IgM-Antikörpers. Während bis Tag 29 der MT103-Therapie ein stetig fallender IgM-Serumspiegel nachgewiesen werden konnte, stagnierte dieser in den nachfolgenden 4 Wochen der Behandlung auf einem gegenüber dem Referenzwert leicht erhöhten Niveau. Dies deutet darauf hin, dass in der zweiten Therapiehälfte keine signifikante weitere Eliminierung noch vorhandener Lymphomzellen stattfand. Diese klinischen Ergebnisse stimmen mit den entsprechenden T-Zellverläufen überein. So zeigten die  $T_{(EM)}$ -Zellen bei den meisten Patienten mit 8-wöchiger Behandlungsdauer eine ausgeprägte Kontraktion gegen Ende der ersten Therapiehälfte sowie nur schwache Anzeichen für eine erneute Expansion und langfristige Aktivierung während der zweiten Hälfte. Wahrscheinlich benötigen die  $T_{(EM)}$ -Zellen nach der Kontraktionsphase eine gewisse Stimulationspause, bevor sie wieder aktiviert werden können<sup>36, 79</sup>. Diese Vermutung wird auch durch die bei Patient 109-008 beobachtete Expansion eines hochmalignen B-Zellklons nach 4 Wochen Behandlung gestützt, nachdem zuvor die B-Zellen (zumindest in der Zirkulation) erfolgreich eliminiert worden waren. Dies könnte einerseits auf eine therapiebedingte Selektion hochmaligner B-Zellen zurückzuführen sein<sup>80</sup>, andererseits wäre aber auch ein fehlender Therapiedruck nach 4-wöchiger Behandlungsdauer aufgrund nicht erneut aktivierbarer T-Zellen denkbar. Außerdem könnten die Memory-T-Zellen, aus denen die Mehrzahl der eigentlichen Effektor-T-Zellen hervorgeht, durch die konstante MT103-Stimulation auf Dauer depletiert werden. Insgesamt weisen diese Beobachtungen auf einen autonomen, selbstlimitierenden 4-wöchigen Ablauf der MT103-induzierten T-Zell-Reaktionen hin, wie er auch für die natürliche Immunantwort diskutiert wird<sup>81</sup>. Dabei handelt es sich um einen T-Zell-inhärenten Mechanismus aus initialer Aktivierung durch Peptid-Antigene (oder BiTE-Moleküle), nachfolgender Expansion und abschließender Kontraktion, die weitgehend unabhängig von äußeren Einflussfaktoren ablaufen. Wahrscheinlich spielt es dafür auch nur eine untergeordnete Rolle, ob die Stimulation vorwiegend zu Beginn der Immunantwort erfolgt oder wie im Fall der BiTE-Moleküle während des gesamten 4-wöchigen Zeitraums vorhanden ist. Erst nach der Rückkehr in die Homöostase und einer gewissen Stimulationspause lassen sich die T-Zellen erneut effizient aktivieren. Da die BiTE-induzierten T-Zell-Reaktionen vermutlich auf einem analogen Mechanismus beruhen, findet nach der Expansion zwangsläufig auch eine Kontraktion statt. Diese kann durch

eine fortwährende BiTE-Stimulation weder verhindert, noch können die T-Zellen dadurch unmittelbar wieder aktiviert werden. Deshalb sprechen die hier gewonnenen Erkenntnisse für 4-wöchige, durch Pausen voneinander getrennte Behandlungszyklen anstelle der bisherigen, meist 8-wöchigen MT103-Infusion.

Wie lange sollte die Pause zwischen zwei Behandlungszyklen dauern? Einerseits ist eine gewisse Pause erforderlich, bevor die T-Zellen nach der Kontraktionsphase erneut aktiviert werden können<sup>36, 79</sup>. Andererseits sollen sie aber auch vor der vollständigen Rückkehr in die Homöostase bzw. auf ihr Niveau vor Behandlungsbeginn wieder stimuliert werden, um eine Verstärkung der T-Zell-Reaktionen über mehrere Zyklen hinweg zu erreichen. Um diese beiden Anforderungen möglichst gleichzeitig zu erfüllen, musste die dafür geeignete Pausenlänge ermittelt werden. Von den in die vorliegende Arbeit einbezogenen Patienten wurden zwei nach einer Therapie-Unterbrechung erneut mit MT103 behandelt. Dabei erhielt die Patientin 109-006 zunächst einen 8-wöchigen Behandlungszyklus, an den sich nach einer 6½ Wochen dauernden Pause ein 4-wöchiges *Additional Treatment* anschloss. Alle im Verlauf des zweiten Zyklus beobachteten T-Zell-Effekte glichen hinsichtlich ihrer zeitlichen Abfolge und Intensität weitgehend denen, die schon während der ersten Hälfte des ersten Zyklus aufgetreten waren. Insbesondere ging der Neustart nicht von einer im Vergleich zum ersten Zyklus höheren T-Zellzahl aus, so dass kein „Aufschaukeln“ der T-Zell-Reaktionen von Zyklus zu Zyklus erreicht wurde. Außerdem gibt eine längere Pause zwischen zwei Behandlungszyklen dem Tumor – gerade, wenn dieser noch nicht im Sinne einer CR vollständig eliminiert wurde – Zeit, erneut zu wachsen, was die bereits erzielte Reduktion wieder zunichte machen würde<sup>82</sup>. Deshalb sollte eine kürzere Behandlungspause gewählt werden, wie sie auch durch die bei Patient 102-003 beobachteten T-Zellverläufe impliziert wird. Bei diesem Patienten kam es nach einer 14-tägigen Behandlung zu einer 2 Wochen dauernden Unterbrechung der MT103-Infusion. Beim anschließenden Neustart traten die übliche, mit dem Therapieeinstieg assoziierte T-Zell-Umverteilung und –Aktivierung auf, wobei diese Effekte jedoch deutlich schneller und stärker als beim ursprünglichen Behandlungsbeginn ausfielen. Es liegt daher nahe, dass T-Zellen nach einer kurzen Pause besser auf eine wiederholte BiTE-Stimulation reagieren, da sie wahrscheinlich noch in einem präaktivierten Zustand vorliegen<sup>38, 83</sup>. Im Gegensatz dazu ergibt sich nach einer langen Pause kein signi-

fikanter Unterschied zur initialen BiTE-Stimulation, da die T-Zellen bereits wieder in die Homöostase zurückgekehrt sind. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse daher für 4-wöchige Behandlungszyklen, die durch 2-wöchige Stimulationspausen unterbrochen werden. Dieses Studiendesign wird bei der Durchführung einer Phase II-Studie in der ALL bereits angewendet.

### **4.3. Essentielle Bedeutung der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen für die MT103-vermittelte Zytotoxizität**

Bei knapp 83% der auswertbaren Patienten erfolgte zwischen der 2. und 4. Behandlungswoche eine Expansion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in über 90% der Fälle auf eine selektive Proliferation des T<sub>EM</sub>-Subsets zurückzuführen war. Welches zytotoxische Potential besitzt diese T-Zell-Subpopulation und welche klinische Bedeutung kommt ihrer Expansion zu?

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen vermitteln T<sub>EM</sub>-Zellen – ebenso wie das kleinere T<sub>EMRA</sub>-Subset – eine starke Zytotoxizität gegenüber entsprechenden Zielzellen. Dies ist auf die große Anzahl präformierter zytotoxischer Granula zurückzuführen, die überwiegend Perforin und Granzyme B enthalten<sup>84</sup>. Die Speicherung dieser Granula in ruhenden T<sub>EM</sub>-Zellen erlaubt nach deren Aktivierung eine sehr schnelle Sezernierung des Inhalts in die gebildete immunologische Synapse. Dabei gelangt Granzyme B mit Hilfe des porenbildenden Perforins in das Zytoplasma der Zielzellen, wo es durch Spaltung von Procaspase-3 letztlich zum apoptotischen Zelltod führt. Die gespeicherten Granula ermöglichen es auch, dass einzelne T<sub>EM</sub>-Zellen mehrere Zielzellen nacheinander abtöten können (sog. *serial killing*)<sup>53, 85</sup>. Bei diesem *in vitro* beobachteten Phänomen „scannt“ eine T-Zelle über einen längeren Zeitraum hinweg eine mit MT103 bedeckte B-Zelle, leitet deren Zerstörung ein und wandert anschließend zur nächsten B-Zelle. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis der Vorrat zytotoxischer Granula der T-Zelle verbraucht ist und durch Gentranskription neu gebildet werden muss. Aufgrund des *serial killing* eliminiert also eine einzelne T-Zelle innerhalb weniger Stunden mehrere B-Zellen. Dieser Effekt trägt neben der starken Zytotoxizität zur großen Effizienz von MT103 selbst

bei ungünstigen (d.h. kleinen) T:B-Verhältnissen bei. Weiterhin schütten aktivierte T<sub>EM</sub>-Zellen IFN- $\gamma$  aus, das proinflammatorisch wirkt und seinerseits Makrophagen aktiviert, zur Beseitigung von Lymphomzellen beizutragen<sup>86</sup>. Außerdem polarisiert IFN- $\gamma$  die Immunantwort in Richtung zytotoxischer Effektor-T-Zellen und verstärkt dadurch noch zusätzlich die Wirksamkeit von MT103. Aus immunologischer Sicht stellt also das T<sub>EM</sub>-Subset die effektivste T-Zell-Population für die Eliminierung der malignen B-Zellen dar.

Vergleicht man das klinische Ansprechen mit den entsprechenden T-Zellverläufen, zeigt sich, dass die selektive Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen in der Effektorphase eine Voraussetzung für die Reduktion des Tumorumfanges bildet. Damit kommt diesem T-Zell-Subset eine große Bedeutung bei der Beurteilung der biologischen und klinischen Aktivität von MT103 zu. Für die Wirksamkeit spielen wahrscheinlich sowohl die prozentuale Zunahme als auch die absolute Zahl der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen eine wichtige Rolle. So liefert bei gleichem Ausgangswert eine Vervierfachung der Zellzahl ein besseres Ergebnis als eine Verdopplung; gleichzeitig scheint nach der Expansion eine CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellzahl von mehr als 800 pro  $\mu$ l für ein sehr gutes Ansprechen erforderlich zu sein. Beide Faktoren gehen auch in die Berechnung der entsprechenden AUC ein. Dabei wird die Fläche unter dem jeweiligen Verlauf der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen unter Berücksichtigung des Ausgangswerts ermittelt; diese ist um so größer, je stärker die Expansion ausfällt. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der AUC und dem klinischen Ansprechen: je größer die berechnete AUC ist, desto stärker ist auch die gemessene Reduktion des Tumorumfanges. Damit könnte die AUC als *surrogate secondary endpoint marker* dienen, um die Wirksamkeit der MT103-Therapie zu beurteilen<sup>87, 88</sup>. Allerdings sollte in diesem Kontext berücksichtigt werden, dass eine im peripheren Blut sichtbare Expansion der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen nicht zwingend notwendig für das klinische Ansprechen sein muss, da es letztlich auf die nicht direkt messbare Expansion in den Tumorknoten ankommen dürfte. Daher könnte es Patienten geben, die trotz einer Verkleinerung des Tumorumfanges keine ausgeprägte AUC aufweisen. In jedem Fall dürfte aber eine große AUC eine günstige Voraussetzung für ein klinisches Ansprechen auf die MT103-Therapie anzeigen.

## 4.4. Ausblick

BiTE-Moleküle bilden eine neuartige Wirkstoffklasse bispezifischer *single-chain* Antikörper-Konstrukte. Mit MT103 befindet sich zurzeit der erste Produktkandidat in einer klinischen Phase I-Studie, um seine Sicherheit und Tolerierbarkeit bei der Behandlung von B-NHL zu evaluieren. In dieser Indikation stellt R-CHOP die am häufigsten angewendete Therapieform dar<sup>89</sup>. Dabei handelt es sich um eine Kombination des chimären monoklonalen anti-CD20 Antikörpers Rituximab mit den Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison. Die Bindung von Rituximab führt sowohl durch Öffnen des von CD20 gebildeten Ionenkanals als auch durch die dem Immunsystem eigenen Effektormechanismen ADCC und CDC zur Zerstörung der B-Zellen<sup>8</sup>. Neben diesem therapeutischen Standard werden weitere Substanzen für die Behandlung von B-NHL entwickelt. Angesichts des großen Erfolgs von Rituximab werden zurzeit die humanisierten oder voll humanen anti-CD20 Antikörper Ofatumumab, GA101 und hA20 in Phase I/II-Studien erprobt<sup>90, 91, 92</sup>. Diese Antikörper besitzen eine niedrigere Immunogenität sowie teilweise eine höhere Affinität oder nutzen die Effektormechanismen ADCC und CDC aufgrund eines modifizierten F<sub>c</sub>-Teils besser aus. Weitere in der präklinischen Entwicklung oder in Phase I/II-Studien befindliche Antikörper richten sich gegen die B-Zell-Oberflächenmarker CD40, CD70 bzw. CD152<sup>93, 94, 95</sup>. Neben ADCC und CDC spielen für die Wirksamkeit dieser Antikörper auch zelluläre Mechanismen wie beispielsweise die Beeinflussung der Signaltransduktion der spezifisch gebundenen Moleküle eine Rolle. Zusätzlich werden gezielt Zytostatika an Antikörper gekoppelt, um die Selektivität dieser Wirkstoffe für (maligne) B-Zellen zu erhöhen. Zu diesen Konjugaten gehören z.B. anti-CD22/Calicheamicin und anti-CD79/MCC-DM1<sup>96, 97</sup>. Im Bereich der *small molecules* wird u.a. ein Fusionsprotein entwickelt, das die proliferationsfördernde Wirkung der B-Zell-Zytokine BLyS und APRIL inhibieren soll<sup>98</sup>. Außerdem wird zurzeit die Wirksamkeit des Purinnukleosidphosphorylase-Inhibitors BCX-1777 in einer Phase II-Studie geprüft<sup>99</sup>. Auch bei den *single-chain* Konstrukten existiert ein neuer, im Forschungsstadium befindlicher Ansatz. Dabei werden T-Zellen *ex vivo* mit membranständigen anti-CD19 scF<sub>v</sub>-Fragmenten transfiziert, an die auf zytoplasmatischer Seite die Signaltransduktionsdomänen von CD28, 4-1BB und CD3 $\zeta$  gekoppelt sind<sup>100</sup>. Dieses Konzept ähnelt dem

MT103-vermittelten Wirkmechanismus, da CD19 auf B-Zellen zum Clustern der scF<sub>v</sub>-Fragmente führen könnte. Dadurch lässt sich möglicherweise eine Signaltransduktion induzieren, die letztlich eine Aktivierung der T-Zellen zur Folge haben könnte. Allerdings steht für eine daraus resultierende Zytotoxizität der T-Zellen gegenüber B-Zellen der *proof-of-concept in vivo* noch aus.

Die meisten der genannten Substanzen verbinden bekannte Wirkmechanismen mit neuen Zielstrukturen. Dies gilt sowohl für die breite Palette der monoklonalen Antikörper als auch für die *small molecule*-Inhibitoren. Im Gegensatz dazu liegt der BiTE-Plattform ein gänzlich neuartiger Wirkmechanismus zugrunde. Die bispezifischen Moleküle dienen als Bindeglieder zwischen den Tumor- und T-Zellen und führen letztlich durch Aktivierung der T-Zellen zur gezielten Eliminierung der gebundenen Tumorzellen. Dabei wird unabhängig von der jeweiligen TCR-Spezifität das zytotoxische Potential des gesamten T-Zellpools ausgenutzt, das bisher nur sehr eingeschränkt und unter großem technischen Aufwand für die Krebstherapie zur Verfügung stand<sup>101, 102</sup>. Gegenüber herkömmlichen Behandlungsformen greift die BiTE-Therapie auf einen evolutionär optimierten und daher sehr effizienten Effektormechanismus des körpereigenen Immunsystems für die Zerstörung der Tumorzellen zurück. Aufgrund dieser großen intrinsischen Zytotoxizität besteht natürlich auch die Gefahr überschießender T-Zell-Reaktionen und daraus resultierender Nebenwirkungen. Sie lassen sich jedoch durch die Anwendung von Glucocorticoiden und die in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etablierte Einstiegsvariante *flat* auf ein akzeptables Minimum reduzieren. Außerdem ist mit der sehr kurzen *in vivo* Halbwertszeit von MT103 ein weiterer Sicherheitspuffer vorhanden, da die Serumkonzentration innerhalb von 24 h nach Therapieende unter die Nachweisgrenze sinkt; dadurch wird eine weitere T-Zell-Aktivierung ausgeschlossen. Insgesamt bietet die BiTE-Therapie aufgrund der hohen spezifischen Wirksamkeit einerseits und der breiten Anwendungsmöglichkeiten andererseits ein sehr großes Potential. Nach der Ermittlung der optimalen MT103-Dosis in der laufenden Phase I-Studie muss in nachfolgenden Wirksamkeitsstudien die bereits beobachtete Effizienz bestätigt werden. In den kommenden Jahren sollte dann mit MT103 ein neuer Wirkstoff für die Behandlung von B-NHL zur Verfügung stehen.

## 5. Zusammenfassung

MT103 ist ein bispezifisches anti-CD19 x anti-CD3 *single-chain* Antikörper-Konstrukt, das zur neuartigen Wirkstoffklasse der BiTE-Antikörper gehört. Durch die gleichzeitige Bindung an B- und T-Zellen führt MT103 zu einer polyklonalen T-Zell-Aktivierung und –Proliferation sowie zu einer gerichteten Zellyse der gebundenen B-Zellen. Zurzeit wird die Sicherheit und Tolerierbarkeit von MT103 in einer klinischen Phase I-Studie in der Indikation B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome evaluiert. Dabei erhalten die Patienten eine 4- bis 8-wöchige kontinuierliche MT103-Infusion. Hat sich eine MT103-Dosis in einer Kohorte von 3 Patienten als sicher erwiesen, werden die Patienten der nächsten Kohorte mit einer höheren Dosis behandelt. Da MT103 der erste BiTE-Antikörper in der klinischen Entwicklung ist, sollen parallel verschiedene pharmakodynamische Parameter untersucht werden, um den *in vivo* Wirkmechanismus von MT103 genauer zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mit Hilfe der Durchflusszytometrie die zeitlichen Verläufe der relevanten Lymphozytenpopulationen sowie ihrer Zelloberflächenmarker hinsichtlich Aktivierung und Adhäsion analysiert. Folgende Ergebnisse können in die künftige Gestaltung klinischer Studien mit BiTE-Antikörpern einfließen:

1. Durch die kontinuierliche Infusion wird die MT103-Serumkonzentration schnell erreicht und bleibt während der restlichen Behandlungsdauer konstant (*steady state*). Dabei steigt die jeweilige MT103-Serumkonzentration linear mit den entsprechenden Dosisstufen.
2. Es findet eine dosisabhängige Depletion der B-Zellen im peripheren Blut statt, die ab der MT103-Dosis  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  vollständig und langanhaltend sowie auf die Induktion von Apoptose in den B-Zellen zurückzuführen ist.
3. Der Verlauf der T-Zellen ist zu Behandlungsbeginn durch eine Umverteilung gekennzeichnet. Das schnelle Verschwinden der T-Zellen aus dem peripheren Blut ist dabei mit einem Anstieg der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und einem Wechsel des Adhäsionsmoleküls LFA-1 in den *intermediate affinity state* verbunden. Nach dieser Adhäsion an das Blutgefäß-Endothel und einer

möglichen Extravasation kehren die T-Zellen in Abhängigkeit der B-Zellzahl in die Zirkulation zurück. In der 2. und 3. Behandlungswoche kommt es meist zu einer Expansion der T-Zellen über den Ausgangswert hinaus, die am Ende der 4. Woche von einer Kontraktion der expandierten T-Zell-Population abgeschlossen wird.

4. Als häufigste Nebenwirkungen der MT103-Therapie treten Fieber, Ödeme und Kopfschmerzen auf, die meist einstiegsassoziiert sind. Sie können wahrscheinlich durch die zu Behandlungsbeginn auftretende erhöhte T-Zell-Adhäsivität und den damit verbundenen Endothel-Stress erklärt werden. Da die Stärke der Nebenwirkungen mit der Anzahl der Adhäsionsvorgänge korreliert, muss diese Zahl minimiert werden. Eine erhöhte Adhäsivität geht wahrscheinlich auf Änderungen der MT103-Serumkonzentration vor Erreichen des *steady state* zurück, so dass dieser für einen sicheren Behandlungseinstieg möglichst schnell erreicht werden sollte. Dies lässt sich mit der Einstiegsvariante *flat* erzielen, bei der die MT103-Infusion unmittelbar mit der jeweiligen Behandlungsdosis beginnt und der *steady state* bereits 16 h nach Behandlungsbeginn erreicht wird.
5. Die Expansion der T-Zellen in der 2. und 3. Behandlungswoche beruht überwiegend auf einer Proliferation des zytotoxischen  $CD8^+ T_{EM}$ -Subsets. Gleichzeitig steigt der Anteil der T-Zellen, die die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR exprimieren, und es kommt teilweise zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Am Ende der 4. Woche erfolgt meist eine Kontraktion des expandierten  $CD8^+ T_{EM}$ -Subsets, die zu einer Rückkehr der Zellzahl auf den Ausgangswert führt. Eine Expansion der supprimierend wirkenden regulatorischen  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  T-Zellen ist dagegen bei keinem Patienten zu beobachten.
6. Die optimale Dauer für einen Behandlungszyklus beträgt 4 Wochen, da in der zweiten Hälfte eines 8-wöchigen Behandlungszyklus meist nur eine schwache T-Zell-Aktivität hinsichtlich Expansion und Aktivierung auftritt. Als Pausenlänge zwischen zwei aufeinander folgenden Behandlungszyklen bieten sich 2 Wochen an, um eine vollständige Rückkehr der T-Zell-Aktivität auf ihr ursprüngliches Niveau zu verhindern. Dadurch könnte ein „Aufschaukeln“ der Aktivität über mehrere Behandlungszyklen erreicht werden.

7. Die Expansion des CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Subsets korreliert mit der klinischen Wirksamkeit der MT103-Therapie. Dies spiegelt sich auch in der auf den Ausgangswert bezogenen Fläche unter dem Verlauf der CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellen wider, die damit als *surrogate secondary endpoint marker* für die Beurteilung der *in vivo* Aktivität von MT103 dienen könnte.

## 6. Summary

MT103 is a bispecific anti-CD19 x anti-CD3 single-chain antibody construct belonging to the novel therapeutic class of BiTE antibodies. Simultaneous binding of MT103 to B- and T-cells leads to polyclonal T-cell activation and proliferation as well as targeted cell lyses of bound B-cells. Currently, the safety and tolerability of MT103 is evaluated in a clinical phase I study in the indication B-cell non-Hodgkin lymphoma. Included patients receive a 4 to 8 weeks' continuous infusion of MT103. If a MT103 dose proves to be safe in a cohort of 3 patients, the patients of the next cohort will be treated at a higher dose level. As MT103 is the first BiTE antibody in clinical development, different pharmacodynamic parameters shall be investigated concurrently to understand more precisely the *in vivo* mode of action of MT103. In the present work the time courses of the relevant lymphocyte populations as well as their cell surface markers with regard to activation and adhesion were analyzed by flow cytometry. The following results might influence the future design of clinical studies with BiTE antibodies:

1. The MT103 serum concentration is rapidly reached by the continuous infusion and remains constant during the remaining treatment period (steady state). The respective MT103 serum concentration increases linear with the corresponding dose levels.
2. There is a dose-dependent B-cell depletion in the peripheral blood which is complete and sustained starting at an MT103 dose rate of  $5 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h})$  and can be attributed to the induction of apoptosis in B-cells.
3. The T-cell course at treatment initiation is characterized by a redistribution. The rapid disappearance of T-cells out of the peripheral blood is associated with an increase of expression of the activation marker CD69 and a transition of the adhesion molecule LFA-1 into the intermediate affinity state. This might trigger an adhesion to the blood vessel endothelium and possibly also an extravasation of T-cells which later return into the circulation in dependence of the B-cell count. In the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> treatment week most of the time there is a T-cell expansion

beyond the initial cell count which finally is terminated by a contraction of the expanded T-cell population at the end of the 4<sup>th</sup> week.

4. The most frequent adverse events of the MT103 therapy include pyrexia, edemas and headache mainly occurring at treatment initiation. Probably, they can be explained by the elevated T-cell adhesiveness and the associated endothelial stress at the beginning of the MT103 infusion. As the intensity of adverse events correlates with the number of adhesion incidents the latter has to be minimized. An elevated adhesiveness probably traces back to variations of the MT103 serum concentration before reaching the steady state level. Therefore the steady state should be reached as fast as possible for a safe treatment initiation. This can be achieved by using the initiation protocol *flat* directly starting the MT103 infusion with the respective treatment dose and hence reaching the steady state 16 h after the beginning of the infusion.
5. The T-cell expansion in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> treatment week is predominantly due to a proliferation of the cytotoxic CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> subset. At the same time the proportion of T-cells expressing the activation markers CD25 and HLA-DR increases and partly there is a secretion of pro-inflammatory cytokines. Most of the time a contraction of the expanded CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> subset takes place by the end of the 4<sup>th</sup> week leading to a return of the cell count back to the initial value. In contrast, an expansion of the suppressive regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-cells has not been observed in any patient.
6. The optimal duration of a treatment cycle is 4 weeks as only weak T-cell activity regarding expansion and activation occurs in the second half of an 8 weeks' treatment cycle. A break of 2 weeks between two consecutive treatment cycles is proposed to prevent a complete return of T-cell activity to its original level. Thereby, an amplification of this activity across multiple treatment cycles may be achieved.
7. The CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> subset expansion correlates well with the clinical efficacy of the MT103 therapy. This is also reflected by the area under the curve (AUC) of the CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-cells referring to the initial value. Therefore, the AUC might serve as a surrogate secondary endpoint marker for the assessment of the *in vivo* activity of MT103.

## 7. Referenzen

1. Müller-Hermelink HK, Papadopoulos T. Einteilung und Klassifikation maligner Erkrankungen. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram CR (Hrsg.). Die Onkologie. 1. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 2004:32-3.
2. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P, eds. Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX, IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC, 2007.
3. Hodgkin T. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* 1832;17:68-114.
4. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:441-61.
5. Hiddemann W, Dreyling M, Stein H (Hrsg.). Lymphome. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2004.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO Press, 2008.
7. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* 1971;31:1860-1.
8. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006;6:859-66.
9. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002;99:754-8.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2007:19-46.

11. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 7<sup>th</sup> ed. London: Taylor & Francis, 2007:3-27.
12. Burnet FM. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. *The Australian Journal of Science* 1957;20:67-9.
13. Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF. CD19, CD21 and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Int Rev Immunol* 2001;20:739-62.
14. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2007:137-52.
15. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001;19:375-96.
16. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 7<sup>th</sup> ed. London: Taylor & Francis, 2007:349-52.
17. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 7<sup>th</sup> ed. London: Taylor & Francis, 2007:364-8.
18. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
19. Clarke SL, Betts GJ, Plant A, et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 2006;1:e129.
20. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007;19:217-23.
21. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2007:267-302.
22. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998;187:205-16.

23. Shimaoka M, Xiao T, Liu JH, et al. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 2003;112:99-111.
24. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 2003;301:1720-5.
25. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 2005;6:497-506.
26. Salas A, Shimaoka M, Phan U, Kim M, Springer TA. Transition from rolling to firm adhesion can be mimicked by extension of integrin alphaLbeta2 in an intermediate affinity state. *J Biol Chem* 2006;281:10876-82.
27. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
28. Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Strominger J. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J Exp Med* 1983;157:461-72.
29. Shioh LR, Rosen DB, Brdicková N, et al. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 2006;440:540-4.
30. Hemler ME, Brenner MB, McLean JM, Strominger JL. Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2172-5.
31. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 2001;14:63-77.
32. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death *in vivo*. *Curr Opin Immunol* 2002;14:354-9.
33. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 2002;3:619-26.

34. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7:532-42.
35. Dunne PJ, Belaramani L, Fletcher JM, et al. Quiescence and functional re-programming of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T cells during persistent infection. *Blood* 2005;106:558-65.
36. Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 2007;19:408-15.
37. Crotty S, Ahmed R. Immunological memory in humans. *Semin Immunol* 2004;16:197-203.
38. Zimmermann C, Prévost-Blondel A, Blaser C, Pircher H. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 1999;29:284-90.
39. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-12.
40. Lefrançois L. Development, trafficking and function of memory T-cell subsets. *Immunol Rev* 2006;211:93-103.
41. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells. *Science* 2000;290:92-7.
42. McKinstry KK, Golech S, Lee WH, Huston G, Weng NP, Swain SL. Rapid default transition of CD4 T cell effectors to functional memory cells. *J Exp Med* 2007;204:2199-211.
43. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260-6.
44. Dunne PJ, Faint JM, Gudgeon NH, et al. Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood* 2002;100:933-40.

45. Carrasco J, Godelaine D, Van Pel A, Boon T, van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood* 2006;108:2897-905.
46. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:267-96.
47. Mack M, Riethmüller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7021-5.
48. Wolf E, Hofmeister R, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA. BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discov Today* 2005;10:1237-44.
49. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000;95:2098-103.
50. Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer* 2002;100:690-7.
51. Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P, Baeuerle PA. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol* 2006;43:763-71.
52. Baeuerle PA, Kufer P, Lutterbüse R. Bispecific antibodies for polyclonal T-cell engagement. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:413-9.
53. Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Int J Cancer* 2005;115:98-104.
54. Schlereth B, Quadt C, Dreier T, et al. T-cell activation and B-cell depletion in chimpanzees treated with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:503-14.

55. Cheson BD. The International Harmonization Project for response criteria in lymphoma clinical trials. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:841-54.
56. Noble PB, Cutts JH, Carroll KK. Ficoll flotation for the separation of blood leukocyte types. *Blood* 1968;31:66-73.
57. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
58. Seki N, Brooks AD, Carter CR, et al. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis *in vitro*, but cause tumor regression *in vivo* in the absence of perforin. *J Immunol* 2002; 168:3484-92.
59. Gruen M, Bommert K, Bargou RC. T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:625-32.
60. Greene WC, Leonard WJ, Depper JM. Growth of human T lymphocytes: an analysis of interleukin 2 and its cellular receptor. *Prog Hematol* 1986;14:283-301.
61. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44: 143-61.
62. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000; 12:1145-55.
63. Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells *in vivo*. *J Exp Med* 2003;198: 249-58.
64. Everett NB, Caffrey RW, Rieke WO. Recirculation of lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1964;113:887-97.

65. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:557-72.
66. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355:1018-28.
67. Fauci AS, Dale DC. The effect of Hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 1975;46:235-43.
68. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sánchez-Madrid F, Alarcón B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002;109:901-12.
69. Kupfer A, Burn P, Singer SJ. The PMA-induced specific association of LFA-1 and talin in intact cloned T helper cells. *J Mol Cell Immunol* 1990;4:317-25.
70. Alon R, Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:525-32.
71. Pober JS, Min W. Endothelial cell dysfunction, injury and death. *Handb Exp Pharmacol* 2006:135-56.
72. Baluna R, Vitetta ES. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 1997;37:117-32.
73. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004;22:683-709.
74. Inoue W, Matsumura K, Yamagata K, Takemiya T, Shiraki T, Kobayashi S. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci Res* 2002;44:51-61.
75. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol* 1998;63:373-9.

76. Järveläinen H, Pelliniemi TT, Rönnemaa T. The stabilizing effect of glucocorticoids on human endothelial cells in culture. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:223-8.
77. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;280:243-8.
78. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:52-64.
79. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 2004;78:5535-45.
80. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res* 2007;67:1270-81.
81. Mittal A, Papa S, Franzoso G, Sen R. NF-kappaB-dependent regulation of the timing of activation-induced cell death of T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:2183-9.
82. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* 2006;108:3295-301.
83. Chandok MR, Farber DL. Signaling control of memory T cell generation and function. *Semin Immunol* 2004;16:285-93.
84. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008;26:389-420.
85. Isaaz S, Baetz K, Olsen K, Podack E, Griffiths GM. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* 1995;25:1071-9.
86. Kilinc MO, Aulakh KS, Nair RE, et al. Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory

- cells, induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *J Immunol* 2006;177:6962-73.
87. Johnson JR, Williams G, Pazdur R. End points and United States Food and Drug Administration approval of oncology drugs. *J Clin Oncol* 2003;21:1404-11.
  88. Appelbaum FR, Rosenblum D, Arceci RJ, et al. End points to establish the efficacy of new agents in the treatment of acute leukemia. *Blood* 2007;109:1810-6.
  89. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007;26:3603-13.
  90. Coiffier B, Tilly H, Pedersen LM, et al. Significant Correlation between Survival Endpoints and Exposure to Ofatumumab (HuMax-CD20) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2842.
  91. Umana P, Moessner E, Bruenker P, et al. Novel 3<sup>rd</sup> Generation Humanized Type II CD20 Antibody with Glycoengineered Fc and Modified Elbow Hinge for Enhanced ADCC and Superior Apoptosis Induction. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:229.
  92. Morschhauser F, Leonard JP, Fayad L, et al. Rituximab-Relapsing Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma Respond Even at Lower Doses of Humanized Anti-CD20 Antibody, IMMU-106 (hA20): Phase I/II Results. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2719.
  93. Long L, Patawaran M, Tong X, et al. Efficacy of an Antagonistic Anti-CD40 Monoclonal Antibody, HCD122 (CHIR-12.12), in Preclinical Models of Human Non-Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Disease. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:230.
  94. McEarchern JA, McDonagh CF, Smith LM, et al. SGN-70, a Humanized Anti-CD70 Antibody, Targets CD70-Expressing Hematologic Tumors. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2492.

95. Ansell SM, Geyer SM, Hurvitz S, et al. Phase I/II Study of Ipilimumab (MDX-010), an Anti-CTLA-4 Monoclonal Antibody, in Patients with Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2729.
96. Fayad L, Patel H, Verhoef G, et al. Clinical Activity of the Immunoconjugate CMC-544 in B-Cell Malignancies: Preliminary Report of the Expanded Maximum Tolerated Dose (MTD) Cohort of a Phase 1 Study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2711.
97. Polson AG, Yu SF, Elkins K, et al. Antibody-Drug Conjugates Targeted to CD79 for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2524.
98. Ansell S, Witzig TE, Novak A, et al. Phase 1 Clinical Study of Atacicept in Patients with Relapsed and Refractory B-Cell Lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:2722.
99. Ritchie E, Gore L, Roboz GJ, Feldman E, Ravandi F, Furman R. Phase II Study of Forodesine, a PNP Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:1881.
100. Milone MC, Fish J, Carpenito C, et al. Chimeric Immunoreceptor (T-Body) Targeting of Acute B-Cell Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) through Lentivirus Engineering of Primary Human T Cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108:3267.
101. Tey SK, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2006;84:281-9.
102. Leen AM, Rooney CM, Foster AE. Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2007;25:243-65.

## **Eigene Publikation**

Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmüller G, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kufer P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321:974-7.

## **Posterpräsentation**

Klinger M, Kufer P, Kirchinger P, Lutterbüse R, Leo E, Reinhardt C, Baeuerle P, Bargou R. T Cell Responses during Long-Term Continuous Infusion of MT103 (MEDI-538; Anti-CD19 BiTE) in Patients with Relapsed B-NHL: Data from Dose-Escalation Study MT103-104. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006;108: 2725.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee** für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit bei dem Biotechnologie-Unternehmen Micromet AG anfertigen zu können, und seine uneigennützigere Bereitschaft, die Aufgabe als Berichterstatter zu übernehmen.

**Prof. Dr. Patrick Bäuerle** danke ich für die Anregung und Überlassung des interessanten Themas. Seine zahlreichen Ideen und seine Motivationsfähigkeit waren mir eine wertvolle Hilfe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **PD Dr. Peter Kufer** für die ausgezeichnete Betreuung der Doktorarbeit und die persönliche Förderung bedanken. Mit seinem umfangreichen Fachwissen und konstruktiven Diskussionen hat er mich stets unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderes Dankeschön geht an **Sandra Wissing, Petra Meier, Susanne Hausmann** und **Christian Brandl** für ihre Hilfe bei der Durchführung einzelner Experimente und das sehr gute Arbeitsklima im Labor. Bei **Dr. Susanne Rumpler** und **Sandrine d'Argouges** bedanke ich mich herzlich für die schöne gemeinsame Zeit im Büro.

Allen anderen Mitarbeitern der Micromet AG sei an dieser Stelle für die kollegiale und freundschaftliche Kooperation gedankt.

Der größte Dank gilt jedoch **meinen Eltern**, die mich immer unterstützt und in den ethischen Motiven meiner Arbeit bestärkt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum: 28.09.1976  
Geburtsort: München  
Nationalität: Deutsch

## PROMOTION

---

2003-2009: Externe Promotionsarbeit bei der Micromet AG in München und am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Lehrstuhl für Immunologie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee  
Thema: *Wirkmechanismus des bispezifischen anti-CD19 x anti-CD3 BiTE-Antikörpers MT103 in Patienten mit rezidivem indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom*

## STUDIUM

---

1997-2003: Diplomstudium Biochemie an der Universität Regensburg  
Abschluss: Diplom-Biochemiker Univ. (Note: 1,1)

2002-2003: Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Schmitt  
Thema: *Analyse des CheY1- und Orf2-vermittelten Phosphat-Transfers beim taktischen Respons von Sinorhizobium meliloti*

2000-2001: Immunologie-Studium im Graduate Immunology Program an der Washington University in St. Louis, USA  
Forschungstätigkeit unter Leitung von Prof. Dr. Robert Schreiber  
Thema: *Lymphocyte-mediated Tumor Editing and Escape*

## ZIVILDIENTST

---

1996-1997: Zivildienst am Universitätsklinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Mitarbeit in der Endokrinologischen Forschungsgruppe unter Leitung von Prof. Dr. Dieter Engelhardt  
Thema: *Effekte von IGF-I und -II sowie von ACTH auf bovinnes Nebennierenmarksgewebe*

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

1987-1996: Besuch des Christoph-Probst-Gymnasiums Gilching  
Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

1983-1987: Besuch der Grundschule Gilching

