Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Therapieoptimierung aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome durch modifizierte anti-CD20-Antikörper: Präklinische Evaluation von GA101

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hinrich Schroer

aus

Kiel

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M. P. Schön

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Glass

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitun	ıg	1
	1.1 Non	n-Hodgkin-Lymphome	1
	1.1.1	Burkitt-Lymphome	2
	1.1.2	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome	2
	1.1.3	Mantelzell-Lymphome	2
	1.2 Lym	phomtherapie	3
	1.2.1	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	6
	1.2.2	Komplementvermittelte Zytotoxizität	7
	1.2.3	Direkte Zytotoxizität	7
	1.3 Mod	difizierte anti-CD20-Antikörper	8
	1.4 Resi	istenzmechanismen	9
	1.5 Ziels	setzung und Fragestellung	12
2	Material	und Methoden	13
	2.1 Mat	erial	13
	2.1.1	Geräte	13
	2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
	2.1.3	Reagenzien / Chemikalien	14
	2.1.4	Medikamente	15
	2.1.5	Kits	15
	2.1.6	Antikörper	15
	2.1.7	Zellkulturmedium	15
	2.1.8	Evaluierte anti-CD20-Antikörper	16
	2.1.8.1	l Rituximab	16
	2.1.8.2	2 GA101	16
	2.1.8.3	3 Ofatumumab	16
	2.1.9	Zelllinien	16
	2.1.10	EDV	16
	2.2 Zelli	biologische Methoden	17
	2.2.1	Kultivieren von Zellen	17
	2.2.2	Kryokonservierung von Zellen	17
	2.2.3	Revitalisieren von Zellen	17
	2.2.4	Zellzahlbestimmung	17
	2.2.5	NK-Zell-Aufreinigung	18
	2.2.5.1	Präparation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	18

		2.2.5.	2 Negativ-Depletion	. 18
	2.3	MT	T-Test	. 19
	2.4	Dui	chflusszytometrie	. 19
	2.5	FAC	CS-Zytotoxizitätstest	. 20
	2	2.5.1	Zellmembranfärbung	. 20
	2	2.5.2	Ansatz des FACS-Zytotoxizitätstest	. 21
	2	2.5.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zielzelllyse	. 22
	2.6	Zell	zyklusanalyse	. 23
	2.7	CD:	107a-Assay	. 23
	2	2.7.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der NK-Zell-Aktivität	. 24
	2.8	Sta	tistische Analysen	. 25
	2	2.8.1	Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest	. 25
	2	2.8.2	Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest	. 25
3	E	rgebnis	se	. 26
	3.1	Exp	ression der Zielstruktur CD20	. 26
	3.2	Unt	ersuchung der direkten Zytotoxizität der drei Antikörper	. 27
	3	3.2.1	MTT-Test	. 27
	3	3.2.2	Zellzyklusanalyse	. 30
	3.3	Unt	ersuchung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität	. 32
	3	3.3.1	FACS-Zytotoxizitätstest	. 32
	3.4	Unt	ersuchung der spezifischen NK-Zell-Aktivität	. 36
	3	3.4.1	CD107a-Assay	. 36
4	0	Diskussi	on	. 41
	4.1	Ste	llenwert der direkten Zytotoxizität monoklonaler anti-CD20-Antikörper	. 41
	4.2		sisabhängige Steigerung der Zielzelllyse durch antikörperabhängige zellvermittelte	
	•		ät	
	4.3		sisabhängige Steigerung der NK-Zell-Aktivität	
	4.4		blick auf Risiken und Möglichkeiten einer klinischen Anwendung	
5			enfassung	
6	- 1	iteratu	rverzeichnis	50

Abkürzungsverzeichnis

ADCC (engl.) antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; (dt.) antikörperabhän-

gige zellvermittelte Zytotoxizität

BL Burkitt-Lymphom

BSA bovines Serum Albumin

CDC (engl.) complement dependet cytotoxicity; (dt.) komplementvermittelte Zyto-

toxizität

CHOP Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®), Prednisolon

CLL Chronische lymphatische Leukämie

DiO 3,3–Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat

DLBCL (engl.) diffuse large B-cell lymphoma; (dt.) diffuses großzelliges B-Zell-

Lymphom

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA (engl.) deoxyribonucleic acid; (dt.) Desoxyribonukleinsäure

DSMZ deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EC₅₀ mittlere effektive Konzentration

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

EMEA (engl.) European Medicines Agency

EPOCH Etoposid, Prednisolon, Vincristin (Oncovin®), Cyclophosphamid, Hydroxy-

daunorubicin

FACS (engl.) fluorescence activated cell sorter; (dt.) fluoreszenz-aktivierter Zell-

sortierer

FDA (engl.) Food and Drug Administration

FITC Fluorescein-Isothiocyanat

FKS fötales Kälber Serum

HIV (engl.) human immunodeficiency virus; (dt.) humanes Immundefizienz-Virus

HLA (engl.) human leukocyte antigen; (dt.) humanes Leukozytenantigen

IE internationale Einheiten

IL-2 Interleukin-2

KIR Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren

mM millimolar, Einheit der Stoffmengenkonzentration (entspricht mmol / Liter)

MCL (engl.) mantle cell lymphoma; (dt.) Mantelzell-Lymphom

MTT 3-(4,5- Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid

NHL Non-Hodgkin-Lymphom

PBMNC (engl.) peripheral blood mononuclear cells; (dt.) mononukleäre Zellen des

peripheren Blutes

PBS (engl.) phosphate buffered saline

PCD (engl.) programmed cell death; (dt.) programmierter Zelltod

PCR (engl.) polymerase chain reaction

PE Phycoerythrin

PI Propidium-Iodid

T-NHL T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

% [w/v] (engl.) weight / volume [Gewichtsprozent]

% [v/v] (engl.) volume / volume [Volumenprozent]

1 Einleitung

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der Verbesserung der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen durch modifizierte anti-CD20-Antikörper.

Non-Hodgkin-Lymphome können anhand klinischer Gesichtspunkte in aggressive und indolente Lymphome unterteilt werden (HIDDEMANN ET AL. 1996). Aggressive Lymphome sind rasch fortschreitende Erkrankungen, die unbehandelt in kurzer Zeit zum Tod des Patienten führen. Durch den Einsatz moderner Therapien sind sie prinzipiell heilbar. Bei indolenten Lymphomen ist der natürliche Verlauf der Erkrankung langsamer, jedoch gibt es hier bisher kaum kurative Therapieoptionen. Im Verlauf kommt es bei indolenten Lymphomen fast immer zum Rezidiv (WEISDORF ET AL. 1992; HIDDEMANN ET AL. 1996).

Hocheffiziente, moderne Immunchemotherapien bestehend aus einer Kombination monoklonaler Antikörper wie Rituximab mit verschiedenen Chemotherapeutika haben die Therapie aggressiver und indolenter B-Zell-Lymphome revolutioniert. Im Zuge dieser Therapierevolution kam es zu einer Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens der betroffenen Patienten (COIFFIER ET AL. 2002; SEHN ET AL. 2005; PFREUNDSCHUH ET AL. 2008). Dennoch gibt es auch bei den aggressiven Lymphomen eine Reihe von Patienten, die kein Ansprechen auf eine Therapie zeigen oder relabieren. Diese Patienten gehören zur Gruppe der Therapieversager. Bei Patienten mit diffusem großzelligen B-Zell-Lymphom, die größte Entität innerhalb der aggressiven Lymphome, liegt der Anteil der Therapieversager bei über 20 % (PFREUNDSCHUH ET AL. 2008). Bei Versagen der Erstlinien-Immunchemotherapie ist die Prognose aggressiver Lymphome schlecht und mit kurzer Überlebenszeit verbunden (HAGBERG UND GISSELBRECHT 2006; MARTIN ET AL. 2008; BORGERDING ET AL. 2010 a). Daher sind sowohl Verbesserungen der Erstlinientherapie zur Vermeidung eines Krankheitsprogress als auch Fortschritte im Bereich der Zweitlinientherapie nach Auftreten eines Rezidivs unbedingt notwendig.

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen handelt es sich um eine heterogene Gruppe lymphatischer Neoplasien, die bisher in vielen verschiedenen Klassifikationen anhand von klinischen, genetischen und immunphänotypischen Gesichtspunkten eingeteilt wurden (HARRIS ET AL. 1994; HIDDEMANN ET AL. 1996). Die aktuelle Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome erfolgt durch die World Health Organisation (WHO) anhand immunphänotypischer und genetischer Charakteristika (SWERDLOW ET AL. 2008). Unterteilt wird in B-Zell-Neoplasien und T-Zell-Neoplasien. In dieser Arbeit finden nachfolgende Zelllinien Verwendung, die ihren Ursprung in der Reihe der B-Zell-Neoplasien haben:

- Burkitt-Lymphome (BL)
- Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)
- Mantelzell-Lymphome (MCL).

Klinische und histologische Einteilungen können divergieren. Histomorphologisch weist das Mantelzelllymphom eher die typischen Charakteristika eines indolenten Lymphoms auf

(ZUKERBERG ET AL. 1993). Aufgrund des klinischen Verlaufs und der schlechten Prognose wird das Mantelzell-Lymphom bei klinischen Einteilungen jedoch zu den aggressiven Lymphomen gezählt. Nach der Einteilung von HIDDEMANN ET AL. aus dem Jahr 1996 können diese Entitäten somit zu den aggressiven (DLBCL, MCL) und zu den sehr aggressiven Lymphomen (BL) gezählt werden.

1.1.1 Burkitt-Lymphome

Drei verschiedene klinische Formen des Burkitt-Lymphoms sind bekannt. Zu ihnen zählen die endemische Form, die sporadische Form und die Immundefizienz-assoziierte Form. Obwohl sich diese Formen histologisch nicht unterscheiden lassen, gibt es doch Unterschiede was Epidemiologie, den klinischen Verlauf und genetische Gesichtspunkte angeht. Die endemische Variante betrifft insbesondere Kinder in der afrikanischen Äquatorialregion (BURKITT 1958). Die sporadische Form des Burkitt-Lymphoms stellt 30 % aller pädiatrischen Lymphome dar. Hingegen macht das Burkitt-Lymphom nur einen kleinen Teil (<1 %) aller adulten Non-Hodgkin-Lymphome aus (ANON. 1997). Die Therapie dieser sehr aggressiv verlaufenden Erkrankung besteht aus einer intensiven Polychemotherapie, bei der bis zu 90 % der Patienten in frühen Krankheitsstadien geheilt werden können (PATTE ET AL. 2007). Der Einsatz von Rituximab verbessert die Heilungsrate CD20-positiver Burkitt-Lymphome nochmals (THOMAS ET AL. 2006). Auch HIV-positive Patienten mit einem Immundefizienzassoziierten Burkitt-Lymphom profitieren von der Therapie mit Rituximab (DUNLEAVY ET AL. 2006; ORIOL ET AL. 2008).

1.1.2 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome

Mit einem Anteil von etwa 31 % sind die DLBCL die häufigsten aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome (ANON. 1997; ARMITAGE UND WEISENBURGER 1998). Anders als beim Burkitt-Lymphom treten DLBCL mit zunehmendem Alter häufiger auf und der Altersmedian liegt bei etwa 64 Jahren. Therapeutisch konnte durch eine Polychemotherapie bestehend aus Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®) und Prednisolon (CHOP) bei 44 % der Patienten ein krankheitsfreies Intervall von drei Jahren erzielt werden (FISHER ET AL. 1993). Die zusätzliche Gabe von Rituximab verbesserte das Gesamtüberleben der Patienten nochmals um etwa 10 % bis 15 % (COIFFIER ET AL. 2002; SEHN ET AL. 2005; PFREUNDSCHUH ET AL. 2008). Diese Verbesserung war unabhängig vom Alter der Patienten.

1.1.3 Mantelzell-Lymphome

Mantelzell-Lymphome umfassen etwa 6 % aller Non-Hodgkin-Lymphome (ANON. 1997; ARMITAGE UND WEISENBURGER 1998; SHIVDASANI ET AL. 1993), wobei nach aktueller Studienlage die Inzidenz in den USA zunimmt (ZHOU ET AL. 2008). Klinisch präsentieren sich Mantelzell-Lymphome häufig in weit fortgeschrittenen Stadien und mit ausgeprägten Lymphadenopathien. In etwa 25 % der Fälle zeigen sich Mantelzell-Lymphome initial durch extranodalen Befall. Häufig handelt es sich hierbei um den Befall des Gastrointestinaltraktes (ROMAGUERA ET AL. 2003). Auch ein leukämischer Verlauf ist möglich (FERRER ET AL. 2007). Darüber hinaus unterscheiden sich die Faktoren, die die Prognose bei Mantelzell-Lymphomen determinieren, maßgeblich von denen anderer Non-Hodgkin-Lymphome (HOSTER ET AL.

2008). Ähnlich uneinheitlich wie der Verlauf präsentiert sich die aktuelle Situation bei der Therapie. Sie besteht häufig aus Polychemotherapien in Kombination mit Rituximab (JERMANN ET AL. 2004; LENZ ET AL. 2005; NICKENIG ET AL. 2006). Unter herkömmlicher Therapie zeigen sich mittlere Überlebensraten von drei bis vier Jahren (CAMPO ET AL. 1999). Die Prognose des Mantelzell-Lymphoms ist somit trotz Therapie sehr schlecht. Deshalb wurde versucht, mit aggressiveren Therapieregimen die Prognose dieser Erkrankung zu verbessern. GEISLER ET AL. (2008) konnten zeigen, dass durch eine intensive Induktionstherapie mit hochdosiertem Cytarabin in Kombination mit Rituximab und anschließender autologer Stammzelltransplantation die Prognose der betroffenen Patienten verbessert werden kann. Durch diese Therapie konnte bei 65,9 % der Patienten ein progressionsfreies Intervall von sechs Jahren erreicht werden (GEISLER ET AL. 2008).

1.2 Lymphomtherapie

Die Behandlung maligner B-Zell-Lymphome mit monoklonalen anti-CD20-Antikörpern ist eines der erfolgreichsten Beispiele für den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Medizin. Seit der Zulassung von Rituximab im Jahr 1997 als monoklonaler chimärer Antikörper bei Patienten mit refraktären indolenten und follikulären Lymphomen ist Rituximab ein wesentlicher Bestandteil der Therapie aller B-Zell-NHL geworden. In Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika führt die Gabe von Rituximab bei aggressiven Lymphomen sowohl zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens als auch zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und der Heilungsrate (COIFFIER ET AL. 2002; PFREUNDSCHUH ET AL. 2008). Diese Verbesserung der Therapie betrifft neben den aggressiven Lymphomen auch indolente sowie andere maligne B-Zell-Lymphome (FORSTPOINTNER ET AL. 2006; BUSKE ET AL. 2009).

Trotz dieser Verbesserungen in der Therapie der B-Zell-Lymphome gibt es Patienten, die initial kein Ansprechen auf eine Immunchemotherapie mit Rituximab zeigen oder nach Erreichen einer kompletten Remission ein Rezidiv erleiden (HAGBERG UND GISSELBRECHT 2006; BORGERDING ET AL. 2010 a).

Bei der Behandlung von älteren Patienten (>60 Jahre) mit diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen mit und ohne Rituximab im Chemotherapieprotokoll konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben nach fünf Jahren durch die zusätzliche Gabe von Rituximab von 45 % auf 58 % verbessert wird (FEUGIER ET AL. 2005). Durch weiterentwickelte dosisdichte Therapieregime konnte in der RICOVER-60-Studie durch sechsmalige Gabe von Rituximab in Kombination mit CHOP alle 14 Tage ein verbessertes Gesamtüberleben von 78,1 % aller Patienten über drei Jahre erzielt werden (PFREUNDSCHUH ET AL. 2008).

Zur Risikiostratifizierung wird bei aggressiven Lymphomen der Internationale Prognostische Index (IPI) und der altersadaptierte IPI eingesetzt. Hierzu werden vier Gruppen mit niedrigem, intermediär-niedrigem, intermediär-hohem und hohem Risiko festgelegt. Anhand der Gruppeneinteilung wird eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission, des Rezidiv-freien Überlebens und des Gesamtüberlebens getroffen (SHIPP ET AL. 1993). Die Einteilung in diese vier Gruppen erfolgt zunächst abhängig vom Alter. Bei Patienten >60 Jahre erfolgt die Einteilung anhand des Tumor-Stadiums (Ann-Arbor), der Serum-

Laktatdehydrogenase, des Performance-Status (ECOG) und der Anzahl der Orte mit extranodalem Befall (SHIPP ET AL. 1993). Bei Patienten <60 Jahre wird lediglich die Serum-Laktatdehydrogenase, das Tumor-Stadium (Ann-Arbor) und der Performance-Status (ECOG) zur Risikostratifizierung hinzugezogen (SHIPP ET AL. 1993). Neben dem klassischen IPI gibt es inzwischen weiterentwickelte Formen und Unterformen (SEHN ET AL. 2007; HOSTER ET AL. 2008). Mit Hilfe des IPI wird zum einen die Vergleichbarkeit klinischer Studien gewährleistet. Zum anderen können auf der Grundlage des IPI individuelle Therapieentscheidungen getroffen werden (SHIPP ET AL. 1993).

Die Einteilung hilft, Hochrisikopatienten mit einer schlechten Prognose zu definieren. Bei wurde zusätzlich die Therapieoption Hochrisikopatienten einer initialen Hochdosischemotherapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation untersucht (GLASS ET AL. 2006). Eine Therapieverbesserung konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Vielmehr war das Gesamtüberleben bei der herkömmlichen Therapie (CHOEP-14 und Rituximab) mit 83,8 % besser als bei der Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation (MegaCHOEP und Rituximab) mit 75,3 % (SCHMITZ ET AL. 2009). Die kurative Bedeutung einer initialen Rituximab-Behandlung bei jungen Hochrisikopatienten konnte in dieser Studie erneut nachgewiesen werden. Die Differenz des Eventfreien Überlebens zwischen Patienten mit und ohne Rituximab-Behandlung betrug 27,1 % (SCHMITZ ET AL. 2009).

Obwohl dosisdichte Therapieformen und erhöhte Therapieintensität die Prognose verbessert und den Anteil kurativ behandelter Patienten erhöht haben, gibt es für Patienten, die initial mit Rituximab behandelt wurden und ein Rezidiv erleiden, bisher keinen zufriedenstellenden Therapiestandard (HAGBERG UND GISSELBRECHT 2006). Im Falle eines Therapieversagens ist die Prognose trotz erneuter, häufig eskalierend veränderter und in der Dosis erhöhter Immunchemotherapie-Protokolle sehr schlecht (HAGBERG UND GISSELBRECHT 2006; WEIDE ET AL. 2007). Das mittlere progressionsfreie Überleben beträgt bei Patienten mit MCL und eskaliertem Therapieregime etwa zehn Monate (RUAN ET AL. 2010). Dies gilt auch für Patienten mit anderen aggressiven B-Zell-Lymphomen und insbesondere für Patienten, die initial kein Ansprechen auf eine Therapie zeigen (BORGERDING ET AL. 2010 a).

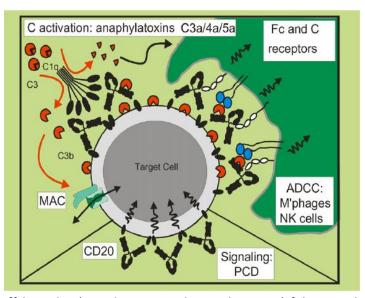
Prognostisch handelt es sich bei dem MCL vergleichend mit dem DLBCL um eine ungünstigere Entität (BORGERDING ET AL. 2010 a). Anders als bei dem DLBCL sind hier die bedeutenden Risikofaktoren Alter, Performance-Status (ECOG), Serum-Laktatdehydrogenase, Leukozytenzahl und Zell-Proliferationsindex KI-67. Diese wurden im Mantelzell-Lymphom Prognose-Index (MIPI_b) zusammengefasst (HOSTER ET AL. 2008). Der MIPI_b trifft eine bessere prognostische Aussage als der bisher verwendete IPI, welcher standardmäßig bei allen aggressiven Lymphomen Verwendung findet (HOSTER ET AL. 2008). Der MIPI_b könnte bei Therapieentscheidungen, die die Aggressivität der Behandlung betreffen, eine entscheidende Rolle spielen (GEISLER ET AL. 2010). Eine Heilung des MCL ist bisher nur durch eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation zu erreichen (GEISLER ET AL. 2009).

Burkitt-Lymphome sind durch rasantes Wachstum und hohe Chemosensitivität gekennzeichnet (BLUM ET AL. 2004). Im Gegensatz zum MCL sind sie deshalb gut therapierbar. Bei adulten Patienten wird durch eine intensive Immunchemotherapie ein Gesamtüberleben von 50 % bis 70 % erreicht (BLUM ET AL. 2004). Bei pädiatrischen Patienten ist die Prognose im frühen Krankheitsstadium und bei adäquater Behandlung noch deutlich besser (PATTE ET AL. 2007). Im Rezidiv sind die Therapieoptionen beim BL limitiert und die Prognose ungünstig (BLUM ET AL. 2004; HESSELING ET AL. 2008).

Um die erfolgreiche Therapie von NHL durch monoklonale anti-CD20-Antikörper zu verbessern, den Anteil kurativ behandelter Patienten zu erhöhen und den Anteil von Patienten mit Therapieversagen zu senken, wurden neue Antikörper entwickelt. Zu diesen neuen optimierten anti-CD20-Antikörpern zählen Ofatumumab und GA101.

Bei der Optimierung dieser beiden neuen Antikörper handelt es sich um Verbesserungen im Bereich ihrer Hauptwirkmechanismen. Bisher sind drei Hauptmechanismen bekannt, die für die antitumorale Wirkung monoklonaler Antikörper verantwortlich sind (Abb. 1). Zu ihnen zählen: die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) und die direkte Zytotoxizität (PCD) eines Antikörpers.

Abbildung 1: Hauptwirkmechanismen monoklonaler anti-CD20-Antikörper. Nach Bindung des Antikörpers können nahe beieinander liegende Fc-Teile des Antikörpers C1q binden und so die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems bedingen. Aktivierung bewirkt die Freisetzung von Anaphylatoxinen (C3a, C4a und C5a) und Opsoninen (C3b). Diese Produkte der Komplementaktivierung fördern die Phagozytose und verstärken über die Bindung durch Komplementrezeptoren (C receptors) die Aktivität der Effektorzellen. Unter gewissen Umständen kann die Komplementaktivie-



rung zu der Bildung eines Membran-Angriffskomplex (*membrane attack complex*: MAC) führen und somit direkt die Lyse der Zielzelle einleiten. Ein weiterer Mechanismus basiert auf Effektorzellen. Effektorzellen (*M'phages*: Makrophagen, *NK-cells*: NK-Zellen) können mit Fcy-Rezeptoren an die Fc-Rezeptoren (*Fc receptors*) von Antikörpern binden und die Zielzelle lysieren (ADCC: *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*; antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität). Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die Antikörper-Bindung des CD20-Moleküls (CD20) eine Signalkaskade initiiert wird. Sie endet mit dem programmierten Zelltod der Zielzelle (PCD: *programmed cell death*; programmierter Zelltod) (Modifiziert nach GLENNIE ET AL. 2007, S. 3824).

1.2.1 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) beschreibt das Binden einer Effektorzelle an eine durch einen Antikörper opsonierte Zielzelle. Es handelt sich somit um einen humoral-zellulären Abwehrmechanismus des Immunsystems, bei dem unterschiedliche Effektorzellen die opsonierten Zielzellen abtöten.

Zu den Effektorzellen gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Monozyten und Granulozyten. Durch Stimulation dieser Zellen mit Interleukin-2 (IL-2) kommt es zu einer Steigerung der ADCC-Aktivität (ORTALDO ET AL. 1987; GOLAY ET AL. 2003). Voraussetzung für die ADCC-Vermittlung ist die Expression eines Fc-Rezeptors der Effektorzelle, welcher mit dem Fc-Teil des Antikörpers interagiert. Diese Verbindung führt zur Freisetzung von Immunstimulanzien wie Zytokinen und Chemokinen sowie zur Freisetzung von zytotoxischen Granula. Die in den Granula enthaltenen Perforine führen zur Bildung einer Pore in der Zellmembran der Zielzelle. Durch diese dringen Granzyme ein. Granzyme sind Proteasen, die vornehmlich Apoptose in den Zielzellen induzieren (SMYTH ET AL. 2005).

Insbesondere NK-Zellen fungieren über diesen Mechanismus als Effektorzellen und sind wesentlich an der Lyse von Tumorzellen beteiligt (SUNG ET AL. 1995). Dies gilt auch für die NK-Zell-bedingte Tumorlyse nach Opsonierung von CD20-positiven Lymphomzellen durch monoklonale Antikörper wie Rituximab (GOLAY ET AL. 2003). Weiterführend konnten LOPES DE MENEZES ET AL. (2007) die zentrale Rolle von NK-Zellen bei der ADCC und den Stellenwert der IL-2-Stimulation durch *in-vivo*-Beobachtungen in einem Xenograft-Modell bestätigen.

NK-Zellen gelten als Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Anders als B- und T-Lymphozyten sind NK-Zellen in der Lage, ohne vorherige Stimulation Tumorzellen und virusbefallene Zellen zu lysieren (WHITESIDE UND HERBERMAN 1995; VUJANOVIC ET AL. 1995; CERWENKA UND LANIER 2001).

Die NK-Zell-Regulation basiert auf einem komplexen Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Signale, die über verschiedene Rezeptoren vermittelt werden (MORETTA ET AL. 2002). Ein starkes aktivierendes Signal wird über die Interaktion des Fcy-Illa-Rezeptors (CD16) der NK-Zelle mit dem Fc-Teil eines gebundenen Antikörpers vom Typ IgG vermittelt. Die Bindung resultiert in der Degranulation der NK-Zellen (FISCHER ET AL. 2006). Neben diesem aktivierenden Mechanismus gibt es zusätzlich aktivierende Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR). Aktivierende KIR können ebenfalls die NK-Zell Wirkung verstärken. Darüber hinaus besitzen sie klinische Relevanz. Dem aktivierenden KIR 2DS2 wird eine protektive Wirkung bezüglich des Auftretens von akuten lymphoblastischen Leukämien im Kindesalter beigemessen (ALMALTE ET AL. 2011).

Diesen aktivierenden Mechanismen stehen inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen gegenüber. Zu ihnen zählen ebenfalls Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und der Lectin-ähnliche Rezeptor CD94 / NKG2A. Im Gegensatz zum Fcy-IIIa-Rezeptor, der auf allen NK-Zellen zu finden ist, sind die KIR-Rezeptoren und die Lectin-ähnlichen Rezeptoren auf den

NK-Zellen unterschiedlich verteilt. Sowohl die Expression als auch das vollständige Fehlen aller KIR-Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche ist möglich (VILCHES UND PARHAM 2002).

Die Inhibition der NK-Zellen durch Aktivierung inhibierender Rezeptoren erfolgt entweder über die Bindung an das klassische HLA-Klasse-I-Molekül oder an das nicht-klassische HLA-Ib-Molekül HLA-E. Die HLA-Expression einer Zelle kann durch Virusbefall und maligne Transformation fehlen oder verändert sein. Dies hat ein Fehlen oder eine Veränderung der HLA-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche zur Folge. Durch die fehlende Aktivierung inhibierender Signale kommt es zu einer NK-Zell-Aktivierung und zur Lyse der betroffenen Zelle (CERWENKA UND LANIER 2001). Neben der Antikörper-unabhängigen NK-Zell-Aktivierung untersteht auch die ADCC-Vermittlung diesen inhibierenden Signalen. Die Inhibition kann jedoch durch das starke aktivierende Signal der ADCC überwunden werden (BORGERDING ET AL. 2010 b).

1.2.2 Komplementvermittelte Zytotoxizität

Ein weiterer Mechanismus ist die komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC). CDC beschreibt die Aktivierung der Komplementkaskade durch monoklonale Antikörper, die in ihrer Endstrecke zur Tumorzelllyse führt. Neben der Tumorlyse durch einen Membranangriffskomplex ist die Aktivierung der inflammatorischen Kaskade ein wichtiger Effekt der CDC.

Insbesondere neuere Typ-I-anti-CD20-Antikörper wie Ofatumumab sind in der Lage, komplementbedingt Tumorzelllyse zu induzieren (TEELING ET AL. 2004; TEELING ET AL. 2006). Die komplementvermittelte Zytotoxizität ist als Mechanismus jedoch nicht immer wirksam, sondern vom histologischen Typ des B-Zell-Lymphoms abhängig (MANCHES ET AL. 2003). Welche Rolle CDC bei der Tumorlyse *in vivo* tatsächlich spielt, wird kontrovers diskutiert (WENG UND LEVY 2001; UCHIDA ET AL. 2004; WANG ET AL. 2008).

1.2.3 Direkte Zytotoxizität

Ein ebenfalls bekannter Wirkmechanismus von anti-CD20-Antikörpern ist die direkte Zytotoxizität, welche den programmierten Zelltod (PCD) induziert. Hierbei bindet lediglich der Antikörper an die Zelloberfläche der Zielzelle und ruft auf diese Weise einen antitumoralen Effekt hervor. Bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) konnte eine Aktivierung verschiedener Caspasen direkt nach der Gabe von Rituximab nachgewiesen werden, die die Induktion von Apoptose anzeigen (BYRD 2002).

Insbesondere bei den neuen Typ-II-anti-CD20-Antikörpern der dritten Generation soll die direkte Zytotoxizität stark ausgeprägt sein (MÖSSNER ET AL. 2010). Zu ihnen zählt der in dieser Arbeit untersuchte anti-CD20-Antikörper GA101. Die Analyse des genauen Vorgangs auf molekularer Ebene nach Bindung von GA101 ist aktuell Gegenstand der Forschung. MÖSSNER ET AL. konnten 2010 zeigen, dass die durch den neuen anti-CD20-Antikörper GA101 hervorgerufene Zelltodinduktion Caspasen-unabhängig ist. Die Datenlage über die Relevanz und Ausprägung der direkten Zytotoxizität ist uneinheitlich (GOLAY ET AL. 2010; PATZ ET AL. 2011).

1.3 Modifizierte anti-CD20-Antikörper

Ofatumumab ist ein vollhumanisierter Typ-I-anti-CD20-Antikörper der zweiten Generation, bei dem die CDC durch Modifikationen am Fab-Teil verbessert wurde. Er bindet eine neue Region des CD20-Epitops, durch welche eine starke Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems induziert wird (TEELING ET AL. 2006). Im Vergleich zu Rituximab konnte bei Ofatumumab eine stärkere Bindung von C1q-Molekülen, welche den Ausgangspunkt des klassischen Weges der Komplementkaskaden-Aktivierung darstellen, beobachtet werden (PAWLUCZKOWYCZ ET AL. 2009). Ofatumumab ist für die Behandlung von Patienten mit B-CLL und Therapieresistenz gegenüber Fludarabin und Alemtuzumab von der *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMEA) zugelassen (COIFFIER ET AL. 2008; CHESON 2010). Aktuelle klinische Daten zeigen, dass B-Zell-CLL-Patienten auch nach einer Rituximab-haltigen Immunchemotherapie und Progression ihrer Erkrankung von einer erneuten Antikörpertherapie mit Ofatumumab profitieren (WIERDA ET AL. 2011).

GA101 ist als anti-CD20-Antikörper der dritten Generation vom Typ II sowohl am Fc-Teil als auch am Fab-Teil verändert (UMANA ET AL. 2006). Die Veränderung am Fc-Teil soll eine verstärkte Aktivierung der Effektorzellen bewirken und die ADCC-Wirkung des Antikörpers auf diese Weise verstärken (MÖSSNER ET AL. 2010). Die Veränderung am Fab-Teil hat zur Folge, dass GA101 gebunden an das CD20-Epitop trotz überlappender Erkennungsregionen mit Rituximab nach Bindung eine andere Konformation aufweist (NIEDERFELLNER ET AL. 2011). Diese Veränderung gilt als mögliche Erklärung für die verbesserte direkte Zytotoxizität von GA101 (NIEDERFELLNER ET AL. 2011). Neuen Erkenntnissen zu Folge soll dieser Mechanismus Caspasen-unabhängig sein (MÖSSNER ET AL. 2010) und stattdessen auf der Induktion von Aktin-abhängigem, lysosomal-vermitteltem Zelltod basieren (ALDUAIJ ET AL. 2011). GA101 ist aktuell Bestandteil eines Therapieprotokolls einer Phase-Ib-Studie zur Behandlung der B-CLL (GAO4779g).

1.4 Resistenzmechanismen

Wirkmechanismus des anti-CD20-Antikörpers	Resistenzmechanismus	Möglichkeit der Überwindung des Resistenzmechanismus
gültig für alle Wirk- mechanismen	Verlust der CD20-Expression (DAVIS ET AL. 1999; FORAN ET AL. 2001; MAESHIMA ET AL. 2009)	höhere Dosis; höhere Verab- reichungsfrequenz
	schlechte Gewebe- / ZNS- Penetration des Antikörpers (TAI ET AL. 2011; GAUDIO ET AL. 2011)	zusätzliche intrathekale Therapie; Veränderung der Antikörpereigen- schaften; effektivere Antikörper; Antikörper-Fragmente
	Freisetzung von CD20+ Exosomen / Abfangen der Antikörper vor dem Ando- cken an die Zelloberfläche (AUNG ET AL. 2011)	Inhibition der Exosomenbildung; effektivere Antikörper; höhere Anti- körperdosierung
ADCC	geringe NK-Zell-Menge / geringe NK-Zell-Aktivität (GLUCK ET AL. 2004)	Stimulation mit IL-2
	Fcy-Illa-Rezeptor- Polymorphismus (CARTRON 2002; WENG UND LEVY 2003; DALL'OZZO ET AL. 2004)	stärkere NK-Zell-Aktivierung durch effektivere Antikörper
	NK-Zell-Inhibition durch HLA-Klasse-I-Expression (BORGERDING ET AL. 2010 b)	stärkere NK-Zell-Aktivierung durch effektivere Antikörper; KIR-Inhibition
	die <i>shaving</i> -Reaktion (GRIFFIN ET AL. 1976; BEUM ET AL 2008; PEDERSEN ET AL 2011)	Infusion von NK-Zellen parallel zur Immuntherapie; Inhibition von Monozyten mit Hilfe von Antikör- pern; Stimulation mit IL-2
	Perforin- / Granzym- Inhibition (BIRD ET AL 1998; DE KONING ET AL. 2011)	
PCD / direkte Zytotoxizität	Bcl-2-Expression (ALAS ET AL.2002; BYRD 2002; STOLZ ET AL 2008)	Bcl-2-Inhibitoren
CDC	Komplementinhibition durch CD55 / CD59 (GOLAY ET AL.2000; DALLE ET AL.2009)	zielgerichtete Therapie gegen CD55 / CD 59

Tabelle 1: Zusammenfassung der Hauptwirkmechanismen monoklonaler anti-CD20-Antikörper mit potentiellen Resistenzmechanismen. Zusätzlich sind mögliche Ansätze zur Überwindung der Resistenzmechanismen aufgeführt.

Zahlreiche Resistenzmechanismen gegenüber Immuntherapien sind bisher beschrieben worden (Tab. 1). Ein Resistenzmechanismus, der alle drei Hauptwirkmechanismen monoklonaler anti-CD20-Antikörper betrifft, ist der CD20-Verlust bei B-Zell-Lymphomen. DAVIS ET AL. (1999) konnten bei einem Patienten mit einem B-Zell-NHL nach der zweimaligen Gabe von Rituximab einen vollständigen CD20-Verlust aller Lymphomzellen dieses Patienten nachweisen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten neben anderen histologischen Veränderungen der Lymphomzellen einen CD20-Verlust beschreiben (MAESHIMA ET AL. 2009). Insgesamt ist

ein solcher Verlust jedoch selten. FORAN ET AL. (2001) wiesen einen CD20-Verlust bei drei von 25 mit Rituximab behandelten Patienten nach. Zwei der drei Patienten zeigten jedoch weiterhin ein Ansprechen auf eine Rituximab-haltige Immunchemotherapie (FORAN ET AL. 2001).

Neben dem Verlust der Zielstruktur CD20 gibt es Resistenzmechanismen, die schon vor dem Anbinden des Antikörpers Rituximab an das Zielmolekül CD20 eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählt eine schlechte Gewebepenetration. TAI ET AL. konnten 2011 anhand einer retrospektiven Studie zeigen, dass die Behandlung mit Rituximab zwar eine deutliche Verbesserung des Gesamtüberlebens, jedoch keine Verbesserung bezüglich der ZNS-Rezidivrate bewirkt. Die unveränderte ZNS-Rezidivrate wurde mit der eingeschränkten Penetration des ZNS durch Rituximab in Verbindung gebracht. Große Tumormassen (*bulky disease*) sind prognostisch ungünstig bei Patienten mit DLBCL. Der Grund für die schlechte Prognose liegt möglicherweise neben einer anderen Biologie auch hier an der schlechten Penetration des Tumorgewebes durch Rituximab (GAUDIO ET AL. 2011).

Ein weiterer Resistenzmechanismus, der ein Binden des Antikörpers an die Zielzelle verhindert, ist eine Exosomen-Bildung maligner NHL. Exosomen sind von der Zellmembran abgeschnürte CD20-positive Vesikel. Es erscheint möglich, dass anti-CD20-Antikörper vor dem Binden an die Zielzelle durch Exosomen abgefangen und in ihrer Wirkung gehemmt werden (AUNG ET AL. 2011).

Die Anzahl der NK-Zellen im peripheren Blut und deren Aktivierungsstatus korreliert mit dem Ansprechen auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Durch Stimulation mit IL-2 wird die Anzahl der NK-Zellen erhöht, die ADCC verstärkt und das klinische Ansprechen auf Rituximab verbessert (GLUCK ET AL. 2004).

Ein Rezeptorpolymorphismus des Fcy-Illa-Rezeptors ist assoziiert mit einer geringeren Aktivierbarkeit von NK-Zellen durch Antikörper. Der Austausch der Aminosäure Valin (V) durch Phenylalanin (F) an Aminosäure-Position 158 führt zu einer verminderten Bindungsaffinität zwischen Fc-Teil des Antikörpers und dem Fcy-Illa-Rezeptor der NK-Zelle. Dies hat eine geringere Aktivierung der NK-Zelle zur Folge. Hieraus resultiert ein geringeres Ansprechen auf eine Therapie mit Rituximab (CARTRON 2002; WENG UND LEVY 2003; DALL'OZZO ET AL. 2004). Das geringere Ansprechen auf eine humorale Therapie bei Vorliegen eines solchen Rezeptorpolymorphismus unterstreicht die Bedeutung der ADCC bei der Elimination von B-Zell-Lymphomen.

NK-Zell-Aktivität und die damit in direktem Zusammenhang stehende Effektivität der ADCC wird durch aktivierende und inhibierende Signale reguliert. Die Inhibition von NK-Zellen ist bedingt durch die Interaktion von HLA-Klasse-I-Molekülen der Zielzellen mit den inhibierenden Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) der NK-Zellen. Deaktivierung von NK-Zellen durch die Hochregulation und Bindung der HLA-Klasse-I-Moleküle an inhibierende KIR ist ein beschriebener Resistenzmechanismus und eine mögliche Ursache für das Versagen einer humoralen Immuntherapie (BORGERDING ET AL. 2010 b). Eine stärkere NK-Zell-Aktivierung könnte zur Überwindung dieses Resistenzmechanismus führen und zu einer

Verbesserung des klinischen Ansprechens auf eine Immuntherapie beitragen. Da der ADCC-Regulation ein Gleichgewicht aktivierender und inhibierender Signale zugrunde liegt, scheint es möglich, dieses Gleichgewicht durch modifizierte Antikörper in Richtung Aktivierung zu verschieben und auf diese Weise die Effektivität der ADCC zu verbessern.

Eine weitere Ursache für einen Effektivitätsverlust einer Immuntherapie ist die Beteiligung von Monozyten an der ADCC. Anders als bei NK-Zellen führt das Binden von Monozyten nicht zur Lyse der durch Rituximab opsonierten Lymphomzellen, sondern zu einem Verlust des CD20-Oberflächenmoleküls inklusive des gebundenen Antikörpers (GRIFFIN ET AL. 1976; BEUM ET AL. 2008; PEDERSEN ET AL. 2011). Dieser Vorgang wird als Trogozytose (*shaving*) bezeichnet und konnte bei der BL-Zelllinie Daudi opsoniert durch Rituximab *in vitro* nachgewiesen werden (BEUM ET AL. 2008). Eine Möglichkeit zur Überwindung dieses Resistenzmechanismus könnte in der simultanen Verabreichung von vorher gespendeten NK-Zellen zur Immunchemotherapie liegen (BEUM ET AL. 2008).

BIRD ET AL. (1998) konnten eine NK-Zell-Inhibition durch die Sezernierung von Serinproteasen-Inhibitoren beschreiben. Zu den Serinproteasen zählt unter anderem das von NK-Zellen in zytotoxischen Vesikeln sezernierte Granzym-B. DE KONING ET AL. (2011) griffen diese Möglichkeit der NK-Zell-Inhibition weiterführend für andere Serinproteasen wieder auf und zeigten, dass die Inhibition von verschiedenen Serinproteasen ein möglicher Resistenzmechanismus von Tumoren gegenüber einer NK-Zell-Attacke ist.

Auch gegen den Apoptose induzierenden, antiproliferativen Effekt (PCD) von Rituximab gibt es bekannte Resistenzmechanismen. Hierzu zählt die Expression von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (BYRD 2002). Dieser Resistenzmechanismus könnte durch Inhibition dieser Proteine überwunden werden (STOLZ ET AL. 2008).

CDC kann durch die Expression von Komplementinhibitoren wie CD55 und CD59 beeinflusst werden (GOLAY ET AL. 2000; DALLE ET AL. 2009). In den Versuchen von DALLE ET AL. (2009) ging die Überexpression von CD59 in einer Subpopulation der untersuchten B-Lymphomzellen mit einem schlechteren Ansprechen auf Rituximab einher.

Einerseits konnte beim *in-vivo*-Vergleich zwischen ADCC und direkter Zytotoxizität (PCD) von Ofatumumab und Rituximab gezeigt werden, dass ADCC der wichtigste Wirkmechanismus monoklonaler Antikörper ist (DE HAIJ ET AL. 2010). Andererseits existieren viele mögliche Resistenzmechanismen, die die Effektivität der ADCC in ihrer Wirkung einschränken (Tab. 1). Ob die neu entwickelten anti-CD20-Antikörper *in vitro* und *in vivo* die Resistenzmechanismen maligner B-Zell-Lymphome besser überwinden können als der etablierte Antikörper Rituximab, ist aktuell Gegenstand zahlreicher Studien. Insbesondere in Hinblick auf die ADCC fehlt es hierzu noch an validen Daten.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Trotz deutlicher Fortschritte in der Therapie von Lymphomen sind insbesondere im Rezidiv und bei Hochrisiko-Konstellationen die Prognosen betroffener Patienten häufig infaust. Ein Therapiestandard ist für Patienten im Rezidiv bisher noch nicht definiert (HAGBERG UND GISSELBRECHT 2006; MARTIN ET AL. 2008; BORGERDING ET AL. 2010 a). Deshalb ist es notwendig, dass neue, innovative Therapiestrategien Einzug in die Klinik halten. Modifizierte Antikörper stellen hierfür einen erfolgversprechenden Ansatz dar.

Mit dieser Arbeit soll der mögliche Nutzen einer Therapie mit modifizierten anti-CD20-Antikörpern *in vitro* abgeschätzt und in verschiedenen Lymphom-Modellen experimentell untersucht werden.

Es gilt, die folgenden Fragen experimentell zu prüfen:

- a) Ist es möglich, einen unterschiedlichen Effekt zwischen den Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und GA101 bezogen auf die direkte Zytotoxizität (PCD) *in vitro* zu quantifizieren? Wenn das der Fall ist, ist dann GA101 den anderen Antikörpern in dieser Kategorie überlegen?
- b) Gibt es einen Unterschied zwischen den drei anti-CD20-Antikörpern bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) *in vitro*? Wenn das der Fall ist, ist dann GA101 den anderen Antikörpern in dieser Kategorie überlegen?
- c) Wie sind mögliche Unterschiede zwischen den drei anti-CD20-Antikörpern zu erklären?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaugsystem EcoVac Schütt Labortechnik, Göttingen

Analysewaage Sartorius, Göttingen

CASY® DT Zellzähler Schärfe System Reutlingen

CO₂ – Inkubator HERA cell Heraeus, Osterode

Dampfsterilisator Varioklav® Thermo Scientific, Karlsruhe

Eismaschine Ziegra, Isernhagen

FACScan® Becton Dickinson, Heidelberg

Gefrierschränke -80 °C, -150 °C Sanyo, Wiesloch

-20 °C Liebherr, Biberach

Handystep Brand Laborbedarf, Gießen

Kryoboxen Nalgene Labwear, Rochester (USA)

MACS-Separator Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Mikroskope Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen

Labovert FS, Leitz, Oberkochen

Standard 25, Zeiss, Oberkochen

Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm², Brand Gläser, Wertheim

Pipetten Einfach-Pipetten (10 μl, 200 μl, 1000 μl), Eppen-

dorf, Hamburg

Mehrkanal Pipette (50 μl), Thermolab Systems,

Egelsbach

Pipettus Accu-Jet Pro, Brand Laborbedarf, Gießen

Rollen-Mischgerät RM5 Karl-Hecht GmbH & Co. KG, Sondenheim

Sterilbank HERA safe Heraeus, Osterode

Vortex-Genie[®] Scientific Industries, Bohemia (USA)

Wipptisch, SSL4 (Stuart) Barloworld Scientific, Staffordshire, Great Britain

Zentrifugen Multifuge 3, Heraeus, Osterode

Megafuge, 1.0R, Heraeus, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platten Cellstar, Greiner Bio-one

96-Well-Rundbodenplatten Falcon BD, Labware, New Jersey, USA

13-ml-Röhrchen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

50-ml-Falcon-Röhrchen Becton Dickinson , New Jersey, USA

Auslaufpipetten

5 ml
10 ml
25 ml
Falcon BD Labware, New Jersey, USA

Kanülen B. Braun AG, Melsungen

Kryoröhrchen 1,8ml Nalgene Labwear, Rochester (USA)

CASY®-Röhrchen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

FACS-Röhrchen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Latex-Handschuhe Paul Hartmann AG, Heidenheim

MACS-Trennsäule LS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Perfusorspritzen 50 ml B. Braun AG, Melsungen

Pipettenspitzen

 $\begin{array}{c} 0,1-10~\mu l \\ 2-100~\mu l \\ 100-1000~\mu l \end{array} \right\} \hspace{0.5cm} \text{Sarstedt AG \& Co.,N\"umbrecht}$

Sammelröhrchen Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zellkulturflaschen Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.1.3 Reagenzien / Chemikalien

2-Mercaptoethanol Merck, KgaA, Darmstadt

3,3 Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat Sigma, Deisenhofen

Ameisensäure Merck, KgaA, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma, Deisenhofen

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Sigma, Deisenhofen

FACSFlow™ Becton Dickinson, Heidelberg

Fötales Kälberserum (FKS) Biochrom AG, Berlin

Hepes Sigma, Deisenhofen

Isopropanol J. T. Baker, Griesheim

Kaliumchlorid Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat Merck, Darmstadt

Lymphoprep Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Monensin Sigma, Deisenhofen

MTT Sigma, Deisenhofen

Natriumchlorid Merck, Darmstadt

Natriumcitrat Sigma, Deisenhofen

Natriumdihydrogenphosphat Merck, Darmstadt

Natriumfluorid Merck, Darmstadt

Penicillin-Streptomycin (10000 U / ml) Invitrogen, Karlsruhe

Phosphate Buffered Saline (PBS) Sigma, Deisenhofen

Propidium-lodid (PI) Sigma, Deisenhofen

Triton X-100 Sigma, Deisenhofen

Trypan-Blau (0,4 %) Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Medikamente

Heparin-Natrium (25000 IE) Ratiopharm®, Ulm

Interleukin-2 PAN-Biotech GmbH, Aidenach

2.1.5 Kits

NK Cell Isolation Kit II Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

2.1.6 Antikörper

<u> </u>				
Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller	
CD3	UCHT1	FITC	BD Pharmingen	
CD16	3G8	PE	BD Pharmingen	
CD20	2H7	PE	BD Pharmingen	
CD56	B195	FITC	BD Pharmingen	
CD107a	H4A3	PE-Cy5	BD Pharmingen	

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

2.1.7 Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium beinhaltete RPMI 1640 mit 25mM Hepes und GlutaMAX® als Grundsubstanz. Hinzugefügt wurden 1 % Penicillin / Streptomycin und abhängig von der Zelllinie, für die das Medium Verwendung finden sollte, 10 % - 20 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS).

Die Hitzeinaktivierung des FKS erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für 30 min und anschließender Sterilfiltration.

2.1.8 Evaluierte anti-CD20-Antikörper

2.1.8.1 Rituximab

Der zugelassene anti-CD20 Antiköper Rituximab wird unter dem Namen MabThera® von der Firma Roche GlyCart in einer Konzentration von 10 mg / ml vertrieben.

2.1.8.2 GA101

GA101 wurde von der Firma Roche GlyCart zur Verfügung gestellt. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 10 mg / ml vor.

2.1.8.3 Ofatumumab

Der Antikörper Ofatumumab wird unter dem Namen Arzerra® als 100 mg Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung von der Firma GlaxoSmithKline vertrieben. Der Antikörper Ofatumumab lag aliquotiert in einer Konzentration von 20 mg / ml vor und wurde anschließend auf eine Konzentration von 0,5 mg / ml eingestellt.

2.1.9 Zelllinien

Entität	Zelllinie	Herkunft	Referenz
BL	Raji	DSMZ, Braunschweig	Pulvertaft, 1964
	Ramos	DSMZ, Braunschweig	KLEIN ET AL. 1975
DLBCL	SuDHL-4	DSMZ, Braunschweig	EPSTEIN ET AL. 1976
	Balm-3	DSMZ, Braunschweig	L OK ET AL. 1979
	Karpas-422	DSMZ, Braunschweig	DYER ET AL. 1990
MCL	Mino	ATCC, Wesel	L AI ET AL. 2002
	Jeko	ATCC, Wesel	JEON ET AL. 1998
	Granta-519	DSMZ, Braunschweig	JADAYEL ET AL.1997
T-NHL	Jurkat	DSMZ, Braunschweig	SCHNEIDER ET AL. 1977
	CCRF-CEM	DSMZ, Braunschweig	FOLEY ET AL. 1965

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

2.1.10 EDV

CellQuest pro 5.2 Becton Dickinson, Heidelberg

FlowJo 5.7.2 Tree Star Inc., Ashland (USA)

GraphPad Prism®5.03 für Windows GraphPad Software, San Diego California (USA)

Inkscape 0.48.1 Inkscape Community, Lizenz-freie Software

GIMP 2.6 Jernej Simoncic, Lizenz-freie Software

Microplate Manager 2.6 BioRad, München

Office 2007 Microsoft, Redmond (USA)

WinMDI 2.9 Joseph Trotter, Lizenz-freie Software

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivieren von Zellen

Die in Tabelle 2 genannten Zelllinien wurden in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert und alle zwei bis vier Tage mit frischem Kulturmedium (1610 RPMI, 10 % Penicillin / Streptomycin, 10 % / 20 % FKS) versorgt und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 ausgedünnt. Mykoplasmenbefall wurde regelmäßig ausgeschlossen.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium 90 % FKS

10 % DMSO

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5x10⁶ / ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium gelöst und in Kryoröhrchen überführt. In einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox wurde die Zellsuspension zunächst über 24 h bei -80 °C eingefroren und anschließend bei -150 °C gelagert.

2.2.3 Revitalisieren von Zellen

Zum Revitalisieren der Zellen wurde zunächst das entsprechende Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C angetaut und anschließend in ein 12 ml PBS enthaltendes Plastikröhrchen überführt, bei 300 x g zentrifugiert und das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Durch diesen Waschschritt konnten die Zellen vom DMSO getrennt werden. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

CASY-Puffer 135 mM NaCl

1 mM EDTA 5 mM KCl

 $45 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ $11 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$

7 mM NaF

Dem Prinzip der CASY® Messung liegt eine elektronische Pulsflächenanalyse zugrunde. Hierbei wird der gemessene Widerstand einer durch eine Kapillare angesaugten Probe mit einer im Gerät gespeicherten Eichkurve für Widerstände verschiedener Zellreihen verglichen und anhand dessen die Zellzahl bestimmt.

Hierzu wurde die Zellprobe 1:1000 mit CASY-Puffer verdünnt und anschließend gemessen. Die ermittelte Konzentration wurde nachfolgend mit dem Ausgangsvolumen multipliziert und so die absolute Zellzahl der Probe ermittelt

Als Alternative oder zur Überprüfung des ermittelten Ergebnisses konnte die Probe auch manuell mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt werden. Hierzu wurde die Zellprobe mit Trypan-Blau verdünnt und anschließend auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und

ausgezählt. Die Trypan-Blau Färbung ermöglichte es, die Kontinuität der Zellmembran zu überprüfen und somit tote Zellen, die sich blau färbten, zu erkennen.

2.2.5 NK-Zell-Aufreinigung

Aus dem peripheren Blut gesunder, freiwilliger Spender erfolgte eine immunmagnetische Aufreinigung der NK-Zellen. Da NK-Zellen zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) gezählt werden, erfolgte die Gewinnung der NK-Zellen in zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltete die Gewinnung der PBMNC mittels Dichtezentrifugation. Im zweiten Schritt erfolgte die Gewinnung der NK-Zellen aus den PBMNC durch immunmagnetische negativ-Depletion. Hierzu wurden alle Bestandteile der PBMNC, die nicht zu den NK-Zellen gezählt werden, mit entsprechenden Antikörpern markiert und magnetisch separiert.

2.2.5.1 Präparation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Nach peripherer Venenpunktion wurde das gewonnene Blut sofort mit 500 IE Heparin vermischt und somit die Gerinnung gehemmt. Danach wurde das Blut auf eine entsprechende Anzahl von 50-ml-Falcon-Röhrchen verteilt und in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS vermischt. Anschließend wurde mit diesem Gemisch je 15 ml Ficoll-Lösung überschichtet, welches zuvor in 50-ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt worden war. Nach 20 min Zentrifugation bei 800 x g ohne Bremse bildete sich eine Interphase aus, die die mononukleären Zellen enthielt. Diese Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS zweimal bei 600 x g und 300 x g gewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

2.2.5.2 Negativ-Depletion

MACS-Puffer PBS

2 mM EDTA 0,5 % BSA

Das Koppeln von Antikörpern an magnetische Partikel stellt die Grundlage der magnetischen Separation dar. Die spezifische Bindung gekoppelter Antikörper ermöglicht es Zellen magnetisch zu markieren und nachfolgend mit Hilfe eines starken Magnetfeldes zu separieren.

1 x 10 8 Zellen wurden hierzu in 100 μl Biotin-Antibody-Cocktail und 400 μl MACS-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 4 $^\circ$ C auf einem Rollen-Mischgerät inkubiert. Dieser Schritt diente zum Markieren der T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten mit dem Biotin-konjugierten Antikörper. Danach folgte die Kopplung dieser markierten Zellen mit anti-Biotin MicroBeads. Hierzu wurde pro 1 x 10 8 Zellen 200 μl anti-Biotin MicroBeads und 300 μl MACS-Puffer zu den markierten Zellen hinzugegeben und diese Zellsuspension weitere 15 min bei 4 $^\circ$ C inkubiert. Die markierten Zellen sowie die unmarkierten NK-Zellen wurden dann auf eine MACS-Trennsäule vom Typ LS gegeben, die vorher am Magneten befestigt worden war. Die NK-Zellen blieben nach dem Lauf durch die Trennsäule als Negativfraktion im Sammelröhrchen übrig. Die so gewonnenen NK-Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 5 x 10 6 / ml eingestellt. Über Nacht wurden die NK-Zellen mit 100 U IL-2 pro 1 x 10 6 NK-Zellen stimuliert.

2.3 MTT-Test

MTT-Reagenz 1 0,05 g MTT und 10 ml PBS

MTT-Reagenz 2 33 % [v/v] DMSO

5 % [v/v] Ameisensäure 62 % [v/v] Isopropanol

Der MTT-Test diente zur Überprüfung der alleinigen Wirkung der anti-CD20-Antikörper auf den Zellstoffwechsel der Zelllinien. Als Kontrollwert diente eine unbehandelte Probe.

Das Prinzip, welches dem MTT-Test zu Grunde liegt, besteht in der Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTT-Salzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in einen violetten, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff (DENIZOT UND LANG 1986). Die Umsetzung ist nur in intakten Zellen möglich. Die Absorption des entstandenen violetten Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Da Dehydrogenasen nur in vitalen Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Viabilität der Zellen.

Die Absorption des umgesetzten Farbstoffes wurde nach Lösung durch Zugabe des MTT-Reagenz 2 im ELISA-Reader quantifiziert.

Der MTT-Test wurde auf 96-Well-Rundbodenplatten durchgeführt. In jedes Well wurden $100~\mu l$ mit je $1~x~10^5$ Zellen sowie $100~\mu l$ der vorbereiteten doppelt konzentrierten Arbeitslösung eines der drei anti-CD20-Antikörper gegeben. Dabei wurde jede Probe als Triplikat angesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation, wurden jeder Probe $10~\mu l$ MTT-Reagenz 1~zugegeben und der Ansatz wurde für weitere 4~h unter den gewöhnlichen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 300~x~g für 15~min in der Multifuge 3~bei Raumtemperatur pelletiert, der Überstand mit der Mehrkanalpipette vorsichtig abgenommen und anschließend $100~\mu l$ MTT-Reagenz 2~hinzugegeben. Bis zum Erreichen einer homogenen Lösung in den Wells wurden die 96-Well-Platten auf dem Wipptisch geschwenkt.

Zur Auswertung wurde nach Leerwertbereinigung die spezifische Viabilität als Quotient aus dem mittleren Absorptionswert der behandelten Proben und dem mittleren Absorptionswert der unbehandelten Proben gebildet.

2.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des FACScan®-Durchflusszytometers ist es möglich, im Engwinkel zum Laserstrahl die Zellgröße und im rechten Winkel dazu die Zellgranularität zu bestimmen. Weiterhin werden die mit verschiedenen Fluroeszenzfarbstoffen markierten Zellen nach Anregung mit einem Laser durch die Emission von Licht sichtbar gemacht. Zur Markierung der Zellen dienen entweder Antikörper, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, oder Farbstoffe, die die Bestandteile der Zelle direkt anfärben.

Für die Messungen wurden drei verschiedene an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), der nach Anregung mit dem blaugrünen Argon-Laser des FACScan® der Wellenlänge 488 nm grünes Licht im Wellenlängenbereich von ca. 530 nm emittiert, Phycoerythrin (PE), der nach Anregung mit dem blaugrünen Argon-Laser orangenes Licht im Wellenlängenbereich von ca. 585 nm emittiert und Phycoerythrin-Cyanin-5 (PE-Cy5), der nach Anregung mit dem blaugrünen Argon-Laser rotes Licht im Wellenlängenbereich von ca. 650 nm emittiert.

Für die Messungen wurden zwei verschiedene, direkt färbende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Propidium-lodid (PI), ein interkalierender Farbstoff, der nach Anregung mit dem blaugrünen Argon-Laser orangerotes Licht im Wellenlängenbereich von ca. 600 nm emittiert und 3,3 Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO), ein Membranfarbstoff der nach Anregung mit dem blaugrünen Argon-Laser grünes Licht im Wellenlängenbereich von ca. 540 nm emittiert.

2.5 FACS-Zytotoxizitätstest

Die nach Kapitel 2.2.5 isolierten NK-Zellen dienten im FACS-Zytotoxizitätstest als Effektorzellen (Kapitel 2.2.5, S. 18). Als Zielzellen dienten die oben beschriebenen Lymphomzelllinien (Kapitel 2.1.9, S. 16). Gemessen wurde der Anteil an Propidium Iodid (PI)- und 3,3 Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat (DiO)-positiven Zielzellen (LEHMANN ET AL. 1999).

2.5.1 Zellmembranfärbung

Um die Zielzellen von den NK-Zellen im FACS-Zytotoxizitätstest sicher unterscheiden zu können, wurden die Zielzellmembranen mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff DiO angefärbt. Hierzu wurden pro 5 x 10^6 Zielzellen 5 μ l einer 3 mM Stocklösung verwendet und die Zellsuspension 20 min bei 37°C im Wasserbad angefärbt. Nach dem Färben wurden die Zellen zweimal mit PBS für jeweils 5 min bei 300 x g gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^6 / ml Kulturmedium eingestellt.

2.5.2 Ansatz des FACS-Zytotoxizitätstest

	Ausgangskon- zentration (AgK)	Arbeitskonzentra- tion (AK)	Zielkonzentra- tion (ZK)	Ansatz
Rituximab / GA101	10 mg / ml	1. 100 μg / ml	10 μg / ml	10 μl AgK + 990 μl Medi- um = 1.AK
		2. 10 μg / ml	1 μg / ml	100 μl 1.AK + 900 μl Medium = 2.AK
		3. 1 μg / ml	0,1 μg / ml	100 μl 2.AK + 900 μl Medium=3.AK
		4. 0,1 μg / ml	0,01 μg / ml	100 μl 3.AK + 900 μl Medium = 4.AK
		5. 0,01 μg / ml	0,001 μg / ml	100 μl 4.AK + 900 μl Medium= 5.AK
		6. 0,001 μg / ml	0,0001 μg / ml	100 μl 5.AK + 900 μl Medium = 6.AK
Ofatumumab	0,5 mg / ml	1. 100 μg / ml	10 μg / ml	200 μl AgK + 800 μl Me- dium = 1.AK
		2. 10 μg/ml	1 μg/ml	Nachfolgend entspre- chend dem Ansatz Rituximab / GA101

Tabelle 4: Verdünnungsreihe der anti-CD20-Antikörper für den Zytotoxizitätstest. 10 μ l der Arbeitskonzentration wurden den 100 μ l des Effektor-Zielzellgemisches zugefügt und somit die entsprechende Zielkonzentration, welche eine Zehnerpotenz niedriger war als die der Arbeitskonzentration, erreicht.

Die NK-Zellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^5 / ml Kulturmedium eingestellt. In vorher beschriftete FACS-Röhrchen wurden jeweils $50 \, \mu l$ der Effektorzellen und $50 \, \mu l$ der Zielzellen gegeben und 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO $_2$ inkubiert. Dies entspricht einem Effektor-Zielzellverhältnis von 1:2. Entsprechend der Tabelle wurden $10 \, \mu l$ der verschiedenen anti-CD20-Antikörper in verschiedenen Arbeitskonzentrationen den $100 \, \mu l$ des Effektor-Zielzellgemisches beigefügt und somit die Zielkonzentration der anti-CD20-Antikörper, die eine Zehnerpotenz niedriger lag, erreicht.

Die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen wurden auf der Basis der *in vivo* erreichbaren Antikörperkonzentrationen ausgesucht (MALONEY ET AL. 1997).

2.5.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zielzelllyse

Es wurde durchflusszytometrisch bestimmt, wie viele der DiO-angefärbten Zielzellen sich zusätzlich PI-positiv anfärbten. Dazu wurde das Durchflusszytometer so eingestellt, dass sich die Zielzellen in der Fluoreszenz-1 (FI-1, grün) deutlich von den ungefärbten Effektorzellen abgrenzen ließen. Die DiO-gefärbten Zielzellen ließen sich abhängig vom Grad der Apoptose zusätzlich mit PI anfärben und konnten somit in der Fluoreszenz-2 (FI-2, rot) von den viablen Zellen abgegrenzt werden. Auch die NK-Zellen ließen sich abhängig vom Anteil toter Zellen PI-positiv anfärben und in der Fluoreszenz-2 nachweisen. Zusätzlich wurde so kompensiert, dass die einzelnen Fluoreszenzen nicht in die jeweils anderen Kanäle überstrahlten (Abb. 2).

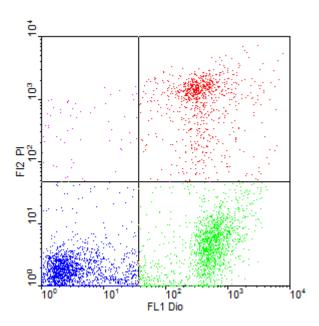


Abbildung 2: Dargestellt ist ein typisches Punktwolkendiagramm, wie es sich im FACS-Zytotoxizitätstest darstellen ließ. Es ist in vier Quadranten eingeteilt. Die Fluoreszenz-1 (Fl-1) ist auf der x-Achse aufgetragen und repräsentiert die Zellen, deren Membranen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiO markiert sind. Die Fluoreszenz-2 (Fl-2) ist auf der y-Achse aufgetragen und repräsentiert den Anteil der PI-gefärbten Zellen. Somit stehen die einzelnen Quadranten für: unten links / blau: intakte NK-Zellen; unten rechts / grün: intakte Zielzellen; oben links / lila: unmarkierte Zielzellen und NK-Zellen; oben rechts / rot: PI-markierte Zielzellen.

Die NK-Zell-vermittelte spezifische Zielzelllyse, wie sie in den Grafiken des Ergebnisteils dargestellt wird (Abb. 7b, S. 34), errechnete sich anhand der nachfolgenden Formel (Formel 1):

Spezifische Lyse [%] =
$$\frac{\text{PI-positive Zielzellen der Probe [\%]- spontan PI-positive Zielzellen [\%]}}{100 - \text{spontan PI-positive Zielzellen [\%]}} \times 100$$

Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® mit der Funktion *curvefittingfunction* (sigmoidal dose response, variable slope) bestimmt.

2.6 Zellzyklusanalyse

Analyse-Puffer 50 μg/ml PI

0,1 % [v/v] Triton X-100 0,1 % [w/v] Natriumcitrat

Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse wurde die alleinige Wirkung der anti-CD20-Antikörper auf den Zellzyklus untersucht. Hierzu wurde ein Triton-haltiger, hypotoner Analyse-Puffer verwendet, welcher die Zell- sowie Kernmembran aufbricht und somit die Anfärbung der im Zellkern enthaltenen DNA ermöglicht (NICOLETTI ET AL. 1991). PI interkaliert mit der DNA einer Zelle und korreliert somit positiv mit der DNA-Menge, welche im Zellkern der Zelle enthalten ist. Generell gilt, dass Zellen in der GO / G1-Phase einen diploiden Chromosomensatz aufweisen. In der G2-Phase ist der Chromosomensatz tetraploid. In der S-Phase ist ein Chromosomensatz, der zwischen diploid und tetraploid vorliegt, vorhanden. Die Stärke des im Durchflusszytometer gemessenen PI-Signals gibt Aufschluss darüber, wie viele Zellen sich in welcher Phase des Zellzyklus befinden. Der Zellzyklus vitaler Zellen durchflusszytometrisch in einem zweigipfligen Histogramm dargestellt werden. Die beiden Hochpunkte entsprechen der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus. Zwischen diesen Hochpunkten liegt die S-Phase des Zellzyklus (FRIED ET AL. 1978). Die Fragmentierung der DNA bei Apoptoseinduktion lässt den DNA-Gehalt einer Zelle sinken. Der geringere DNA-Gehalt spiegelt sich in der durchflusszytometrischen Messung durch niedrigere PI-Signale wider. Bei der Berechnung des Zellzyklus lassen sich diese apoptotischen Zellen in der <G1-Phase nachweisen.

Die Zellen wurden auf 12-Well-Platten ausgesät und 24 h mit und ohne anti-CD20-Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und bei 200 x g 5 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l Analyse-Puffer aufgenommen und nach 5 min Inkubation im Dunkeln durchflusszytometrisch gemessen.

Die PI-Signale wurden im orangeroten Wellenlängenbereich des FACS-Scan gemessen und mit CellQuest detektiert. Die Zellzyklusphasen wurden mit FlowJo auf Grundlage der Methode von WATSON berechnet (WATSON ET AL. 1987).

2.7 CD107a-Assay

Die nach Kapitel 3.2.5 isolierten NK-Zellen wurden nach Inkubation mit den Zielzellen und Zugabe eines anti-CD20-Antikörper auf ihre CD107a Expression hin überprüft, die mit ihrer Degranulation und somit mit ihrer Aktivität positiv korreliert (PENACK ET AL. 2005).

Hierzu wurden die NK-Zellen auf eine Konzentration von 2 x 10^6 / ml Kulturmedium eingestellt, die Zielzellen wurden auf eine Konzentration von 1x 10^6 / ml Kulturmedium eingestellt. Es wurden jeweils 50 μ l NK-Zellen und 50 μ l Zielzellen in vorher beschriftete FACS-Röhrchen gegeben und 4 h bei 37 °C und 5 % CO $_2$ inkubiert. Dies entspricht einem Effektor-Zielzellverhältnis von 2:1. Entsprechend der Tabelle 1 wurde dem Effektor-Zielzellgemisch jeweils ein anti-CD20-Antikörper in sechs verschiedenen Konzentrationen beigefügt und so-

mit ein zusätzlicher Effekt der Antikörper auf die NK-Zell-Aktivität überprüft. Nach 1 h Inkubation wurden 5 μ l Monensin in einer Konzentration von 2 mM dem Effektor-Zielzellgemisch beigefügt. Dieser Zusatz diente dem Arretieren des CD107a-Moleküls auf der Zelloberfläche der NK-Zellen.

2.7.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der NK-Zell-Aktivität

Die Expression des Oberflächenmoleküls CD107a wurde mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers, welcher an PE-Cy5 gekoppelt ist und in der Fluoreszenz-3 (FL-3) des Durchflusszytometers detektiert wird, bestimmt. Dazu wurden zunächst die NK-Zellen im Punktwolkendiagramm mit Vorwärtslichtstreuung (*forwardscatter*, FSC) auf der x-Achse und Seitwärts-lichtstreuung (*sidewardscatter*, SSC) auf der y-Achse anhand ihrer typischen Größe und Form detektiert und somit von den Zielzellen abgegrenzt. Ausschließlich die NK-Zellen wurden somit auf die Expression von CD107a hin überprüft (Abb. 3).

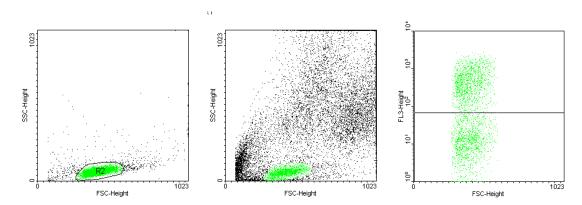


Abbildung 3: Gezeigt werden drei typische Punktwolkendiagramme, wie sie sich in den CD107a-Assays abbildeten. Das Punktwolkendiagramm auf der linken Seite zeigt das markierte Feld der NK-Zellen (R2). Das mittlere Punktwolkendiagramm zeigt die grün markierten NK-Zellen zusammen mit den unmarkierten Zielzellen, die sich teilweise lysiert (unmarkierte Zellen am Bildrand links unten) und teilweise noch intakt (unmarkierte Zellen am Bildrand rechts oben) darstellen ließen. Das Punktwolkendiagramm auf der rechten Seite zeigt ausschließlich die markierten NK-Zellen in Bezug auf ihre CD107a-Expression (dargestellt auf der y-Achse als Fluoreszenz-3 (FL-3)). Man erkennt deutlich zwei unterschiedliche Populationen. Das rechte Punktwolkendiagramm wurde für die Datengewinnung genutzt.

Die in den Grafiken des Ergebnisteils (Abb. 8b, S. 39) dargestellte spezifische NK-Zell-Aktivität errechnete sich mit Hilfe nachfolgender Formel (Formel 2):

Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) wurde mit dem Programm GraphPad Prism® und der Funktion *curvefittingfunction* (sigmoidal dose response, variable slope) bestimmt.

2.8 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism® 5.03 (GraphPad Software San Diego, USA) für Windows durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist für alle Versuche mit p < 0,05 definiert.

2.8.1 Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest

Die Two-way ANOVA (*Analysis Of Variance*) mit anschließendem Bonferroni-Posttest testet als Varianzanalyse den Einfluss von zwei variablen Faktoren auf die Messwerte eines Experimentes sowie deren Interaktion. Sie fand bei den MTT-Tests und bei den CD107a-Assays Verwendung. Verglichen wurden jeweils der Einfluss der Antikörperkonzentration sowie der Einfluss der unterschiedlichen Antikörper auf die Viabilität im MTT-Test (Abb. 5a, S. 28) und auf die NK-Zell-Aktivität im CD107a-Assay (Abb. 8b, S. 39).

2.8.2 Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest

Der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Posttest dient der Überprüfung des Einflusses einer unabhängigen, nicht-parametrischen Variable auf einen Messwert. Dieser Test wurde genutzt, um bei den MTT-Tests den Einfluss der verschiedenen Antikörper auf die Zelllinien mit den unbehandelten Zelllinien der Mediumkontrolle zu vergleichen und auf statistisch signifikante Unterschiede hin zu überprüfen (Abb. 5b, S. 29).

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Zielstruktur CD20

Die Grundvoraussetzung für die Wirkung der drei untersuchten Antikörper ist die Expression der Zielstruktur CD20 auf der Oberfläche der eingesetzten Lymphomzelllinien.

Alle B-Zelllinien exprimierten CD20 auf ihrer Oberfläche, die als Negativkontrolle eingesetzten T-Zell-Lymphomzelllinien zeigten keine CD20-Expression (Abb. 4).

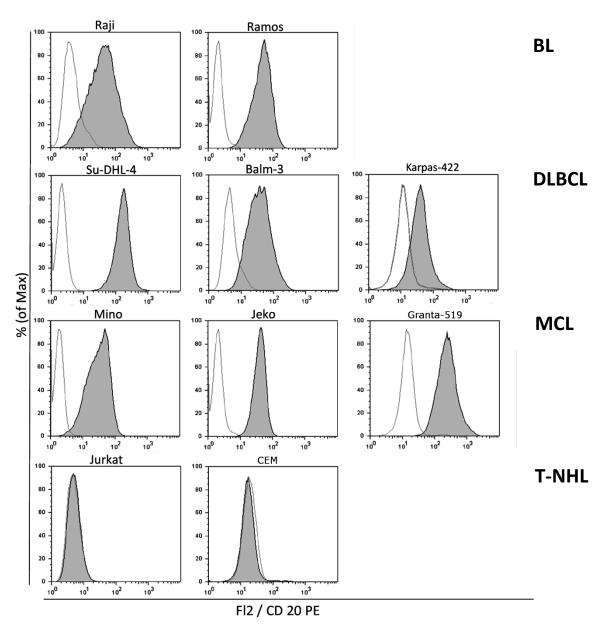


Abbildung 4: Gezeigt werden die Histogramme der CD20-Expression der Zelllinien (grau hinterlegtes Histogramm) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Histogramm mit hellgrauer Linie). Alle eingesetzten B-Zelllinien exprimierten CD20.

3.2 Untersuchung der direkten Zytotoxizität der drei Antikörper

3.2.1 MTT-Test

Der zytotoxische Effekt der anti-CD20-Antikörper auf den Stoffwechsel der Lymphomzelllinien wurde mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. In der Abbildung 5a sind die Mittelwerte der gemessenen Triplikate als Prozentsatz der unbehandelten Mediumkontrolle angegeben.

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

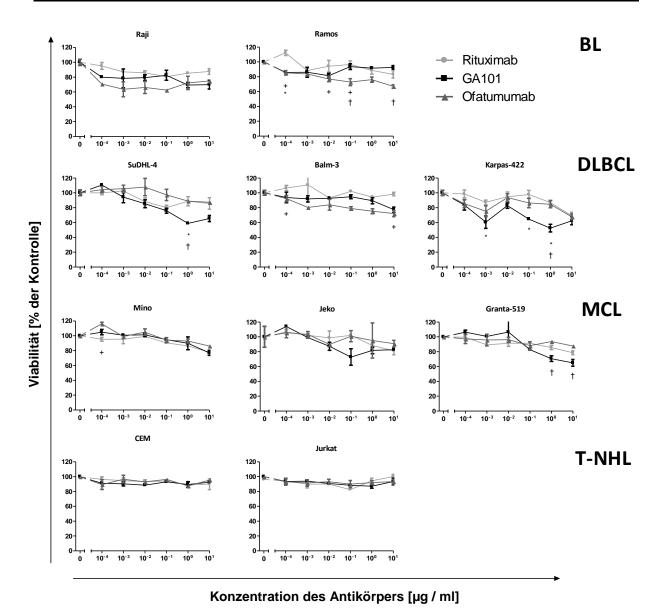


Abbildung 5a: Dargestellt ist die in den MTT-Tests gemessene prozentuale Viabilität der untersuchten Lymphomentitäten nach 24-stündiger Inkubation mit jeweils einem der drei anti-CD20-Antikörper Rituximab, Ofatumumab oder GA101 in sechs verschiedenen Konzentrationen in Bezug auf unbehandelte Kontrollen. Gezeigt werden die normalisierten Daten. Die Werte von Ofatumumab und GA101 wurden untereinander und mit den Werten von Rituximab verglichen und auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Auf der x-Achse ist in logarithmischer Skalierung die Antikörperkonzentration aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Viabilität der Zielzellen als Prozentsatz der unbehandelten Mediumkontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen GA101 und Ofatumumab sind mit Stern (*) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und Ofatumumab sind mit Kreuz (†) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und Ofatumumab sind

mit Plus (+) gekennzeichnet.

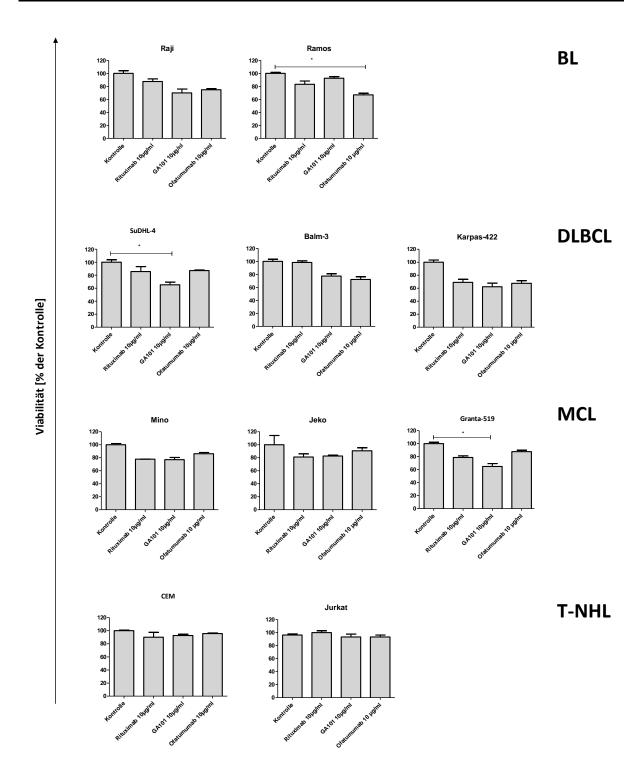


Abbildung 5b: Dargestellt ist die in den MTT-Tests gemessene prozentuale Viabilität der Zielzellen nach 24-stündiger Inkubation mit den höchsten eingesetzten Antikörperkonzentrationen. Die Werte wurden auf signifikante Unterschiede zwischen Viabilität der Kontrollen und Viabilität der mit den drei verschiedenen Antikörpern behandelten Zelllinien untersucht. Gezeigt werden die normalisierten Daten. Auf der x-Achse sind die drei anti-CD20-Antikörper sowie die Kontrolle aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Viabilität der Zielzellen als Prozentsatz der unbehandelten Mediumkontrolle angegeben. Signifikante Viabilitätsunterschiede wurden in der Graphik mit Stern (*) gekennzeichnet.

Bei allen untersuchten B-Zell-Lymphomzellen führte die Koinkubation mit einem der drei anti-CD20-Antikörper zu einer Viabilitätsabnahme auf bis zu maximal 52,46 % der unbehandelten Kontrolle (Karpas-422 mit 1 μ g / ml GA101; Abb. 5a). Bei den DLBCL-Zelllinien SuDHL-4 und Karpas-422 konnte bei der submaximalen Konzentration von 1 μ g / ml GA101 vergleichend mit den anderen Antikörpern eine signifikant größere Viabilitätsabnahme auf 52,46 % bei Karpas-422 und 58,81 % bei SuDHL-4 beobachtet werden (Abb. 5a).

Bei dem Vergleich zwischen der Kontrolle und der Inkubation mit $10~\mu g$ / ml eines der drei anti-CD20-Antikörper konnte in drei Fällen eine signifikante Viabilitätsabnahme nachgewiesen werden: Signifikant waren die Viabilitätsabnahmen von Ramos behandelt mit dem Antikörper Ofatumumab, von SuDHL-4 behandelt mit GA101 sowie von Granta-519 ebenfalls behandelt mit GA101 (Abb. 5b).

Die maximale Viabilitätsabnahme bei Koinkubation mit $10\,\mu g$ / ml wurde bei Karpas-422 festgestellt. Hier betrug die gemessene Viabilität nach 24-stündiger Inkubation mit $10\,\mu g$ / ml GA101 62,38 % der unbehandelten Kontrolle (Abb. 5b). Dieser Wert war nicht signifikant.

Als weitere Kontrolle dienten die CD20-negativen T-NHL-Zellen CEM und Jurkat. Diese zeigten im Gegensatz zu den B-Lymphomzellen keine Viabilitätsabnahme nach Koinkubation mit den anti-CD20-Antikörpern (Abb. 5a; Abb. 5b).

Eine für alle B-Zelllinien nachweisbare Überlegenheit hinsichtlich der Viabilitätsreduktion im MTT-Test eines anti-CD20-Antikörpers gegenüber den anderen anti-CD20-Antikörpern ließ sich nicht detektieren.

3.2.2 Zellzyklusanalyse

Um die Ergebnisse des MTT-Tests mit einem anderen Test weiterführend zu überprüfen, wurden nachfolgend Zellzyklusanalysen für die jeweiligen Zelllinien durchgeführt (Abb. 6a).

Bei allen untersuchten Zelllinien führte die Koinkubation mit einem der drei anti-CD20-Antikörper bei einer Konzentration von 10 µg / ml zu keiner signifikanten Veränderung des Zellzyklus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei der DLBCL-Zelllinie SuDHL-4 konnte durch den Antikörper GA101 eine Zunahme der Zellen, die sich in der <G1-Phase befanden, von 2,96 % erreicht werden. Bei den anderen DLBCL-Zelllinien und bei allen MCL-Zelllinien waren die Werte geringer (Abb. 6b).

Bei der BL-Zelllinie Raji betrug der Anteil an Zellen, die sich in der <G1-Phase befanden, nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μg / ml GA101 2,61 %. Bei der BL-Zelllinie Ramos betrug der Anteil an Zellen, die sich initial in der <G1-Phase befanden, bereits 30,83 %. Durch Rituximab wurde dieser Wert auf 39,49 % gesteigert. Bei den anderen Antikörpern fiel diese Steigerung geringer aus (Abb. 6b).

Ein Einfluss der drei getesteten Antikörper auf den Zellzyklus ließ sich nicht nachweisen.

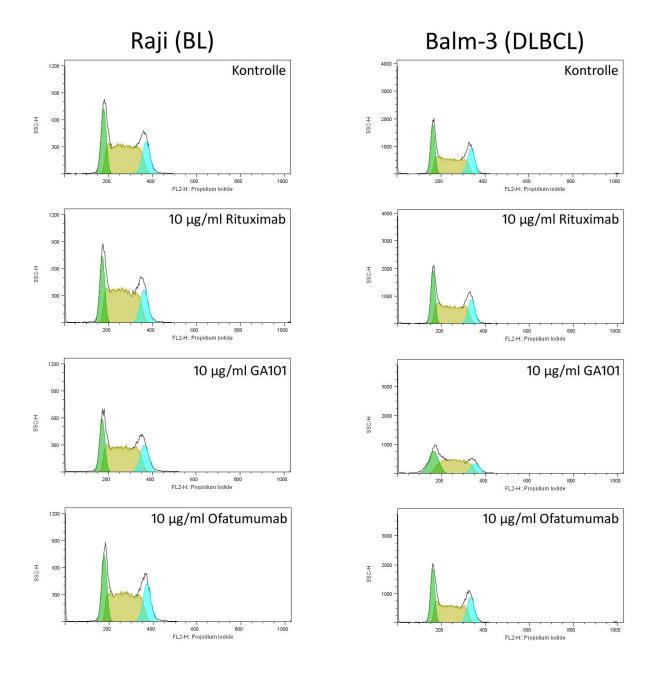


Abbildung 6a: Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse beispielhaft für die Zelllinien Raji und Balm-3 nach 24-stündiger Inkubation mit einem der drei anti-CD20-Antikörper. Das erste Histogramm zeigt jeweils für Raji und Balm-3 den Zellzyklus der unbehandelten Kontrolle. Der Zellzyklus wurde nach der Methode von Watson et al. (1987) ausgewertet. Die Auswertung unterteilt das Histogramm in nachfolgende Punkte: grün = G1-Phase; braun = S-Phase; blau = G2-Phase; <G1-Phase nicht farbig gekennzeichnet.

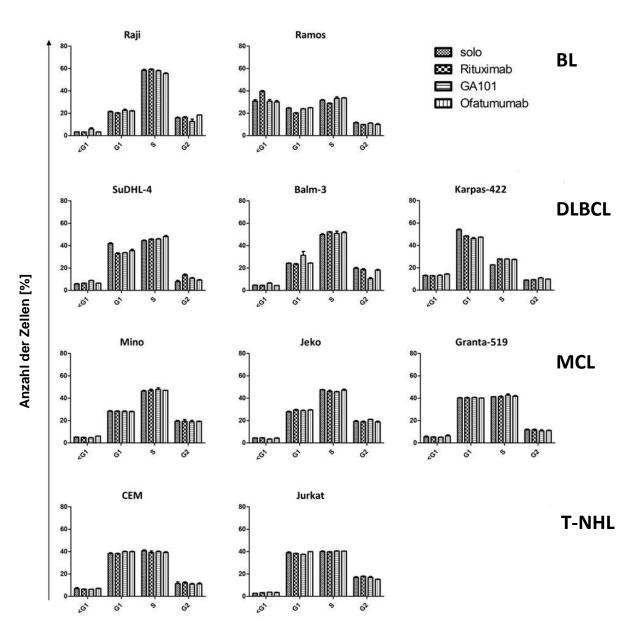


Abbildung 6b: Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse nach 24-stündiger Inkubation mit $10~\mu g$ / ml der untersuchten anti-CD20-Antikörper. Es ist vergleichend dargestellt, wie viele Zellen sich in welcher Phase des Zellzyklus zum Messzeitpunkt befanden. Die Angaben sind als Mittelwert von drei Versuchen auf der y-Achse in Prozent aufgetragen. Die x-Achse ist in die vier Phasen des Zellzyklus unterteilt.

3.3 Untersuchung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität

Neben der direkten, ausschließlich antikörperabhängigen Wirkung der anti-CD20-Antikörper auf die B-Zelllinien ist die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch NK-Zellen einer der Hauptwirkmechanismen.

3.3.1 FACS-Zytotoxizitätstest

Im FACS-Zytotoxizitätstest wurde der prozentuale Anteil der PI-gefärbten Zellen (rechter oberer Quadrant) von allen DiO-gefärbten Zielzellen (sowohl rechter unterer Quadrant als auch rechter oberer Quadrant) als NK-Zell-vermittelte Zielzelllyse bestimmt. Exemplarisch

sind die Punktwolkendiagramme des FACS-Zytotoxizitätstests gegen Raji mit und ohne GA101 dargestellt (Abb. 7a). Ohne Koinkubation mit NK-Zellen lag der Anteil PI-positiver Raji Zellen bei 6,50 %. Durch die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität nahm der Anteil der PI-gefärbten Zielzellen auf 21,89 % zu. Die ADCC führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der lysierten Zellen bis auf maximal 76,71 % nach Inkubation mit 10 μ g / ml GA101 (Abb. 7a). Nach Berücksichtigung der spontan toten Zellen mit Hilfe der Formel 1 (S. 22) entspricht dies einer spezifischen NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität von 75,10 %.

Bereits bei einer Konzentration von $0.1 \,\mu g$ / ml kam es zu einer NK-Zell-vermittelten spezifischen Zielzelllyse von $70.86 \,\%$. Die Steigerung der spezifischen Zielzelllyse durch die Konzentrationssteigerung über diesen Bereich hinaus war gering (Abb. 7b)

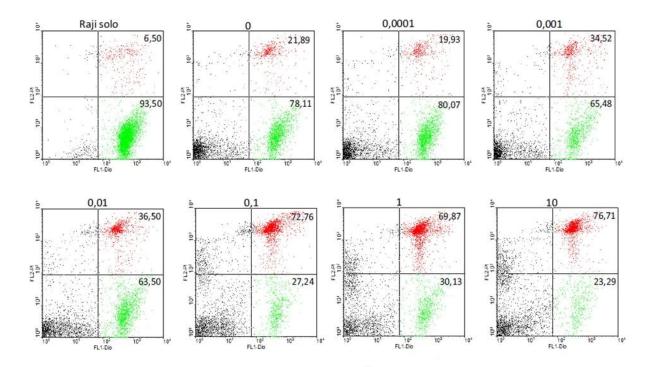


Abbildung 7a: Dargestellt sind beispielhaft die Punktwolkendiagramme des FACS-Zytotoxizitätstests mit Raji als Zielzelllinie und NK-Zellen als Effektorzellen bei ansteigenden Konzentrationen von GA101. Auf der x-Achse ist Fl-1 / DiO aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Fl-2 / PI aufgetragen. Oberhalb der Punktwolkendiagramme ist die jeweilige Antikörperkonzentration in μg / ml angegeben. Das Punktwolkendiagramm, welches mit Raji solo gekennzeichnet ist, beinhaltet ausschließlich die Zielzelle Raji ohne NK-Zellen und Antikörper. Angegeben ist der prozentuale Anteil der vitalen Zielzellen im rechten unteren Quadranten (grün) sowie der prozentuale Anteil der toten Zellen im rechten oberen Quadranten (rot) von allen DiO-gefärbten Zielzellen. Die in der Abbildung 7b dargestellte spezifische Zielzelllyse wurde unter anderem aus diesen Daten mit Hilfe der Formel 1 (S. 22) errechnet.

In der Abbildung 7b sind sowohl die Ergebnisse der NK-Zell-vermittelten spezifischen Zielzelllyse des bereits in den Punktwolkendiagrammen der Abbildung 7a gezeigten Versuchs als auch die Ergebnisse mit den anderen getesteten Zelllinien und Antikörpern grafisch dargestellt.

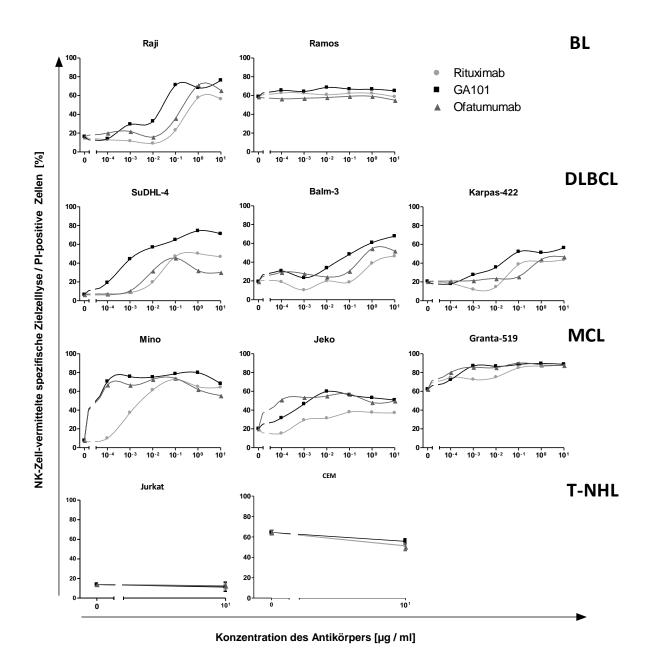


Abbildung 7b: Prozentualer Anteil der NK-Zell-vermittelten spezifischen Zielzelllyse ohne anti-CD20-Antikörper sowie die ADCC bei steigender Antikörperkonzentration gemessen durch den Anteil Pl-positiver Zellen. Auf der x-Achse sind die Antikörperkonzentrationen in μg / ml in logarithmisch ansteigender Skalierung aufgetragen. Auf der y-Achse ist die prozentuale spezifische Zielzelllyse gemessen durch den Anteil Pl-positiver Zellen aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die BL-Zelllinie Ramos war hoch sensitiv gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen. Dies resultierte in einer spezifischen Zielzelllyse von 58,78 % ohne Koinkubation mit einem der drei anti-CD20-Antikörper. Durch die Koinkubation mit GA101 konnte nur eine geringe Steigerung von maximal 10 % im Verhältnis zur Probe, die ausschließlich mit NK-Zellen und Ramos-Zellen koinkubiert war, erreicht werden. Bei den anderen zwei Antikörpern war die Steigerung der spezifischen Lyse kleiner als 10 %.

Die MCL-Zelllinie Granta-519 war ebenfalls hoch sensitiv gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der eingesetzten NK-Zellen mit einer spezifischen Lyse von 62,25 % und einer Steigerung der spezifischen Lyse auf 90,14 % durch Koinkubation mit 0,1 μ g / ml Ofatumumab. Die spezifische Lyse des Antikörpers GA101 war bei der höchsten Antikörperkonzentration (10 μ g / ml) 0,7 % größer als bei Rituximab und 1,24 % größer als bei Ofatumumab.

Die BL-Zelllinie Raji, alle DLBCL-Zelllinien und die MCL-Zelllinien Mino und Jeko zeigten eine partielle Resistenz gegenüber der NK-Zell-vermittelten natürlichen Zytotoxizität. Die spezifische Lyse, die nur durch die NK-Zellen hervorgerufen wurde, lag zwischen 7,67 % (Mino) und 20,56 % (Karpas-422). Durch die Koinkubation mit den anti-CD20-Antikörpern konnte die Zielzelllyse dosisabhängig gesteigert werden. Bei diesen Zelllinien zeigte die logarithmische Steigerung der Antikörperkonzentration einen Anstieg der Zielzelllyse, die grafisch dargestellt einen sigmoidalen Kurvenverlauf ergab. Durch die höchsten Antikörperkonzentrationen konnte die spezifische Zielzelllyse noch weiter, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, gesteigert werden. Nach Koinkubation mit den höchsten Antikörperkonzentrationen zeigte sich bei diesen sechs Zelllinien ein Anteil von ca. 25 % weiterhin Plnegativ und somit vital.

Darüber hinaus konnte für die Zelllinien SuDHL-4, Mino und Jeko bei steigender Antikörper-konzentration ein Maximalwert der spezifischen Lyse bei submaximaler Antikörper-konzentration beobachtet werden. Bei der maximalen Antikörperkonzentration kam es im Vergleich zur submaximalen Antikörperkonzentration zu einem Abfall der Zielzelllyse. Dieses Phänomen konnte bei allen drei anti-CD20-Antikörpern nach Koinkubation mit den oben genannten Zelllinien gleichermaßen beobachtet werden, am prägnantesten jedoch bei der MCL-Zelllinie Mino.

Die maximale Lyse bei einer Antikörperkonzentration von $10~\mu g$ / ml war für GA101 bei den DLBCL-Zelllinien höher als für Rituximab und Ofatumumab. Die maximale Differenz konnte bei SuDHL-4 beobachtet werden. Die maximale durch ADCC bedingte Zielzelllyse von GA101 betrug hier 71,18 % im Vergleich zu Rituximab mit 46,67 % und Ofatumumab mit 30,12 %.

Die Berechnung der EC₅₀ der Zielzelllyse für die drei anti-CD20-Antikörper konnte für die BL-Zelllinie Raji und für alle DLBCL-Zelllinien, die eine partielle Resistenz gegenüber der natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen zeigten, durchgeführt werden. Die EC₅₀ für GA101 war bei allen Zelllinien geringer als bei den beiden anderen Antikörpern. Die EC₅₀ des Antikörpers Ofatumumab im Vergleich zu Rituximab war bei den Zelllinien Raji, SuDHL-4 und Balm-3 geringer. Bei der Zelllinie Karpas-422 lag die EC₅₀ von Ofatumumab bei einer höheren Konzentration als bei Rituximab.

LOG EC ₅₀	Rituximab	GA-101	Ofatumumab	Entität
Raji	10 ^{-0,6637}	10 ^{-1,697}	10 ^{-0,7831}	Burkitt
Ramos	-	-	-	Burkitt
SuDHL-4	10 ^{-1,766}	10 ^{-2,995}	10 ^{-2,589}	DLBCL
Balm-3	10 ^{-0,2900}	10 ^{-1,068}	10 ^{-0,5574}	DLBCL
Karpas-422	10 ^{-1,362}	10 ^{-1,976}	10 ^{-0,4835}	DLBCL
Mino	-	-	-	MCL
Jeko	-	-	-	MCL
Granta-519	-	-	-	MCL

Tabelle 5: Gezeigt werden die mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50}) in μg / ml der Antikörper in Bezug auf die NK-Zell-vermittelte spezifische Zielzelllyse. Bei den Zelllinien, die hoch sensitiv gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen waren, konnte durch die nur gering ausgeprägte Steigerung der spezifischen Zielzelllyse keine EC_{50} berechnet werden. Bei diesen Zelllinien ist deshalb keine EC_{50} aufgeführt.

3.4 Untersuchung der spezifischen NK-Zell-Aktivität

Unter der Annahme, dass die verbesserte Zielzelllyse auf einer stärkeren Aktivierung der NK-Zellen beruht, wurde vergleichend die spezifische NK-Zell-Aktivierung untersucht.

3.4.1 CD107a-Assay

Um die Aktivität der NK-Zellen zu bestimmen, wurde durchflusszytometrisch der CD107a-positive Anteil der NK-Zellen nach Koinkubation mit und ohne Zielzellen und mit und ohne anti-CD20-Antikörper bestimmt. Exemplarisch ist bei der BL-Zelllinie Raji für jede Konzentrationsstufe von GA101 jeweils eines von drei Punktwolkendiagrammen gezeigt, wie sie sich typischerweise in den Versuchen darstellen ließen (Abb. 8a). Ohne Koinkubation mit der Zielzelle lag der CD107a-positive Anteil der NK-Zellen bei 0,97 %. Nach Zugabe der Zielzellen stieg der Anteil auf 10,84 %. Nach Zugabe des Antikörpers GA101 konnte die NK-Zell-Aktivität dosisabhängig bis zu einem Maximum von 55,65 % bei einer Konzentration von 0,1 µg / ml GA101 gesteigert werden. Durch Zugabe höherer GA101-Konzentrationen konnte die NK-Zell-Aktivität nicht weiter gesteigert werden.

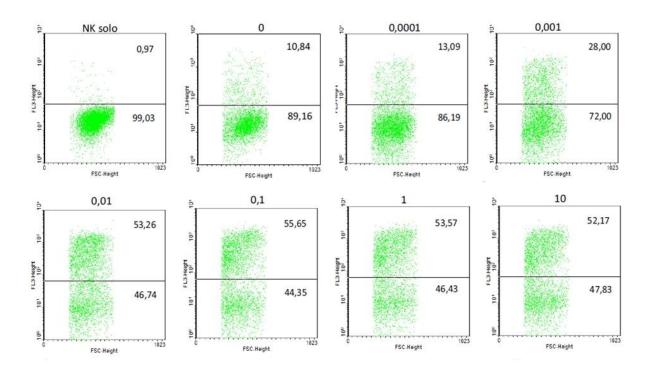


Abbildung 8a: Dargestellt ist jeweils eines von drei Punktwolkendiagrammen des CD107a-Assays mit Raji als Zielzelllinie und NK-Zellen als Effektorzellen koinkubiert mit verschiedenen GA101-Konzentrationen. Auf der x-Achse ist der Wert der Vorwärtslichtstreuung (FSC) aufgetragen, der die Zellen anhand ihrer Größe unterscheidet. Auf der y-Achse ist die Fl-3 aufgetragen, welche die Expression des Oberflächenmoleküls CD107a repräsentiert. Oberhalb der Punktwolkendiagramme sind die Konzentrationen des Antikörpers in µg / ml aufgetragen. Das Punktwolkendiagramm, welches mit NK solo gekennzeichnet ist, beinhaltet ausschließlich die NK-Zellen ohne Zielzellen und Antikörper. Der Vergleich zwischen dem Grad der NK-Zell-Aktivität erfolgte anhand der unstimulierten, nicht aktivierten Kontrolle (NK solo). Die in Abbildung 8b gezeigte spezifische NK-Zell-Aktivität wurde unter anderem aus diesen Daten mit Hilfe der Formel 2 (S. 24) errechnet. Gezeigt wird die prozentuale Veränderung der CD107a-Expression, welche der NK-Zell-Aktivität bei steigender Antikörperkonzentration entspricht.

In der Abbildung 8b sind die Ergebnisse der spezifischen NK-Zell-Aktivität als Mittelwert der Triplikate für die anti-CD20-Antikörper vergleichend dargestellt.

Bei der Messung von CD107a auf der Oberfläche der NK-Zellen konnte nach Zielzellkontakt bei allen B-Zelllinien eine dosisabhängige mittlere Steigerung der spezifischen NK-Zell-Aktivität durch die verschiedenen Antikörper bis maximal 70,86 % bei der DLBCL-Zelllinie SuDHL-4 beobachtet werden. Nach Koinkubation mit den höchsten Antikörperkonzentrationen kam es auch hier zu einem Abfall der NK-Zell-Aktivität. Bei den submaximalen Antikörperkonzentrationen war die Steigerung der NK-Zell-Aktivität nur gering. Grafisch spiegelt sich dies in einer asymptotischen Annäherung der NK-Zell-Aktivität an die maximal erreichbare NK-Zell-Aktivität wider (Abb. 8b). Die Kurven der NK-Zell-Aktivität zeigen alle einen sigmoidalen Verlauf mit einer maximalen Steigerung der NK-Zell-Aktivität im mittleren Konzentrationsbereich (Abb. 8b).

Bei den Zelllinien Ramos und Granta-519, die sich hoch sensitiv gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen im FACS-Zytotoxizitätstest gezeigt haben, kam es nach Koinkubation mit NK-Zellen und einem anti-CD20-Antikörper ebenfalls zu einer dosisabhängigen Steigerung der NK-Zell-Aktivität auf maximal 69,91 % bei Ramos und 39,23 % bei Granta-519.

Bei den DLBCL-Zelllinien SuDHL-4 und Karpas-422 sowie bei den MCL-Zelllinien Mino und Jeko lag die maximale NK-Zell-Aktivierung durch den Antikörper GA101 signifikant höher als bei den beiden anderen Antikörpern Rituximab und Ofatumumab. Die maximale Differenz konnte bei der MCL-Zelllinie Jeko beobachtet werden. Hier lag das Maximum der NK-Zell-Aktivierung bei der höchsten eingesetzten Antikörperkonzentration von $10~\mu g$ / ml für GA101 bei 41,39 %, für Ofatumumab bei 20,57 % und für Rituximab bei 16,35 %. Die Unterschiede zwischen Ofatumumab und Rituximab waren nicht signifikant.

Die spezifische NK-Zell-Aktivität lag bei der DLBCL-Zelllinie Karpas-422 ohne Koinkubation mit den drei anti-CD20-Antikörpern und bei der niedrigsten Konzentration von Rituximab in einem negativen Bereich (Abb. 8b). Dies ist durch die hohe Spontanaktivität der NK-Zellen in diesem Versuch bedingt. Sie war initial höher als nach der Koinkubation mit Karpas-422 und der niedrigsten Rituximab-Konzentration. Die in den Grafiken dargestellte spezifische NK-Zell-Aktivität ist die gemessene NK-Zell-Aktivität nach Abzug der spontanen NK-Zell-Aktivität (Formel 2, S.24).

Im mittleren Konzentrationsbereich (0,01 μ g / ml und 0,1 μ g / ml) konnte bei allen B-Zelllinien eine signifikant höhere NK-Zell-Aktivierung durch den Antikörper GA101 im Vergleich mit Rituximab und Ofatumumab nachgewiesen werden. Bei den DLBCL-Zelllinien SuDHL-4 und Karpas-422 sowie bei den MCL-Zelllinien Mino und Jeko lag zusätzlich die maximal erreichbare NK-Zell-Aktivität in einem höheren Bereich als bei Rituximab und Ofatumumab.

Die Berechnung der EC₅₀ konnte für alle Zelllinien durchgeführt werden. Sie lag bei allen B-Zelllinien für GA101 in einem deutlich niedrigeren Bereich als für Rituximab und Ofatumumab. Die niedrigste EC $_{50}$ konnte bei der DLBCL-Zelllinie SuDHL-4 errechnet werden. Sie lag bei einer Konzentration von $10^{-2,996}~\mu g$ / ml bzw. 0,001009 μg / ml und somit deutlich niedriger als die EC $_{50}$ von Rituximab $10^{-1,757}~\mu g$ / ml bzw. 0,017498 μg / ml und Ofatumumab $10^{-2,026}~\mu g$ / ml bzw. 0,009418 μg / ml. Das 95 %-Konfidenzintervall zeigte lediglich bei der MCL-Zelllinie Jeko Überschneidungen beim Vergleich von GA101 mit den beiden anderen Antikörpern Rituximab und Ofatumumab. Bei allen anderen Werten gab es keine Überschneidungen (Tab. 6).

Als Kontrolle dienten auch in diesem Versuch die T-NHL-Zelllinien CEM und Jurkat. Hier konnte nach Koinkubation mit der höchsten Antikörperkonzentration nur eine geringe Steigerung der spezifischen NK-Zell-Aktivität nachgewiesen werden. Die maximale Steigerung betrug 2,79 % (Abb. 8b).

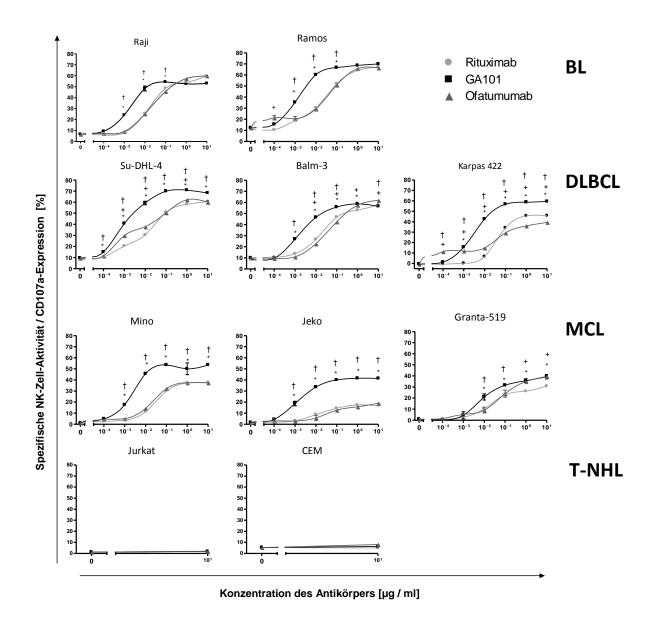


Abbildung 8b: Gezeigt wird die spezifische NK-Zell-Aktivität, hervorgerufen durch die Koinkubation mit verschiedenen Zielzellen und anti-CD20-Antikörpern. Auf der x-Achse ist in logarithmischer Skalierung die Konzentration des Antikörpers aufgetragen. Auf der y-Achse ist die spezifische NK-Zell-Aktivität anhand der prozentualen CD107a-Expression der NK-Zellen aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen GA101 und Rituximab sind mit Stern (*) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen GA101 und Ofatumumab sind mit Kreuz (†) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und Ofatumumab sind mit Plus (+) gekennzeichnet.

<u>Ergebnisse</u> 40

LOG EC ₅₀	Rituximab	95 %- Konfidenz- intervall	GA-101	95 %- Konfidenz- intervall	Ofatu- mumab	95 %- Konfidenz- intervall
Raji	10 ^{-1,762}	10 ^{-1,870} - 10 ^{-1,655}	10 ^{-2,804}	10 ^{-2,899} - 10 ^{-2,710}	10 ^{-1,650}	10 ^{-1,759} - 10 ^{-1,540}
Ramos	10 ^{-1,610}	10 ^{-1,755} - 10 ^{-1,466}	10 ^{-2,829}	10 ^{-2,900} - 10 ^{-2,758}	10 ^{-1,389}	10 ^{-1,573} - 10 ^{-1,206}
SuDHL-4	10 ^{-1,757}	10 ^{-1,915} - 10 ^{-1,599}	10 ^{-2,996}	10 ^{-3.133} - 10 ^{-2,859}	10 ^{-2,025}	10 ^{-2,379} - 10 ^{-1,672}
Balm-3	10 ^{-1,693}	10 ^{-1,809} - 10 ^{-1,577}	10 ^{-2,745}	10 ^{-2,890} - 10 ^{-2,599}	10 ^{-1,319}	10 ^{-1,432} - 10 ^{-1,205}
Karpas- 422	10 ^{-1,394}	10 ^{-1,490} - 10 ^{-1,298}	10 ^{-2,469}	10 ^{-2,552} - 10 ^{-2,386}	10 ^{-1,252}	10 ^{-1,363} - 10 ^{-1,142}
Mino	10 ^{-1,528}	10 ^{-1,576} - 10 ^{-1,479}	10 ^{-2,686}	10 ^{-2,907} - 10 ^{-2,466}	10 ^{-1,656}	10 ^{-1,710} - 10 ^{-1,602}
Jeko	10 ^{-1,895}	10 ^{-2,044} - 10 ^{-1,746}	10 ^{-2,817}	10 ^{-2,981} - 10 ^{-2,652}	10 ^{-1,268}	10 ^{-1,635} - 10 ^{-0,9016}
Granta- 519	10 ^{-1,657}	10 ^{-1,848} - 10 ^{-1,467}	10 ^{-2,089}	10 ^{-2,356} - 10 ^{-1,823}	10 ^{-1,162}	10 ^{-1,378} - 10 ^{-0,9459}

Tabelle 6: Gezeigt werden die mittleren effektiven Konzentrationen (EC $_{50}$) der drei Antikörper in µg / ml in Bezug auf die NK-Zell-Aktivität sowie die dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden erstmalig die drei anti-CD20-Antikörper Rituximab, Ofatumumab und GA101 in ihrer PCD- und ADCC-Wirkung *in vitro* verglichen. Es konnte die Überlegenheit der ADCC von GA101 gegenüber Rituximab und Ofatumumab in einem Modell CD20-exprimierender Lymphomzelllinien gezeigt werden.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass diese Überlegenheit im direkten Zusammenhang mit der stärkeren Aktivierung der NK-Zellen durch GA101 steht und durch diese erklärt werden kann.

Die Daten dieser Arbeit bestätigen den Stellenwert der ADCC als wichtigsten Wirkmechanismus *in vitro*. Demgegenüber spielte die PCD in den Zytotoxizitätsversuchen dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle.

4.1 Stellenwert der direkten Zytotoxizität monoklonaler anti-CD20-Antikörper

Das Binden eines Antikörpers an eine Tumorzelle kann neben einem Zellzyklusarrest die Induktion des programmierten Zelltods hervorrufen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen direkt-zytotoxischen Effekt durch den monoklonalen Antikörper Rituximab auf B-Zell-Lymphomzellen beschreiben (TEDDER ET AL. 1986; BYRD 2002). Sekundäre Antikörper, die ein Quervernetzen (cross-linking) von Rituximab ermöglichen, konnten diesen Effekt in vitro noch deutlich verstärken (GHETIE ET AL. 2001). Der Effekt, welcher durch das cross-linking von Antikörpern hervorgerufen wird, scheint aber bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Die Zelllinien SuDHL-4 und Ramos zeigten sich in den Versuchen hoch sensitiv, wohingegen die Zelllinie Jeko-1 durch das cross-linking von Rituximab in Wachstum und Zelltod nicht beeinflusst wurde (STOLZ ET AL. 2008). Hierbei konnte eine Hochregulation der antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteine in den Rituximab-resistenten Zelllinien nachgewiesen werden. Deren Inhibition führte zu einem besseren Ansprechen auf das cross-linking der zuvor resistenten Zelllinien (STOLZ ET AL. 2008). Der Effekt des cross-linking durch sekundäre Antikörper spielt in vivo jedoch keine Rolle und direkte Evidenz über ein alternatives cross-linking durch Fcy-Rezeptoren von Effektorzellen gibt es bisher nicht (GLENNIE ET AL. 2007; DE HAIJ ET AL. 2010).

Trotz dieser Erkenntnisse wird über die Bedeutung des Effektes der direkten Zytotoxizität von anti-CD20-Antikörpern kontrovers diskutiert. GoLAY ET AL. (2000) konnten keinen signifikanten Effekt durch die alleinige Koinkubation verschiedener B-Zell-Lymphomzellen mit Rituximab zeigen. In den MTT-Versuchen dieser Arbeit konnte ebenfalls keine eindeutige Beeinflussung der Stoffwechselaktivität aller getesteten B-Zelllinien durch Koinkubation mit $10~\mu g$ / ml Rituximab festgestellt werden. Die Viabilitätsabnahme im MTT-Test nach 24-stündiger Inkubation mit Rituximab variierte von 4,99~% (Balm-3) bis zu einer maximalen Viabilitätsabnahme von 38,75~% (Karpas-422) in Bezug zur unbehandelten Mediumkontrolle (Abb. 5a, 5. 28).

Bei dem Antikörper GA101 handelt es sich um einen vollhumanisierten Typ-II-Antikörper. Das therapeutische Potential wurde durch verschiedene Proteinglykolysierungen verbessert

(MÖSSNER ET AL. 2010). Die Verbesserung beinhaltet eine Veränderung der Fab-Region des Antikörpers. Die veränderte Fab-Region generiert im Vergleich zu älteren Typ-I-Antikörpern eine neuartige Bindung des CD20-Moleküls (NIEDERFELLNER ET AL. 2011). Auf diese Weise soll die direkte Zytotoxizität dieses Antikörpers verstärkt sein.

In Viabilitätsuntersuchungen zeigte GA101 in der höchsten Konzentration gegenüber der unbehandelten Kontrolle nur bei den Zelllinien SuDHL-4 und Granta-519 eine signifikante Viabilitätsabnahme von 34,54 % bzw. 35,07 %. Bei den anderen Zelllinien konnten keine signifikanten Viabilitätsabnahmen festgestellt werden (Abb. 5b, S. 29). ALDUAIJ ET AL. (2011) zeigten in XTT-Versuchen bei der BL-Zelllinie Raji eine Viabilitätsminderung von ca. 35 % nach 48-stündiger Inkubation mit 10 µg / ml GA101. Diese Beobachtung entspricht etwa den Ergebnissen dieser Arbeit. Es wurde bereits nach 24-stündiger Koinkubation von Raji mit 10 μg / ml GA101 in dem methodisch sehr ähnlichen MTT-Test ein ähnlicher Wert gemessen Hier konnte eine Viabilitätsminderung von 30,14 % nach 24 Stunden gemessen werden (Abb. 5b, S. 29). Als Vergleich dienten in den Versuchen von ALDUAIJ ET AL. (2011) die Chemotherapeutika Doxorubicin und Mitoxantron in einer Dosierung von 1 μg / ml. Bei der Koinkubation der Zelllinie Raji mit diesen beiden Substanzen über 48 h kam es zu einer deutlichen Viabilitätsabnahme von ca. 80 % bis 90 % (ALDUAIJ ET AL. 2011). Durch Caspasen-Inhibiton und Bcl-Transfektion der Raji-Zellen ließ sich dieser Wert verringern. Dennoch blieb die Viabilitätsabnahme größer als 35 % und somit größer als die Viabilitätsabnahme, hervorgerufen durch 10 µg / ml GA101 (ALDUAIJ ET AL. 2011). Die Viabilitätsabnahme von GA101 wurde durch die Caspasen-Inhibition und Bcl-2 Expression hingegen nicht beeinflusst (ALDUAIJ ET AL. 2011). Dies zeigt, dass andere zytostatische Substanzen einen deutlich stärkeren Effekt auf die Viabilität der Zellen haben. Darüber hinaus wird dadurch deutlich, dass der Effekt eines Antikörpers ohne Effektorzelle oder Komplementsystem sehr gering ist.

Um die Ergebnisse des MTT-Tests näher zu spezifizieren, wurden nachfolgend Annexin-V-Fluos-/PI-Doppelfärbungen zum Apoptosenachweis durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Messdaten aus diesen Versuchen ergaben nach 24-stündiger Koinkubation der Zelllinie Raji mit 10 μg / ml GA101 hohe Werte an Annexin-V-Fluos- und Pl-positiv gefärbten Zellen. Diese frühapoptotisch Zellen sind als (Annexin-V-Fluos) spätapoptotisch / nekrotisch (PI-Färbung) zu werten. Methodisch bedingt ließen sich die Daten jedoch nicht reproduzieren und die Messungen waren inkonsistent. Die Messbereiche veränderten sich nach der Koinkubation mit GA101, so dass falsch hohe Werte für die apoptotischen und nekrotischen Zellen nach Inkubation mit GA101 gemessen wurden. Deshalb sind die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht aufgeführt. Die publizierten Ergebnisse ande-Arbeitsgruppen beinhalten Annexin-V-Fluos- / PI-Doppelfärbungsversuche zum Apoptosenachweis (MÖSSNER ET AL. 2010; ALDUAIJ ET AL. 2011).

Der Stellenwert von Annexin-V-Fluos-/PI-Doppelfärbungen zum Apoptosenachweis bei Untersuchungen der direkten Zytotoxizität monoklonaler Antikörper ist jedoch umstritten und wird aktuell kontrovers diskutiert (MATTES ET AL. 2009; GOLAY ET AL. 2010).

MÖSSNER ET AL. (2010) zeigten in ihrer Arbeit, dass GA101 Zellaggregationen bewirkt. Sie wurden in der Arbeit von MÖSSNER ET AL. als homotypische Aggregationen bezeichnet. Diese homotypischen Aggregationen konnten unter dem Lichtmikroskop nach Inkubation von GA101 mit der Zielzelle sichtbar gemacht werden (MÖSSNER ET AL. 2010).

MATTES ET AL. (2009) wiesen in ihrer Arbeit auf die Möglichkeit hin, dass durch mechanische Manipulation (z.B. Pipettieren) aggregierter Zellen Zellmembranschäden entstehen können. Diese Schäden könnten der Grund für eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen und einer möglichen Fehlmessung in den Annexin-V-Fluos- / PI-Doppelfärbungen sein. GOLAY ET AL. (2010) beschrieben eine weitere Möglichkeit, die zu einer Verfälschung von Annexin-V-Fluos-/PI-Doppelfärbungsversuchen führen könnte: Starke Zellaggregationen könnten eine durchflusszytometrische Messung dieser Versuche verfälschen. Die aggregierten Zellhaufen, die häufig aus 30 bis 100 Zellen bestehen, könnten aufgrund ihrer Größe aus dem Messbereich des Durchflusszytometers fallen und einer durchflusszytometrischen Detektion entgehen. Durch die fehlende Detektion solcher aggregierter, aber dennoch vitaler Zellen würde sich das prozentuale Verhältnis zwischen aggregierten, vitalen Zellen und nicht aggregierten, Annexin-V-positiven Zellen zu Gunsten der Annexin-V-positiven Zellen verschieben. Dies Überschätzen apoptotischen Zellen hätte ein der in Annexin-V-Fluos- / PI-Doppelfärbungsversuchen zur Folge (GOLAY ET AL. 2010). Darüber hinaus ist die Bildung von Aggregationen ein Energie-abhängiger Prozess. Tote Zellen sind dazu nicht mehr in der Lage. Dies vergrößert die Zahl an nicht-aggregierten toten Zellen in der durchflusszytometrisch gemessenen Population (GOLAY ET AL. 2010). Aufgrund dieser Effekte, die auch in den durchgeführten Vorversuchen der Annexin-V-Fluos-/PI-Doppelfärbungen in dem verwendeten Lymphom-Modell zum Tragen kamen, wurde zur weiterführenden Untersuchung eines direkt zytotoxischen Effektes der anti-CD20-Antikörper als alternative Methode eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Diese misst unabhängig von zellulärer Integrität und störenden Aggregationen den Einfluss der anti-CD20-Antikörper auf den Zellzyklus. Die Zellzyklusanalyse beinhaltet eine Zerstörung der Zellmembran. Danach wird der Anteil der im Zellkern enthaltenen DNA bestimmt und anhand dessen Rückschlüsse auf den Zellzyklus vorgenommen.

Bei den Zellzyklusanalysen konnten keine Veränderungen nach 24-stündiger Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit den drei anti-CD20-Antikörpern detektiert werden. Eine Zunahme fragmentierter DNA, wie es bei einem hohen Prozentsatz apoptotischer Zellen typisch wäre, konnte dabei weder nach Koinkubation mit Rituximab, noch mit Ofatumumab oder GA101 beobachtet werden.

Beim direkten Vergleich der drei Antikörper untereinander konnten in den MTT-Tests nur vereinzelt signifikante Unterschiede festgestellt werden. Es ergab sich hieraus keine eindeutige Überlegenheit eines Antikörpers im Bereich der direkten Zytotoxizität. Trotzdem zeigte der MTT-Test Viabilitätsreduktionen, die teilweise signifikant waren (Abb. 5a und b, S. 28-29). Die Enzymaktivität der Reduktasen und die dadurch bedingte Farbreaktion werden als Maß zur Beurteilung der Viabilität im MTT-Test herangezogen (Kapitel 2.3, S. 19). Die Intensität des Farbstoffs lässt Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu. Die metabolische

Aktivität dieser Reduktasen wird jedoch durch viele verschiedene Bedingungen beeinflusst, die bei der Kultivierung von Zellen auftreten können, ohne dass sich die tatsächliche Anzahl der viablen Zellen verändert. Um die klinische Relevanz der direkten Zytotoxizität (PCD) durch anti-CD20-Antikörper abzuschätzen, sind weiterführende Versuche wie Zellzyklusanalysen unbedingt notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen treffen nicht nur eine Aussage über die Viabilität der Zellen, sondern geben auch Hinweise auf vermindertes Wachstumsverhalten und Apoptoseinduktion. Die Frage, ob Zellen mit verminderter Enzymaktivität und Viabilität durch die Antikörperwirkung dauerhaft in Wachstum und Viabilität beeinflusst werden, kann der MTT-Test nicht beantworten. Hierzu wären weiterführende Versuche in Form von Klonogenitäts-Assays notwendig, die eine Aussage über die Reversibilität der Viabilitätsminderung treffen.

Da sich in den Versuchen dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss der drei anti-CD20-Antikörper auf den Zellzyklus und damit auch indirekt auf eine mögliche Apoptoseinduktion nachweisen ließ, kann zusammenfassend gesagt werden: Die direkte Zytotoxizität (PCD) spielte in den Versuchen dieser Arbeit zur Wirkung der getesteten anti-CD20-Antikörper nur eine untergeordnete Rolle. Es handelt sich allenfalls um einen geringen viabilitätsmindernden Effekt. Der Zellzyklus wird durch die alleinige Wirkung der drei anti-CD20-Antikörper nicht beeinflusst. Eine eindeutige Überlegenheit von GA101 oder Ofatumumab war in diesen *in-vitro-*Versuchen zur direkten Zytotoxizität nicht festzustellen.

4.2 Dosisabhängige Steigerung der Zielzelllyse durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Die ADCC stellt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den Hauptwirkmechanismus monoklonaler Antikörper dar (DE HAIJ ET AL. 2010). Dies lässt sich für Rituximab anhand klinischer Daten sagen (GLUCK ET AL. 2004; WENG UND LEVY 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GA101 hinsichtlich der ADCC den anderen anti-CD20-Antikörpern überlegen ist. Die Interaktion des Fc-Teils des Antikörpers mit den aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren der Effektorzellen ist von besonderer Bedeutung bei der ADCC-Vermittlung (CLYNES ET AL. 2000). Bei GA101 wurde der Fc-Teil des Antikörpers durch Glykolysierungen derart modifiziert, dass dieser eine gesteigerte Bindungsaffinität zu den aktivierenden Fcy-Illa-Rezeptoren der Effektorzellen besitzt (UMANA ET AL. 2006).

Im FACS-Zytotoxizitätstest konnte gezeigt werden, dass die Zielzelllyse CD20-positiver B-Zelllinien bei Koinkubation mit den drei anti-CD20-Antikörpern mit ansteigender Konzentration zunimmt. Bei sieben von acht eingesetzten B-Zelllinien konnte eine dosisabhängige Steigerung der Zielzelllyse durch die drei Antikörper beobachtet werden. Bei allen DLBCL-Zelllinien zeigte sich GA101 den anderen beiden Antikörpern Ofatumumab und Rituximab überlegen. GA101 war insbesondere im mittleren Konzentrationsbereich ($10^{-2}~\mu g$ / ml und $10^{-1}~\mu g$ / ml) effektiver als die beiden anderen anti-CD20-Antikörper. Darüber hinaus war auch die maximal erreichbare Zielzelllyse bei einer Konzentration von $10~\mu g$ / ml des Antikörpers GA101 höher als bei den anderen beiden Antikörpern gleicher Konzentration. Bei den MCL-Zelllinien war das Bild uneinheitlich. GA101 zeigte sich nur bei der MCL-Zelllinie

Mino den beiden anderen Antikörpern bei der Vermittlung der ADCC überlegen. Bei den MCL-Zelllinien Jeko und Granta-519 lag die spezifische Zielzelllyse durch Koinkubation mit NK-Zellen und Ofatumumab in einem ähnlichen Bereich wie bei der Koinkubation mit GA101. Ofatumumab und GA101 zeigten sich gegenüber Rituximab bei der Zelllinie Granta-519 im mittleren Konzentrationsbereich und bei der Zelllinie Jeko im gesamten Konzentrationsbereich überlegen (Abb. 7b, S. 34). Bei der BL-Zelllinie Raji konnte wie bei den DLBCL-Zelllinien eine dosisabhängige Steigerung der Zielzelllyse durch die anti-CD20-Antikörper erreicht werden. GA101 war hier ebenfalls den beiden anderen anti-CD20-Antikörpern im mittleren Konzentrationsbereich überlegen. Die anti-CD20-Antikörper konnten bei der BL-Zelllinie Ramos nur eine geringe Steigerung der Zielzelllyse bewirken. Die maximale Steigerung lag bei 9,88 % durch Koinkubation mit 0,01 µg / ml GA101 (Abb. 7b, S. 34). Die maximale Zielzelllyse wurde bei dieser hochsensitiven Zelllinie bereits durch die Koinkubation der Zielzellen mit NK-Zellen erreicht. Die Aktivität der NK-Zellen betrug nach der Koinkubation mit der BL-Zelllinie Ramos ohne Antikörper 12,31 %. Dieser Wert entsprach der höchsten NK-Zell-Aktivität, die in den Versuchen durch die ausschließliche Koinkubation von Zielzellen und NK-Zellen ohne Antikörper gemessen werden konnte (Abb. 8b, S. 39).

Bei den Zelllinien SuDHL-4, Mino und Jeko konnte bei steigender Antikörperkonzentration ein Maximalwert der spezifischen Zielzelllyse bei submaximaler Antikörperkonzentration beobachtet werden. Bei maximaler Antikörperkonzentration kam es zu einem Rückgang der Zielzelllyse. Ein ähnlicher Aspekt konnte bereits 1987 bei Versuchen mit chimären Antikörpern und ihrer ADCC-Vermittlung beschrieben werden (BRÜGGEMANN ET AL. 1987). Auch hier kam es bei submaximaler Antikörperkonzentration zur maximalen Zielzelllyse. Höhere Konzentrationen führten zu einem Rückgang der Zielzelllyse (BRÜGGEMANN ET AL. 1987). Dieser interessante Aspekt sollte weiter untersucht und in zukünftigen Studien zur Dosisfindung bei Antikörpern Beachtung finden.

PIEVANI ET AL. (2011) konnten in einer aktuellen Arbeit zeigen, dass GA101 potenter in der ADCC-Vermittlung ist als Rituximab. In diesen Versuchen handelte es sich um ein Lymphom-Modell mit einem Panel aus CIK-Zellen (Zytokin-induzierte Killerzellen) als Effektorzellen und verschiedenen B-Zelllinien als Zielzellen. Bei den CIK-Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von *ex-vivo*-expandierten T-Lymphozyten, welche phänotypisch eine Mischung aus T- und NK-Zellen darstellen (SANGIOLO 2011). Durch die mit geringem Aufwand verbundene *ex-vivo*-Expansion von CIK-Zellen, könnten sie parallel zu einer Immuntherapie transfundiert, die ADCC als zusätzliche Effektorzellen verbessern (SANGIOLO 2011). Für die Antikörper bedingte Steigerung der Zielzelllyse wurden in dem Lymphom-Modell von PIEVANI ET AL. NK-Zellen verantwortlich gemacht, welche die CIK-Zellkulturen beinhalten (PIEVANI ET AL. 2011). GA101 zeigte sich in diesen Versuchen effektiver als Rituximab. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die ADCC-Vermittlung durch GA101 unabhängig von der Aktivierung des Komplementsystems zu sein scheint. Anders als bei Rituximab wird bei GA101 die ADCC-Vermittlung durch das Komplementsystem nicht inhibiert (PIEVANI ET AL. 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und erweitern die Aussagen von PIEVANI ET AL. in einem anderen Lymphom-Modell. Im Gegensatz zu den Versuchen von PIEVANI ET AL. beinhaltete das Lymphom-Modell dieser Arbeit primär NK-Zellen als Effektorzellen in einem festen Effektor-Zielzellverhältnis und sechs verschiedene Antikörperkonzentrationen. Somit konnte eine dosisabhängige Steigerung der Zielzelllyse durch die getesteten anti-CD20-Antikörper koinkubiert mit NK-Zellen festgestellt und eine Überlegenheit von GA101 gegenüber Rituximab und Ofatumumab bei verschiedenen Dosierungen gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigte GA101 bei deutlich niedrigeren Konzentrationen bei einem Teil der B-Zelllinien die gleiche lytische Effizienz wie Rituximab bei entsprechend höheren Konzentrationen. Besonders deutlich war dies bei den DLBCL-Zelllinien. Die EC50 lag bei der DLBCL-Zelllinie SuDHL-4 koinkubiert mit GA101 bei einem Wert von $10^{-2995}\,\mu g$ / ml und somit deutlich niedriger als bei Rituximab ($10^{-1,766}\,\mu g$ / ml) und Ofatumumab ($10^{-2,589}\,\mu g$ / ml) (Tab. 5, S. 36). Dies könnte bedeuten, dass GA101 bereits bei submaximaler Antikörperkonzentration im Gegensatz zu Rituximab eine ausreichende ADCC-Vermittlung und Zielzelllyse generiert. Beteiligung des Liquors und große solide Tumoranteile sind prognostisch ungünstig (TALET AL. 2011; GAUDIO ET AL. 2011). Insbesondere im Liquor und bei großen, soliden Tumoranteilen im Sinne eines *bulky disease*, wo die Antikörperkonzentration sowie die Antikörperwirkung durch mangelnde Penetration gering ist, könnte GA101 eine verbesserte Zielzelllyse bedingen.

Die höhere maximale Zielzelllyse der DLBCL-Zelllinien durch GA101 zeigt außerdem, dass ein Teil der Zellen nur durch GA101 nicht aber durch Rituximab erreicht wird. Unabhängig von der Dosierung sind diese Zellen durch die Behandlung mit Rituximab nicht zu eliminieren (Abb. 7b, S. 34). Durch das Erreichen dieser Zellen könnten Patienten, die unter herkömmlicher Immunchemotherapie einen Krankheitsprogress zeigen und somit primär therapierefraktär sind, mit GA101 erfolgreicher therapiert werden. Unter der Annahme, dass diese Zellen ein möglicher Ursprung eines Rezidivs sind, stellt GA101 auch eine vielversprechende Therapie zur Vermeidung eines Rezidivs dar.

4.3 Dosisabhängige Steigerung der NK-Zell-Aktivität

Die in dem FACS-Zytotoxizitätstest nachgewiesene Überlegenheit von GA101 gegenüber Rituximab und Ofatumumab im Bereich der lytischen Effizienz von Lymphomzellen ist das Resultat einer vermehrten NK-Zell-Aktivität. Mit Hilfe der CD107a-Assays konnte gezeigt werden, dass die NK-Zell-Aktivität durch die anti-CD20-Antikörper ebenfalls dosisabhängig gesteigert wird. Die maximale Aktivitätssteigerung lag bei allen B-Zelllinien im mittleren Konzentrationsbereich zwischen $10^{-3}~\mu g$ / ml und $10^{-1}~\mu g$ / ml. Der Grund für die verbesserte Zielzelllyse ist eine vermehrte Degranulation von NK-Zellen, welche einer vermehrten NK-Zell-Aktivität entspricht (FISCHER ET AL. 2006).

In den Versuchen zur NK-Zell-Aktivität zeigte sich GA101 den anderen beiden Antikörpern deutlich überlegen. Es konnte bei allen B-Zelllinien durch Koinkubation mit NK-Zellen und GA101 eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität im Vergleich zu den anderen anti-CD20-Antikörpern ermittelt werden. Im mittleren Konzentrationsbereich ($10^{-2}~\mu g$ / ml und $10^{-1}~\mu g$ / ml) war

diese Steigerung bei allen B-Zelllinien signifikant größer als bei den anderen anti-CD20-Antikörpern (Abb. 8b, S. 39). Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) zur halbmaximalen NK-Zell-Aktivierung lag bei allen Zelllinien koinkubiert mit GA101 bei einer Konzentration, die etwa eine Zehnerpotenz niedriger war als bei den anderen beiden Antikörpern Ofatumumab und Rituximab (Tab. 6, S. 40). Bei den als Kontrolle eingesetzten T-NHL-Zelllinien konnte nach Koinkubation mit den höchsten Antikörperkonzentrationen nur eine minimale Steigerung der NK-Zell-Aktivität nachgewiesen werden. Dies zeigt einerseits, dass eine unspezifische Aktivierung der NK-Zellen durch ungebundene Antikörper in den gezeigten Versuchen nicht existiert und andererseits, dass unspezifische Bindungen der Antikörper an andere Oberflächenstrukturen nicht vorliegen. Insgesamt zeigen diese Versuche als interne Kontrolle die hohe Validität der Ergebnisse auf.

Hervorzuheben ist, dass auch bei der BL-Zelllinie Ramos, die hoch sensitiv gegenüber einer NK-Zell-Attacke war, die NK-Zell-Aktivität im Gegensatz zur spezifischen Zielzelllyse weiterhin konzentrationsabhängig gesteigert werden konnte. Auch bei dieser Zelllinie war die EC₅₀ von GA101 geringer als bei den anderen beiden Antikörpern.

Entsprechend den Ergebnissen der spezifischen Zielzelllyse konnte auch im CD107a-Assay bei einigen Zelllinien eine maximale NK-Zell-Aktivität gemessen werden, die größer war als bei den beiden anderen Antikörpern. Bei den DLBCL-Zelllinien SuDHL-4 und Karpas-422 sowie bei den MCL-Zelllinien Mino und Jeko war die maximal erreichbare NK-Zell-Aktivität größer als bei den anderen beiden Antikörpern (Abb. 8b, S. 39). Die größere maximale NK-Zell-Aktivierung bedingt durch GA101 korrelierte bei den DLBCL-Zelllinien SuDHL-4 und Karpas-422 in den Zytotoxizitätsversuchen mit einer größeren maximalen spezifischen Zielzelllyse (Abb. 7b. S.34).

Viele Resistenzmechanismen beruhen auf einer verminderten Aktivität von NK-Zellen (Kapitel 1.4, S. 9-11). Ein wichtiger Aspekt ist der genetische Polymorphismus des Fcy-Illa-Rezeptors. Bei Personen mit niedrig affinen Rezeptoren kommt es zu einer verminderten NK-Zell-Aktivierung durch monoklonale Antikörper (CARTRON 2002; WENG UND LEVY 2003; DALL'OZZO ET AL. 2004). Durch Antikörper mit Fc-Teil-Modifikationen und stärkerer Bindungsaffinität könnte der Nachteil eines niedrig affinen Rezeptors ausgeglichen werden.

4.4 Ausblick auf Risiken und Möglichkeiten einer klinischen Anwendung

GA101 zeigt *in vitro* eine Verbesserung der ADCC (Abb. 7b, S. 34). *In vivo* könnte dies eine verbesserte B-Zell-Depletion bedeuten. Eine verbesserte Depletion maligner B-Zellen beinhaltet auch eine vermehrte Depletion normaler, nicht maligne transformierter B-Zellen (PATZ ET AL. 2011). Diese Depletionsverstärkung könnte neben einer möglichen Therapieverbesserung auch eine stärkere Immunsuppression bedingen. GA101 könnte somit zu stärkeren Nebenwirkungen durch die Immunsuppression führen, was einen klinischen Einsatz von GA101 eventuell limitieren könnte.

Neben einem stärkeren Nebenwirkungsprofil besteht die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit gezeigten *in-vitro-*Effekte in vivo weniger stark ausgeprägt sind. In einer aktuellen

Arbeit konnten BOROSS ET AL. (2011) zeigen, dass insbesondere bei großer Tumorlast die Verstärkung der ADCC durch das Komplementsystem eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Typ-I-Antikörper (Rituximab, Ofatumumab) könnten durch die stärkere Aktivierung des Komplementsystems *in vivo* bei großer Tumorlast auf diese Weise effektiver sein als Typ-II-Antikörper (GA101) (BOROSS ET AL. 2011).

Die *in-vitro-*Daten dieser Arbeit zeigen jedoch eindeutig, dass GA101 als modifizierter anti-CD20-Antikörper im Vergleich zu Rituximab und Ofatumumab deutliche Verbesserungen im Bereich der NK-Zell-Aktivität und der ADCC aufweist. Sowohl die Elimination der Zielzellen als auch die Aktivität der Effektorzellen zeigen sich im Vergleich zu den anderen Antikörpern verbessert. Unter Einschluss aller Risikogruppen könnte dies klinisch eine Verbesserung der Erkrankungskontrolle und eine bessere Heilungsrate der betroffenen Patienten bedeuten.

Ob sich der hier gezeigte *in-vitro*-Vorteil von GA101 in klinischen Anwendungen bestätigen wird, bleibt abzuwarten. Insbesondere für Patienten mit hohem Rezidivrisiko durch extranodalen Befall, großer Tumormasse (*bulky disease*), zerebralem Befall oder Rezeptorpolymorphismus stellt GA101 als modifizierter Antikörper eine vielversprechende Therapie dar. Auf diese Patientengruppen sollte ein besonderes Augenmerk in klinischen Studien gerichtet werden.

5 Zusammenfassung

Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ist einer der Hauptwirk-mechanismen monoklonaler anti-CD20-Antikörper bei der Elimination maligner B-Zell-Lymphome. Trotz moderner Immunchemotherapien gibt es Therapieversager. Neue anti-CD20-Antikörper mit Modifikationen am Fc- und Fab-Teil könnten die Heilungsrate verbessern und die Rezidivrate verringern. Zu ihnen zählen GA101 und Ofatumumab. In einem Lymphom-Modell mit NK-Zellen als Effektorzellen und verschiedenen B-Lymphomzellen als Zielzellen wurde die Effizienz der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität zwischen Rituximab, Ofatumumab und GA101 verglichen. Dies ist der erste direkte Vergleich zwischen den drei Antikörpern Rituximab, Ofatumumab und GA101.

Dieser Vergleich zeigt auf, dass GA101 hinsichtlich der ADCC Rituximab überlegen ist. Ofatumumab ist Rituximab hinsichtlich der ADCC ebenbürtig. Der neu entwickelte Drittgenerations-Antikörper GA101 besitzt eine höhere Effizienz in der Vermittlung der NK-Zellabhängigen Zielzelllyse. Der Grund für die verbesserte Zielzelllyse ist die durch GA101 gesteigerte NK-Zell-Aktivität. GA101 ist nicht nur effizienter im Bereich niedriger Antikörperkonzentrationen, sondern zeigt auch bei einigen Lymphomzelllinien eine größere maximale Zielzelllyse und NK-Zell-Aktivität. Sowohl die NK-Zell-Aktivität als auch die zytolytische Effizienz konnten bei allen drei Antikörpern konzentrationsabhängig gesteigert werden. Die mittlere effektive Konzentration, die zu einer halbmaximalen NK-Zell-Aktivität (EC₅₀) führte, lag bei GA101 in einem Bereich, der etwa eine Zehnerpotenz niedriger war als bei Rituximab und Ofatumumab. Die Versuche zur direkten Zytotoxizität monoklonaler Antikörper in dieser Arbeit zeigen die geringe Bedeutung einer Antikörperwirkung ohne Effektorzelle auf.

Durch die Verbesserungen der ADCC stellt GA101 bei Hochrisikopatienten, bei Patienten mit Krankheitsprogress und im Rezidiv eine vielversprechende neue Therapieoption dar. In weiterführenden klinischen Studien gilt es, dieses Ergebnis *in vivo* zu prüfen und Patientengruppen zu definieren, die potentiell am stärksten von einer Therapie mit GA101 profitieren.

6 Literaturverzeichnis

Alas S, Ng CP, Bonavida B (2002): Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* <u>8</u>(3): 836-845.

- Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, Shimada K, Chan CH, Tutt A, Beers SA, et al. (2011): Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 117(17): 4519-4529.
- Almalte Z, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C, Amre DK, Sinnett D, Ahmad A (2011): Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood* <u>118</u>(5): 1323-1328.
- Anon. (1997): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood <u>89(</u>11): 3909-3918.
- Armitage JO, Weisenburger DD (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16(8): 2780-2795.
- Aung T, Chapuy B, Vogel D, Wenzel D, Oppermann M, Lahmann M, Weinhage T, Menck K, Hupfeld T, Koch R, et al. (2011): Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(37): 15336-15341.
- Beum PV, Lindorfer MA, Taylor RP (2008): Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J Immunol* 181(4): 2916-2924.
- Bird CH, Sutton VR, Sun J, Hirst CE, Novak A, Kumar S, Trapani JA, Bird PI (1998): Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 18(11): 6387-6398.
- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC (2004): Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* <u>104(10)</u>: 3009-3020.
- Borgerding A, Hasenkamp J, Glass B, Wulf G, Trumper L (2010 a): Rituximab retherapy in patients with relapsed aggressive B cell and mantle cell lymphoma. *Ann Hematol* 89(3): 283-289.
- Borgerding A, Hasenkamp J, Engelke M, Burkhart N, Trumper L, Wienands J, Glass B (2010 b): B-lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class I expression. *Exp Hematol* 38(3): 213-221.
- Boross P, Jansen JH, de Haij S, Beurskens FJ, van der Poel CE, Bevaart L, Nederend M, Golay J, van de Winkel JG, Parren PW, et al. (2011): The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica* 152(4): 493-496

Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, Waldmann H, Neuberger MS (1987): Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 166(5): 1351-1361.

- Burkitt D (1958): A sarcoma involving the jaws in African children. Br J Surg 46(197): 218-223.
- Buske C, Hoster E, Dreyling M, Eimermacher H, Wandt H, Metzner B, Fuchs R, Bittenbring J, Woermann B, Hohloch K, et al. (2009): The addition of rituximab to front-line therapy with CHOP (R-CHOP) results in a higher response rate and longer time to treatment failure in patients with lymphoplasmacytic lymphoma: results of a randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leukemia* 23(1): 153-161.
- Byrd JC (2002): The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99(3): 1038-1043.
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES (1999): Mantle-cell lymphoma. Semin Hematol 36(2): 115-127.
- Cartron G (2002): Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcgamma RIIIa gene. *Blood* <u>99(3)</u>: 754-758.
- Cerwenka A, Lanier LL (2001): Natural killer cells, viruses and cancer. Nat Rev Immunol 1(1): 41-49.
- Cheson BD (2010): Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 28(21): 3525-3530.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets. *Nat Med* <u>6</u>(4): 443-446.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, et al. (2002): CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346(4): 235-242.
- Coiffier B, Lepretre S, Pedersen LM, Gadeberg O, Fredriksen H, van Oers MH, Wooldridge J, Kloczko J, Holowiecki J, Hellmann A, et al. (2008): Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* 111(3): 1094-1100.
- Dalle S, Dupire S, Brunet-Manquat S, Reslan L, Plesa A, Dumontet C (2009): In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res* <u>15(</u>3): 851-857.
- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G (2004): Ritux-imab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64(13): 4664-4669.
- Davis TA, Czerwinski DK, Levy R (1999): Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res* <u>5</u>(3): 611-615.

de Haij S, Jansen JH, Boross P, Beurskens FJ, Bakema JE, Bos DL, Martens A, Verbeek JS, Parren PW, van de Winkel JG, et al. (2010): In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res* 70(8): 3209-3217.

- de Koning PJ, Kummer JA, de Poot SA, Quadir R, Broekhuizen R, McGettrick AF, Higgins WJ, Devreese B, Worrall DM, Bovenschen N (2011): Intracellular Serine Protease Inhibitor SERPINB4 Inhibits Granzyme M-Induced Cell Death. *PLoS One* <u>6</u>(8): e22645.
- Denizot F, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2): 271-277.
- Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA (1999): False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations. *Leukemia* 13(10): 1601-1607.
- Dunleavy K, Wilson WH, Kaplan LD (2006): The case for rituximab in AIDS-related lymphoma. *Blood* 107(7): 3014-3015.
- Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A (1990): A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t (14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood* <u>75(3)</u>: 709-714.
- Epstein AL, Herman MM, Kim H, Dorfman RF, Kaplan HS (1976): Biology of the human malignant lymphomas. III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer* <u>37(5)</u>: 2158-2176.
- Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, Villamor N, Rozman M, Bea S, Gine E,Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E (2007): Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 109(12): 2473-2480.
- Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, et al. (2005): Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23(18): 4117-4126.
- Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L (2006): The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol* 34(6): 753-759.
- Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA, Jr., Miller TP (1993): Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 328(14): 1002-1006.
- Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965): Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* <u>18</u>: 522-529.
- Foran JM, Norton AJ, Micallef IN, Taussig DC, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister TA (2001): Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis. *Br J Haematol* <u>114(4)</u>: 881-883.

Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, Bock HP, Repp R, Wandt H, Pott C, Seymour JF, Metzner B, Hanel A, et al. (2006): Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 108(13): 4003-4008.

- Fried J, Perez AG, Clarkson BD (1978): Rapid hypotonic method for flow cytofluorometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem* 26(11): 921-933.
- Gaudio F, Giordano A, Perrone T, Pastore D, Curci P, Delia M, Napoli A, de' Risi C, Spina A, Ricco R, et al. (2011): High Ki67 index and bulky disease remain significant adverse prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma before and after the introduction of rituximab.

 Acta Haematol 126(1): 44-51.
- Geisler C, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, Eriksson M, Nordstrom M, Kimby E, Boesen AM, et al. (2008): Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* <u>112</u>(7): 2687-2693.
- Geisler C, Kolstad A, Laurell A, Raty R, Nordic Lymphoma G, Mantle Cell Lymphoma S (2009): Mantle cell lymphoma does primary intensive immunochemotherapy improve overall survival for younger patients? *Leuk Lymphoma* 50(8): 1249-1256.
- Geisler C, Kolstad A, Laurell A, Raty R, Jerkeman M, Eriksson M, Nordstrom M, Kimby E, Boesen AM, Nilsson-Ehle H, et al. (2010): The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). Blood 115(8): 1530-1533.
- Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES (2001): Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* <u>97(5)</u>: 1392-1398.
- Glass B, Kloess M, Bentz M, Schlimok G, Berdel WE, Feller A, Trumper L, Loeffler M, Pfreundschuh M, Schmitz N (2006): Dose-escalated CHOP plus etoposide (MegaCHOEP) followed by repeated stem cell transplantation for primary treatment of aggressive high-risk non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107(8): 3058-3064.
- Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP (2007): Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44(16): 3823-3837.
- Gluck WL, Hurst D, Yuen A, Levine AM, Dayton MA, Gockerman JP, Lucas J, Denis-Mize K, Tong B, Navis D, et al. (2004): Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res* <u>10(7)</u>: 2253-2264.

Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M (2000): Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 95(12): 3900-3908.

- Golay J, Manganini M, Facchinetti V, Gramigna R, Broady R, Borleri G, Rambaldi A, Introna M (2003): Rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against neoplastic B cells is stimulated strongly by interleukin-2. *Haematologica* 88(9): 1002-1012.
- Golay J, Bologna L, Andre PA, Buchegger F, Mach JP, Boumsell L, Introna M (2010): Possible misinter-pretation of the mode of action of therapeutic antibodies in vitro: homotypic adhesion and flow cytometry result in artefactual direct cell death. *Blood* <u>116</u>(17): 3372-3373; author reply 3373-3374.
- Griffin FM, Jr., Griffin JA, Silverstein SC (1976): Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J Exp Med* <u>144(</u>3): 788-809.
- Hagberg H, Gisselbrecht C (2006): Randomised phase III study of R-ICE versus R-DHAP in relapsed patients with CD20 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) followed by high-dose therapy and a second randomisation to maintenance treatment with rituximab or not: an update of the CORAL study. *Ann Oncol* 17 Suppl 4: iv31-32.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Clearyml, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* <u>84</u>(5): 1361-1392.
- Hesseling PB, Molyneux E, Kamiza S, Broadhead R (2008): Rescue chemotherapy for patients with resistant or relapsed endemic Burkitt's lymphoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(6): 602-607.
- Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO (1996): Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* <u>88</u>(11): 4085-4089.
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, et al. (2008): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* <u>111(</u>2): 558-565.
- Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, et al. (1997): Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia* 11(1): 64-72.
- Jaffe ES (2009): The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 113, 523-531.
- Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T (1998): Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 102(5): 1323-1326.

Jermann M, Jost LM, Taverna C, Jacky E, Honegger HP, Betticher DC, Egli F, Kroner T, Stahel RA (2004): Rituximab-EPOCH, an effective salvage therapy for relapsed, refractory or transformed B-cell lymphomas: results of a phase II study. *Ann Oncol* <u>15(3)</u>: 511-516.

- Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* <u>5</u>(6): 319-334.
- Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, Medeiros LJ, Oudat R, Keating M, Morgan MB, Curiel TJ, Ford RJ (2002): Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res* 26(9): 849-855.
- Lehmann C, Glass B, Zeis M, Schmitz N, Uharek L (1999): Investigating the lysis of small-cell lung cancer cell lines by activated natural killer (NK) cells with a fluorometric assay for NK-cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 48(4): 209-213.
- Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhrsen U, Metzner B, Eimermacher H, Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, et al. (2005): Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 23(9): 1984-1992.
- Lok MS, Koshiba H, Han T, Abe S, Minowada J, Sandberg AA (1979): Establishment and characterization of human B-lymphocytic lymphoma cell lines (BALM-3, -4 and -5); intraclonal variation in the B-cell differentiation stage. *Int J Cancer* <u>24(5)</u>: 572-578.
- Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, Ye H, Kunich JC, Garrett EN, Peng J, Cousens LS, Gelb AB, Heise C, et al. (2007): Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother* 30(1): 64-74.
- Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Maruyama D, Kim SW, Watanabe T, Kobayashi Y, Tobinai K, Matsuno Y (2009): Histological and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy. *Cancer Sci* 100(1): 54-61.
- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. (1997): IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* <u>90(6)</u>: 2188-2195.
- Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J (2003): In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101(3): 949-954.

Martin A, Conde E, Arnan M, Canales MA, Deben G, Sancho JM, Andreu R, Salar A, Garcia-Sanchez P, Vazquez L, et al. (2008): R-ESHAP as salvage therapy for patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: the influence of prior exposure to rituximab on outcome. A GEL/TAMO study. *Haematologica* 93(12): 1829-1836.

- Mattes MJ, Michel RB, Goldenberg DM, Sharkey RM (2009): Induction of apoptosis by cross-linking antibodies bound to human B-lymphoma cells: expression of Annexin V binding sites on the antibody cap. *Cancer Biother Radiopharm* 24(2): 185-193.
- Morel P, Lepage E, Brice P, Dupriez B, D'Agay MF, Fenaux P, Gosselin B, Bauters F, Gisselbrecht C (1992): Prognosis and treatment of lymphoblastic lymphoma in adults: a report on 80 patients. *J Clin Oncol* <u>10(7)</u>: 1078-1085.
- Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L (2002): What is a natural killer cell? *Nat Immunol* <u>3</u>(1): 6-8.
- Mössner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, et al. (2010): Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115(22): 4393-4402.
- Nickenig C, Dreyling M, Hoster E, Pfreundschuh M, Trumper L, Reiser M, Wandt H, Lengfelder E, Unterhalt M, Hiddemann W (2006): Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Cancer* 107(5): 1014-1022.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple me-thod for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, Franke A, Wiechmann K, Jenewein S, Slootstra JW, et al. (2011): Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118(2): 358-367.
- Oriol A, Ribera JM, Bergua J, Gimenez Mesa E, Grande C, Esteve J, Brunet S, Moreno MJ, Escoda L, Hernandez-Rivas JM, et al. (2008): High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer* 113(1): 117-125.
- Ortaldo JR, Woodhouse C, Morgan AC, Herberman RB, Cheresh DA, Reisfeld R (1987): Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies. *J Immunol* 138(10): 3566-3572.

Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K, et al. (2007): Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood* 109(7): 2773-2780.

- Patz M, Isaeva P, Forcob N, Muller B, Frenzel LP, Wendtner CM, Klein C, Umana P, Hallek M, Krause G (2011): Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 152(3): 295-306.
- Pawluczkowycz AW, Beurskens FJ, Beum PV, Lindorfer MA, van de Winkel JG, Parren PW, Taylor RP (2009): Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol* 183(1): 749-758.
- Pedersen AE, Jungersen MB, Pedersen CD (2011): Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies. *Immunology* 133(2): 239-245.
- Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L (2005): CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. Leukemia 19(5): 835-840.
- Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, et al. (2008): Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9(2): 105-116.
- Pievani A, Belussi C, Klein C, Rambaldi A, Golay J, Introna M (2011): Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies. *Blood* 117(2): 510-518.
- Pulvertaft JV (1964): Cytology of Burkitt's Tumor (African Lymphoma). Lancet 1964, 1: 238-240.
- Romaguera JE, Medeiros LJ, Hagemeister FB, Fayad LE, Rodriguez MA, Pro B, Younes A, McLaughlin P, Goy A, Sarris AH, et al. (2003): Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer* 97(3): 586-591.
- Ruan J, Martin P, Coleman M, Furman RR, Cheung K, Faye A, Elstrom R, Lachs M, Hajjar KA, Leonard JP (2010): Durable responses with the metronomic rituximab and thalidomide plus prednisone, etoposide, procarbazine, and cyclophosphamide regimen in elderly patients with recurrent mantle cell lymphoma. *Cancer* 116(11): 2655-2664.
- Sangiolo D (2011): Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors. *J Cancer* 2: 363-368.
- Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Viardot A, Nickenig C, Bentz M, Peschel C, Trümper L, et al. (2009): Aggressive Chemotherapy (CHOEP-14) and Rituximab or High-Dose Therapy (MegaCHOEP) and Rituximab for Young, High-Risk Patients with Aggressive B-Cell Lymphoma: Results of the MegaCHOEP Trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *ASH Annual Meeting Abstracts* 404: 208-210.

Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed Non-Hodgkin-Lymphoma. *Int J Cancer* 19(5): 621-626.

- Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, et al. (2005): Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 23(22): 5027-5033.
- Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, et al. (2007): The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109(5): 1857-1861.
- Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, Armitage JO, Bonadonna G, Brittinger G, Cabanillas F, Canellos GP, Coiffier B, Connors JM, et al. (1993): A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 329(14): 987-994.
- Shivdasani RA, Hess JL, Skarin AT, Pinkus GS (1993): Intermediate lymphocytic lymphoma: clinical and pathologic features of a recently characterized subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* <u>11</u>(4): 802-111.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y (2005): Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* <u>42</u>(4): 501-510.
- Stolz C, Hess G, Hahnel PS, Grabellus F, Hoffarth S, Schmid KW, Schuler M (2008): Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood* 112(8): 3312-3321.
- Sung MW, Yasumura S, Johnson JT, Van Dongen GA, Whiteside TL (1995): Natural killer (NK) cells as effectors of antibody-dependent cytotoxicity with chimeric antibodies reactive with human squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 61(6): 864-872.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO Classification of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (WHO Classification of Tumours, <u>Volume 2</u>), Fourth Edition. *WHO Press, Geneva 2008*.
- Tai WM, Chung J, Tang PL, Koo YX, Hou X, Tay KW, Quek R, Tao M, Lim ST (2011): Central nervous system (CNS) relapse in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): pre- and post-rituximab. *Ann Hematol* <u>90</u>(7): 809-818.
- Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF (1986): Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 16(8): 881-887.
- Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PW, Hack CE, Dechant M, et al. (2004): Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* <u>104</u>(6): 1793-1800.

Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, van Meerten T, Ebeling S, Vink T, Slootstra JW, et al. (2006): The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 177(1): 362-371.

- Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, Giles FJ, Verstovsek S, Wierda WG, Pierce SA, et al. (2006): Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 106(7): 1569-1580.
- Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, Tedder TF (2004): The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199(12): 1659-1669.
- Umana P, Mössner E, Bruenker P, Unsin G, Puentener U, Suter T, Grau R, Schmidt C, Gerdes C, Nopora A, et al. (2006): Novel 3rd Generation Humanized Type II CD20 Antibody with Glycoengineered Fc and Modified Elbow Hinge for Enhanced ADCC and Superior Apoptosis Induction. *ASH Annual Meeting Abstracts* 108, 229.
- Vilches C, Parham P (2002): KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20:217-251.
- Vujanovic NL, Yasumura S, Hirabayashi H, Lin WC, Watkins S, Herberman RB, Whiteside TL (1995): Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues. *J Immunol* 154(1): 281-289.
- Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ (2008): NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* <u>111(</u>3): 1456-1463.
- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987): A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* <u>8</u> (1): 1-8.
- Weide R, Hess G, Koppler H, Heymanns J, Thomalla J, Aldaoud A, Losem C, Schmitz S, Haak U, Huber C, et al. (2007): High anti-lymphoma activity of bendamustine/mitoxantrone/rituximab in rituximab pretreated relapsed or refractory indolent lymphomas and mantle cell lymphomas. A multicenter phase II study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Leuk Lymphoma* 48(7): 1299-1306.
- Weisdorf DJ, Andersen JW, Glick JH, Oken MM (1992): Survival after relapse of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: implications for marrow transplantation. *J Clin Oncol* 10(6): 942-947.
- Weng WK, Levy R (2001): Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 98(5): 1352-1357.
- Weng WK, Levy R (2003): Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* <u>21(21)</u>: 3940-3947.

Whiteside TL, Herberman RB (1995): The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* <u>7</u>(5): 704-710.

- Wierda WG, Padmanabhan S, Chan GW, Gupta IV, Lisby S, Osterborg A (2011): Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase II international study. *Blood* <u>118</u>(19): 5126-9.
- Zhou Y, Wang H, Fang W, Romaguer JE, Zhang Y, Delasalle KB, Kwak L, Yi Q, Du XL, Wang M (2008): Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer* 113(4): 791-798.
- Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, Harris NL (1993): Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol* 100(4): 373-385