

Aus dem Institut für Neurologie mit Experimenteller Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Neurologische Nebenwirkungen einer Immuncheckpoint-  
Therapie**

**Neurological adverse events of immune checkpoint  
therapy**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lorena Ginesta Roque

aus Aschaffenburg

Datum der Promotion: 30.11.2023

I Vorwort

**Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:**

1. Knauss, S., Ginesta Roque, L., Hühnchen, P., Heinzerling L., Böhmerle W, Endres, M. Neurologische Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren. Nervenarzt 90, 138–147 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00115-018-0571-8>

## II Inhaltsverzeichnis

I Vorwort.....	1
II Inhaltsverzeichnis .....	2
III Tabellenverzeichnis.....	4
IV Abbildungsverzeichnis .....	5
V Abkürzungsverzeichnis .....	6
VI Kurzzusammenfassung .....	10
VII Abstract .....	11
1. Einleitung.....	12
1.1 Tumormimmuntherapie mit ICI.....	12
1.1.1 Wirkmechanismus.....	15
1.1.2 Substanzen .....	16
1.1.3 Immunvermittelte Nebenwirkungen.....	22
1.1.4 Immunvermittelte neurologische Nebenwirkungen .....	22
1.1.5 Biomarker.....	26
1.1.6 Zielsetzung und Fragestellung .....	26
2. Material und Methodik.....	27
2.1 Material .....	27
2.1.1 REDCap Datenbank .....	27
2.1.2 Chemikalien .....	27
2.1.3 Software, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.2 Methodik .....	29
2.2.1 Literaturrecherche.....	29
2.2.2 Kohortenstudie TITAN <sup>2</sup> .....	30
2.2.3 Retrospektive Arbeit .....	46
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Literaturrecherche .....	47
3.2 TITAN <sup>2</sup> -Studie.....	51
3.2.1 Beschreibung der Population .....	52
3.2.2 Fragebögen.....	72
3.2.3 Klinisch-neurologische Untersuchungen.....	77
3.2.4 Elektrophysiologischer Befund .....	79
3.2.5 Massenzytometrie (CyTOF) .....	80
3.3 Retrospektive Arbeit .....	85
3.4 Zusammenfassung .....	93

4. Diskussion .....	96
4.1 Zusammenfassung autoimmunvermittelter neurologischer Syndrome .....	96
4.2 Interpretation der eigenen Ergebnisse .....	97
4.3 Limitationen .....	104
4.4 Bisher veröffentlichte Studien .....	107
4.5 Ausblick.....	110
5. Literaturverzeichnis .....	112
6. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung .....	130
6.1 Eidesstattliche Versicherung .....	130
6.2 Anteilserklärung .....	131
7. Lebenslauf .....	132
8. Publikationsliste.....	132
9. Danksagung .....	135
10. Bescheinigung der akkreditierten Statistikerin .....	136

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zulassungsindikationen der verschiedenen ICI.....	21
Tabelle 2:	Gelistete irAE-N aus den erwähnten Zulassungsstudien.....	24
Tabelle 3:	In der Massenzytometrie verwendete Antikörperkonjugate .....	39
Tabelle 4:	Einzelne irAE-N mit ihren Leitsymptomen aus der Literaturrecherche ..	47
Tabelle 5:	Charakteristika der TITAN <sup>2</sup> -Teilnehmenden bei ICI-Einleitung .....	56
Tabelle 6:	TITAN <sup>2</sup> -Patienten/ Patientinnen mit irAE.....	63
Tabelle 7:	Charakteristika der Teilnehmenden, die nach „V0“ rekrutiert wurden ..	64
Tabelle 8:	Charakteristika der Teilnehmenden aus der retrospektiven Arbeit.....	87
Tabelle 9:	Zusammenfassung der Häufigkeiten von irAE-N .....	93
Tabelle 10:	Zusammenfassung der klinischen Präsentation von irAE-N.....	94
Tabelle 11:	Zusammenfassung der CyTOF-Ergebnisse .....	95
Tabelle 12:	Diskutierte Biomarker für irAEs unter ICI-Therapie .....	110

#### IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 als Immuncheckpoints.....	15
Abbildung 2:	Wirkmechanismus der Antikörper gegen CTLA-4, PD-1 und PD-L1..	16
Abbildung 3:	Rekrutierungs- und Selektionsprozess der TITAN <sup>2</sup> -Studienteilnehmer und –teilnehmerinnen .....	51
Abbildung 4:	Karnofsky-Indices der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten .....	72
Abbildung 5:	Funktionelle Subskala des EORTC.QLQ-C30 zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten.....	73
Abbildung 6:	Symptom-Subskala des EORTC.QLQ-C30 zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten.....	74
Abbildung 7:	Subskala für den globalen Gesundheitszustand/ die Lebensqualität der Teilnehmenden zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten .....	74
Abbildung 8:	Fatigue-Symptomatik der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten .....	75
Abbildung 9:	Selbsteinschätzung zur Gedächtnisleistung der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten.....	76
Abbildung 10:	Depressivität der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten .....	76
Abbildung 11:	Polyneuropathie-Symptome der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvsiten .....	77
Abbildung 12:	Identifizierung der mit irAE-N assoziierten T-Zell-Populationen .....	83
Abbildung 13:	Identifizierung der mit irAE-N assoziierten CD3 <sup>+</sup> Populationen.....	85

## V Abkürzungsverzeichnis

### A

ALT .....	Alanin-Aminotransferase
amu.....	Atomic mass unit (Atomare Masseneinheit)
AP .....	Alkalische Phosphatase
APC .....	Antigen presenting cells (Antigenpräsentierenden Zellen)
Aqua Dest.....	Aqua destillata (destilliertes Laborwasser)
ASR .....	Achillessehnenreflex
AST .....	Aspartat-Aminotransferase

### B

BIH.....	Berlin Institute of Health (Berliner Insitut für Gesundheitsforschung)
BSA .....	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BSR .....	Bizepssehnenreflex

### C

CD .....	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppe)
cHL .....	Classical Hodgkin-Lymphoma (Klassisches Hodgkin-Lymphom)
CK.....	Creatinkinase
cMRT .....	Craniale Magnetresonanztomographie
CPT .....	Cell Preparation Tube (Zellpräparationsröhrchen)
CRU.....	Clinical Research Unit (Abteilung für klinische Forschung)
CSM.....	Cell staining medium (Zellfärbemittel)
CTL.....	Control (Kontrollpatienten/ -patientinnen)
CTLA-4 ..	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4)
CyTOF .....	Cytometry by time of flight (Zytometrie nach Flugzeit/ Massenzytometrie)

### D

DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DPBS.....	
	Dulbecco phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco)

### E

ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group (Östliche kooperative Onkologie-Gruppe)
------	--

EMA..... European Medicines Agency (Europäische Arzneimittel-Agentur)

EORTC.....  
European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Europäische  
Organisation zur Erforschung und Behandlung von Krebserkrankungen)

EU..... Europäische Union

**F**

FBS.....Fetal bovine serum (Fätales Kälberserum)

FDA ..... adg Administration (US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel)

FDR .....False discovery rate (Falscherkennungsrate)

**G**

GGT.....Gamma-Glutamyl-Transferase

gp 100 .....Glykoprotein 100

**H**

HTCC..... Hauttumorzentrum Charité

**I**

ICI .....Immuncheckpoint-Inhibitor(en)

IFNa.....Interferon-alfa

irAE-N.....  
Immune-related neurologic adverse events (Immunvermittelte neurologische  
Nebenwirkungen)

irMyositis ..... Immune-related myositis (Immunvermittelte Myositis)

**K**

KG ..... Körpergewicht

**L**

LDH ..... Laktatdehydrogenase

**M**

MCC .....Merkel cell carcinoma (Merkelzellkarzinom)

MHC ..... Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)

**N**

NCV..... Nerve Conduction Velocity (Nervenleitgeschwindigkeit)

NK.....Natürliche Killer  
NSCLC ..... Non-small-cell lung carcinoma (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)

## **P**

p.o..... Per os (Orale Gabe)  
PBMCs .....  
..Peripheral blood mononuclear cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)  
PBS .....Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)  
PCR..... Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)  
PD-1 ..... Programmed cell death protein 1 (Programmiertes Zelltod-Protein 1)  
PD-L1 ...Programmed cell death 1 ligand 1 (Programmiertes Zelltod-Protein 1 Ligand)  
PFA.....Paraformaldehyd  
PNP ..... Polyneuropathie  
PSR ..... Patellarsehnenreflex

## **R**

RCC.....Renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)  
REDCap.....  
Research Electronic Data Capture (Elektronische Datenerfassung in der Forschung)  
RPR..... Radiusperiostreflex  
RS..... RawScore (Rohwert)  
RT ..... Raumtemperatur

## **S**

SAM..... Signifikanzanalyse-von-Microarrays  
SCCHN.....  
Squamous cell carcinoma of the head and the neck (Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und des Halses)  
SOM .....Self-organizing map (Selbstorganisierende Karte)

## **T**

TC..... T-cell (T-Zelle)  
Th ..... T-Helferzellen  
Ti ..... Teilnehmenden-Identifikationsnummer  
TITAN<sup>2</sup>..... Tumormimmuntherapie-assozierte neurologische Nebenwirkungen  
TNBC..... Triple-negative breast cancer (Dreifach-negatives Mammakarzinom)

TNF ..... Tumornekrosefaktor

Treg ..... Regulatorische T-Zellen

t-SNE .....  
T-distributed stochastic neighbor embedding (T-verteilte stochastische  
Nachbareinbettung)

TSR ..... Trizepssehnenreflex

TZR..... T-Zell-Rezeptor

## **U**

U/l ..... Units per liter (Einheiten pro Liter)

UAW ..... Unerwünschte Arzneimittelwirkung(en)

## **V**

V.a. .... Verdacht auf

## **Z**

ZNS .....Zentrales Nervensystem

## VI Kurzzusammenfassung

Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) sind monoklonale Antikörper, welche in der Behandlung zahlreicher maligner Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Nachdem in mehreren Studien gezeigt wurde, dass diese bisher niedrige Überlebensraten von Patienten/ Patientinnen mit fortgeschrittenem Melanom deutlich verbessern, erfolgte im Jahr 2011 eine Erstzulassung in der EU durch die Europäische Arzneimittel-Agentur. (1) Seitdem wurde das Einsatzspektrum der ICI stetig erweitert, sodass sie heute bei einer Vielzahl von Malignomen erfolgreich etabliert werden konnten. Für die Entdeckung der am Wirkmechanismus beteiligten Moleküle und das Ermöglichen der Entwicklung therapeutischer monoklonaler Antikörper erhielten Prof. Tasuku Honjo und Prof. James Allison 2018 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin. (2) ICI stellen somit einen Durchbruch in der Onkologie dar; jedoch zeigten sich bei ihrer Anwendung auch teilweise erhebliche Nebenwirkungen in Form von Autoimmunreaktionen. Neurologische immunvermittelte Nebenwirkungen (engl. immune-related neurologic adverse events, irAE-N) treten in seltenen Fällen und mit einem breiten klinischen Spektrum auf. Ihre Diagnose kann sich durch eine untypische Präsentation erschweren und verzögern. Mitunter müssen laufende Therapien pausiert oder abgebrochen, und ein möglicher Tumorprogress riskiert werden. Bisläng liegen zur Inzidenz neurologischer immunvermittelter Nebenwirkungen keine Untersuchungen aus prospektiven klinischen Studien vor. Auch die Erforschung prädiktiver Biomarker steht noch am Anfang und soll zukünftig dazu beitragen, vulnerable Patientengruppen zu definieren.

## VII Abstract

Immune checkpoint inhibitors (ICI) are monoclonal antibodies used in the immunotherapeutic treatment of various malignant diseases. After several studies showed significant improvement of the previously low survival rates of patients with advanced melanoma, they were granted initial approval in the EU by the European Medicines Agency in 2011. (1) Since then, their range of application has been continuously expanded, and as of today they have been successfully tested in a large number of malignancies. Prof. Tasuku Honjo and Prof. James Allison were awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2018 for their discovery of the molecules involved in the mechanism of action and for enabling the development of therapeutic monoclonal antibodies. (2) ICI thus represent a breakthrough in oncology; however, their use can cause considerable immune-related adverse events. Neurological immune-related adverse events (irAE-N) occur in rare cases and in a broad spectrum. Their diagnosis can be complicated and delayed by an atypical presentation. Sometimes ongoing therapies must be paused or discontinued, risking a possible tumor progression. To date, no prospective clinical trials on the incidence of neurologic immune related adverse events have been published. Furthermore, research into predictive biomarkers is just at its very beginning and will help to define vulnerable patients in the future.

## 1. Einleitung

Das maligne Melanom war die erste Tumorentität, die mittels ICI behandelt wurde. Mindestens bis zum aktuellen Zeitpunkt im Jahr 2022, wird ein Großteil dieser Therapeutika bei Patienten/ Patientinnen mit fortgeschrittenem malignem Melanom eingesetzt. Im Jahr 2016 wurden in Deutschland 11.150 Melanom-Neuerkrankungen bei Frauen und 12.090 Neuerkrankungen bei Männern registriert. (3) Im Jahr 2011 entwickelten etwa 20 % der Patienten/ Patientinnen mit einem diagnostizierten Melanom Metastasen und hatten ab diesem Zeitpunkt eine mittlere Überlebenszeit von sieben Monaten. (4) In Deutschland lag in den Jahren 2016-2018 die relative 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium IV für Frauen bei 32 % und für Männer bei 19 %. (3)

Vor der Zulassung von ICI für die Therapie des nicht-operablen Melanoms wurde dieses mit Chemotherapien und/ oder Immuntherapien mit Interferon-alfa (IFN $\alpha$ ) oder Interleukin 2 (IL-2) behandelt. In der EU wurde das metastasierte Melanom in der Vergangenheit standardmäßig mit Dacarbazin therapiert. (5) Dabei konnten niedrige Ansprechraten von etwa 20 % und mittlere Überlebenszeiten von 4,5 bis 6 Monaten erreicht werden. (4, 6-9)

Die 2018 modifizierte Empfehlung der S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms lautet: „Bei Melanompatienten mit nicht resezierbaren Metastasen soll die Option einer Immuntherapie mit ICI geprüft werden. Dabei sind PD-1-Antikörper oder deren Kombination mit Ipilimumab einer Monotherapie mit Ipilimumab hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens überlegen. Zudem sind PD-1-Antikörper in der Monotherapie Ipilimumab im Gesamtüberleben überlegen.“ (Empfehlungsgrad A, Evidenzlevel 1b) (10)

### 1.1 Tumorimmuntherapie mit ICI

Bereits 1891 wurde beobachtet, wie Tumorerkrankte sich nach einer Infektion mit *Streptococcus pyogenes* von ihren Sarkomen erholten. Daraufhin experimentierten Forschende mit Injektionen dieser Bakterien in Menschen mit einer Krebserkrankung und konnten damit einzelne Erfolge verzeichnen. (11) Der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Entwicklung von Tumorerkrankungen wurde auch bei der Nutzung onkolytischer Viren in den frühen 1900-ern, der Entwicklung onkolytischer Impfungen in den 1920-ern und der Entdeckung des Tumornekrosefaktors (TNF) in den 1970-ern erkannt. Im Jahr 1996 diskutierten Leach et al. die Blockade von

Immuncheckpoints als neuen Ansatz einer onkologischen Behandlung. Im selben Jahr konnte das Forschungsteam um Dr. Allison diese Theorie an einem Mausmodell erfolgreich belegen. (12) Daraufhin begann die Entwicklung eines gegen sog. Immuncheckpoints gerichteten Antikörpers und die Durchführung erster klinischer Studien. Nachdem zwei Phase-III-Studien den Überlebensvorteil in der Therapie des malignen Melanoms gegenüber Standardtherapien aufzeigten, konnte im Jahr 2011 mit Ipilimumab der erste ICI in den USA und in Europa zugelassen werden. (13)

### Was sind Immuncheckpoints?

Das Immunsystem stellt ein komplexes Zusammenspiel aus effektiver Immunantwort auf der einen und Schutz vor Autoimmunreaktionen auf der anderen Seite dar. Verschiedene regulatorische Mechanismen dienen seiner Funktion und Aufrechterhaltung. Während das angeborene Immunsystem eine unspezifische Reaktion auf körperfremde Stoffe auslöst, ist das erworbene Immunsystem in der Lage, mithilfe von antigenpräsentierenden Zellen (engl. antigen presenting cells, APC), antikörperproduzierenden B-Zellen und Helfer- bzw. zytotoxischen T-Zellen, Antigenen spezifisch entgegenzuwirken. Aufgrund dieser Fähigkeit spielt es eine fundamentale Rolle in der Tumorimmuntherapie. (14, 15)

Naive T-Zellen werden über einen mehrstufigen Prozess aktiviert. (16) Nach einer initialen Antigenpräsentation über den Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, MHC) einer dendritischen Zelle an den T-Zell-Rezeptor ist ein zweites, kostimulatorisches Signal für die Auslösung einer Immunantwort notwendig. Dieses wird über Rezeptoren der sog. Unterscheidungsgruppe 28 (engl. cluster of differentiation, CD) (B7) Klasse vermittelt. (17, 18)

Dem gegenüber stehen koinhibitorische Moleküle, wie das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4), das programmierte Zelltod-Protein 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) und dessen Ligand (PD-L1), welche eine überschießende Immunreaktion verhindern und daher als Immuncheckpoints bezeichnet werden (s. Abbildung 1: CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 als Immuncheckpoints). (17, 18)

Der CTLA-4-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der frühen Immunreaktion und befindet sich ausschließlich auf der Oberfläche von T-Zellen. (18) Er wird von aktivierten zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen exprimiert und moduliert CD4-positive Helfer- (Th) und regulatorische T-Zellen (Treg). (18) Nach einer

Antigenbindung kann er den kostimulatorischen CD28-T-Zell-Rezeptor aufgrund seiner stärkeren Affinität zu den gemeinsamen Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) antagonisieren. Zudem hemmt er als koinhibitorisches Signal die T-Zellaktivierung auch auf direktem Wege. (16, 19) PD-1 ist ein Rezeptor, der auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und natürlichen Killer (NK)-Zellen exprimiert wird. Seine Liganden, PD-L1 und PD-L2, gehören ebenfalls zur B7-Familie. (17, 20) Eine Interaktion zwischen PD-1 mit seinen Liganden gewährleistet im gesunden Körper die Eigentoleranz. Nach Antigenpräsentation kommt es durch Zytokinproduktion zu einem Entzündungsprozess, welcher wiederum zu einer PD-L1-Expression im Gewebe führt. (21, 22).

Im Jahr 1957 postulierten Thomas et al. erstmalig die Hypothese des Immunoeditings, welches in drei Phasen unterteilt wird. Demnach würde das Immunsystem potenziell maligne Zellen, die durch den DNA-Reparaturmechanismus nicht erfasst wurden, erkennen und eliminieren. Neoplastische Zellen, die durch das Immunsystem erkannt, aber nicht zerstört würden, könnten in einer Phase des Gleichgewichts auch ohne Progress über einen langen Zeitraum mit dem gesunden Gewebe koexistieren. Erst in einer dritten Phase, der Tumorevasion, entwickelten Tumorzellen die Fähigkeit sich vor dem Immunsystem zu verbergen und zu wachsen. (23)

Die Kennzeichen von Krebs (engl. Hallmarks of Cancer) wurden im Jahr 2011 von den Autoren um die Merkmale „abnorme Stoffwechselwege“ und „Immunevasion und die zwei dazu befähigenden Eigenschaften: Genominstabilität und Inflammation“ erweitert. (24) Es wird angenommen, dass durch diese Genominstabilität hunderte bis tausende genetische Mutationen in kodierenden Regionen entstehen können. Verschiedene Tumoren scheinen einige dieser Mutationen gemeinsam zu haben. Sie bilden den Ausgangspunkt von sog. Neopeptiden, die über MHC-Moleküle von T-Zellen erkannt werden. (18, 25) Obwohl Tumoren entarteten körpereigenen Zellen entspringen, ist das spezifische Immunsystem also in der Lage, es von gesundem Gewebe zu unterscheiden. (18) Diese Fähigkeit scheint jedoch in einigen Fällen gestört zu werden.

Über die Bildung von Liganden (PD-L1 und PD-L2) können verschiedene Tumoren koinhibitorische Signale der Immuncheckpoints aktivieren und somit die physiologische Reaktion der T-Zellen verhindern. Während die T-Zellen der Tumorpatienten/ -patientinnen häufig PD-1 hochregulieren, exprimieren die Tumorzellen verstärkt dessen Liganden, PD-L1, auf ihrer Oberfläche. (20) (Abbildung

1: CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 als Immuncheckpoints). Darüber hinaus sind sie auch in der Lage, über die Bindung an CTLA-4 die Immunantwort zu schwächen. (26)

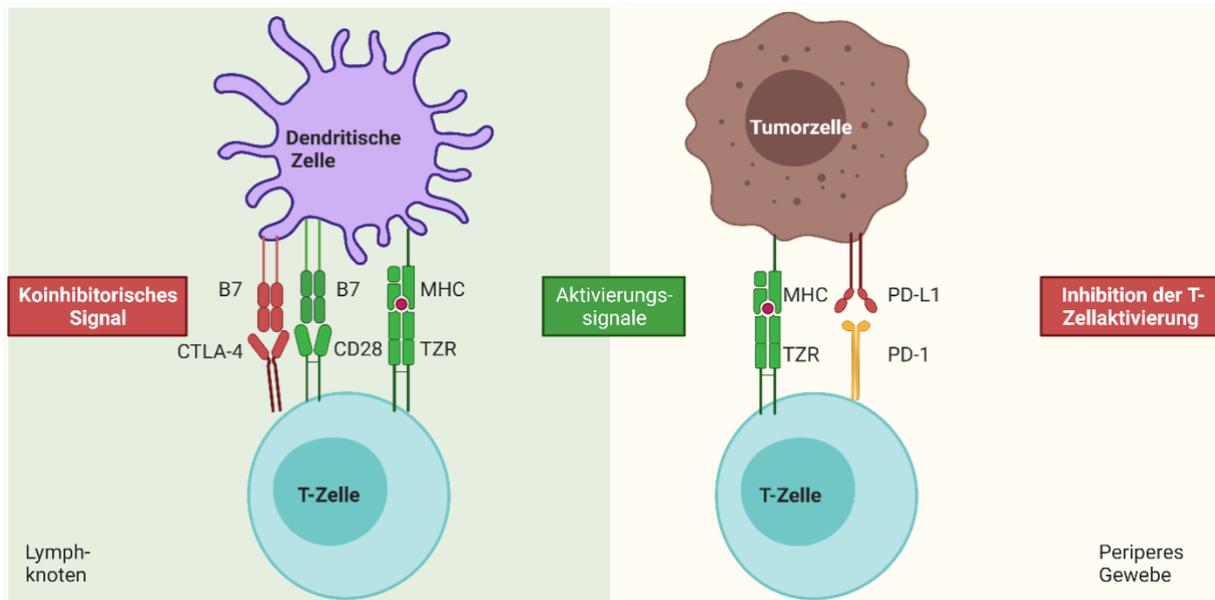


Abbildung 1: CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 als Immuncheckpoints

Links: Vereinfachte Darstellung der T-Zellaktivierung. Neben der Antigenpräsentation durch MHC an den TZR wird ein kostimulatorisches Aktivierungssignal über B7 und CD28 für die T-Zellaktivierung benötigt. Über Immuncheckpoints wird hingegen ein koinhibitorisches Signal und somit die Eigentoleranz des Immunsystems gewährleistet. Rechts: Vereinfachte Darstellung der Immunevasion einer Tumorzelle durch Inhibition der T-Zellaktivierung. Über die Expression eines Liganden für PD-1 können bestimmte Tumorzellen die T-Zellaktivierung inhibieren.

### 1.1.1 Wirkmechanismus

#### Wie funktionieren ICI?

Immuncheckpoint-Inhibitoren verändern gezielt die von Tumorzellen manipulierte Interaktion mit dem Immunsystem, indem sie über eine Blockade koinhibitorischer Rezeptoren die T-Zell-Aktivierung verstärken. (17, 27, 28) CTLA-4-Inhibitoren hemmen das koinhibitorische Signal der dendritischen Zelle an die T-Zelle während der Voraktivierung (engl. priming), indem sie an CTLA-4 binden und somit die Interaktion mit B7 und die daraus resultierende Hemmung der T-Zell-Aktivierung verhindern. (17) Durch die Blockade von PD-1 an der Oberfläche von T-Zellen bzw. dessen Ligand, welcher in der Tumormikroumgebung im peripheren Gewebe exprimiert wird, können monoklonale Antikörper gegen PD-1 bzw. PD-L1 verhindern,

dass die T-Zellaktivierung durch Tumorzellen aufgehoben wird (s. Abbildung 2: Wirkmechanismus der Antikörper gegen CTLA-4, PD-1 und PD-L1). (17) Durch die Blockade der CTLA-4- und PD-1-Signalwege lösen ICI also eine Reaktivierung der Immunantwort gegen den Tumor aus. (29)

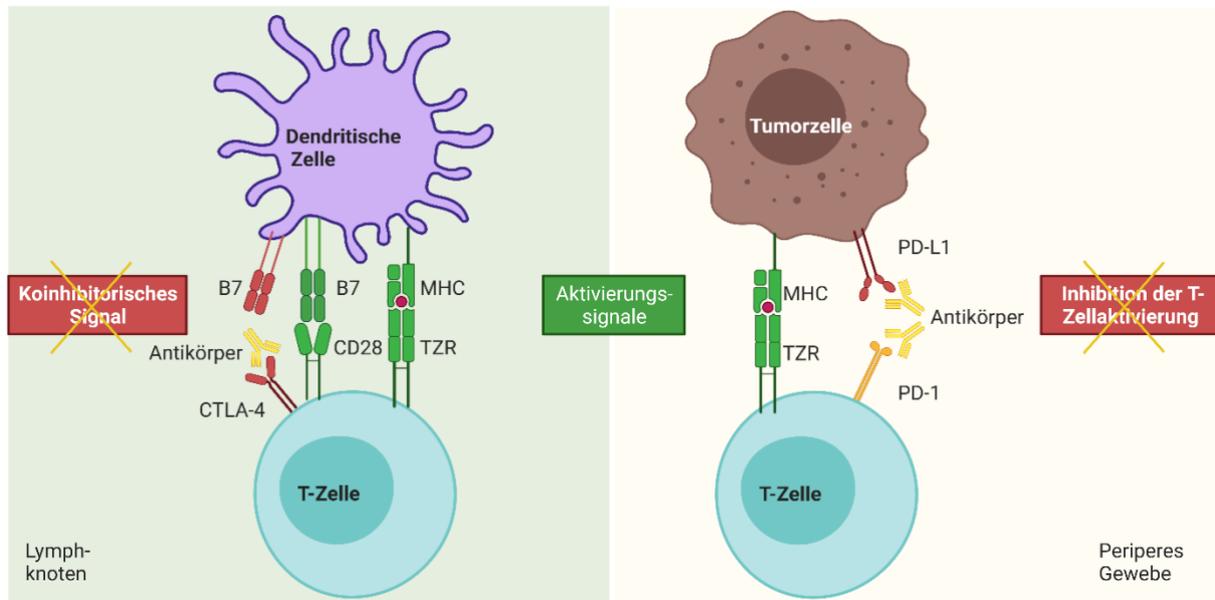


Abbildung 2: Wirkmechanismus der Antikörper gegen CTLA-4, PD-1 und PD-L1

Links: CTLA-4-Antikörper können über die Bindung an CTLA-4 das physiologische koinhibitorische Signal der T-Zellaktivierung inhibieren. Rechts: Antikörper gegen PD-1 oder dessen Liganden verhindern die Immunevasion der Tumorzelle, indem sie die hierfür benötigte Interaktion unterbinden.

### 1.1.2 Substanzen

ICI sind humanisierte monoklonale Antikörper, die mittels rekombinanter DNA-Technologie aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters („CHO-Zellen“) gewonnen und als intravenöse Infusion verabreicht werden. (30-35) Grundsätzlich bestehen Antikörper aus einer variablen und einer konstanten Region, wobei die variable Region für die Antigenbindung, wie beispielsweise die Bindung von PD-1 oder CTLA-4, zuständig ist. Die konstante Region kann je nach Antikörper-Subgruppe in unterschiedlicher Weise mit dem Immunsystems interagieren. (36)

Im Folgenden werden die zum Zeitpunkt der Abfassung relevantesten Substanzen charakterisiert.

### 1.1.2.1 CTLA-4-Inhibitoren

**Ipilimumab** (MDX-010, BMS-734016), ein monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 vom IgG1-κ Isotyp, war im Jahr 2011 der erste von der FDA und EMA zugelassene ICI. Die erste Behandlungsgruppe waren Patienten/ Patientinnen mit einem inoperablen Melanom des Stadiums III oder IV, die auf Erstlinientherapien nicht ansprachen, einen Tumorprogress durchliefen oder inakzeptable Nebenwirkungen erlitten hatten. (4, 37)

Die Zulassung des Medikaments durch die EMA beruhte auf einer Phase-III- (MDX010-20) und sieben unterstützenden Phase-I/II-Studien (CA184-022, CA184-004, MDX010-08, CA184-007, CA184-042, MDX010-15 and MDX010-28). (4) Die ausschlaggebende MDX010-20-Studie war eine randomisierte, doppel-verblindete, multizentrische Studie, die an 125 Standorten in Europa, Nordamerika, Südamerika und Afrika durchgeführt wurde. In diesem Rahmen erhielten die Patienten/ Patientinnen entweder Ipilimumab in Kombination mit einem Impfstoff gegen das Glykoprotein 100 (gp 100), Ipilimumab in Kombination mit einem Placebo oder ein Placebo in Kombination mit gp 100 mit dem Ziel das jeweilige Gesamtüberleben zu vergleichen. Es zeigte sich bei der Ipilimumab-Monotherapie ein medianes Gesamtüberleben von 10,1 Monaten (95 % Konfidenzintervall [KI]; 8,02-13,80) im Vergleich zu 6,4 Monate (95 % KI; 5,49-8,71) bei der gp100-Monotherapie. (38) Zusätzlich wurden während des Verfahrens Daten aus einer weiteren Phase-III-Studie (CA184-024) eingereicht, um die Daten zur Wirksamkeit der MDX010-20-Studie zu bestärken. (4) In dieser randomisierten, doppel-verblindeten Multizenterstudie wurde das Gesamtüberleben von Patienten/ Patientinnen unter einer Therapie mit Dacarbazin in Kombination mit Ipilimumab im Vergleich zu Dacarbazin in Kombination mit einem Placebo untersucht. Das Resultat war ein signifikant längeres Gesamtüberleben mit 11,2 Monaten bei Ipilimumab-Gabe im Vergleich zu 9,1 Monaten in der Placebogruppe ( $p < 0,001$ ). (39) In dieser Studie wurden Patienten/ Patientinnen mit einem okulären Melanom, Patienten/ Patientinnen mit Hirnmetastasen und Patienten/ Patientinnen mit einem primären Melanom des zentralen Nervensystems (ZNS) nicht eingeschlossen. Womöglich wäre angesichts der Funktionsweise des Pharmakons zunächst eine Bestrahlung des Kopfes und die daraus resultierende Störung der Blut-Hirn-Schranke für eine erfolgreiche Therapie mit Ipilimumab notwendig. (39)

Ipilimumab wird in der Europäischen Union (EU) standardmäßig in der Einheit von 5 mg/ ml in 50 mg/ 10 ml oder 200 mg/ 40 ml Infusionslösungen intravenös verabreicht. (4) Einer anfänglichen Induktionsphase von insgesamt vier Gaben in dreiwöchentlichen Abständen und einer Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht (KG) schließt sich eine Beobachtungsphase an, in der das Ansprechen kontrolliert und die Therapie vorerst nicht fortgeführt wird. Im Falle eines Rezidivs nach initialem Behandlungserfolg kann dieses Regime als sog. Re-Induktion erneut angewendet werden. (40)

**Tremelimumab** konnte in einer Phase-III-Studie keine Überlebensvorteile gegenüber der Standardtherapie eines malignen Melanoms bieten und hält daher bisher keinen Einzug in die klinische Praxis. (41)

### 1.1.2.2 PD-1-Inhibitoren

Im Jahr 1992 berichteten Ishida et al. erstmalig über eine immun-inhibitorische Wirkung von PD-1. (42) Doch die Entdeckung und in vitro Charakterisierung eines gegen diesen Rezeptor gerichteten Antikörpers erfolgte erst Jahrzehnte später. (43) 2014 wurde in Japan mit **Nivolumab** (MDX-1106, BMS-936558) weltweit erstmalig ein anti-PD-1-Antikörper zur Behandlung des nicht-resezierbaren Melanoms zugelassen. Ausschlaggebend für die Zulassung des Arzneimittels waren die zwei Phase-III-Studien CA209-066 (Checkmate 066) und CA209-037 (Checkmate 037), in denen sowohl eine Verbesserung der bisherigen Erst- als auch Letztlinientherapie des malignen Melanoms gezeigt werden konnte. (44, 45) Im Vergleich zu Ipilimumab zeigten mit diesem Antikörper therapierte Patienten/ Patientinnen außerdem ein besseres fernmetastasierungsfreies Überleben (93 Ereignisse bei 369 Patienten/ Patientinnen (25,2 %) und 115 Ereignisse bei 366 Patienten/ Patientinnen (31,4 %). (10)

Seit seiner Erstzulassung wurde die Indikation für eine Therapie mit Nivolumab auf weitere Tumorentitäten ausgeweitet (s. Tabelle 1).

Ein weiterer in der EU zugelassener ICI ist **Pembrolizumab** (MK-3475). Wie Nivolumab, ist er ein gegen den PD-1-Rezeptor gerichteter monoklonaler Antikörper vom IgG4-Typ. Abgesehen von den variablen Regionen, welche das Epitop des Antigens binden, ist seine Aminosäuresequenz zu Nivolumab im Wesentlichen identisch. Die Epitopregion von Pembrolizumab hat eine größere Überlappung mit der PD-L1-Bindungsstelle als die von Nivolumab. Aus den molekularen Ähnlichkeiten

dieser beiden Medikamente lässt sich schließen, dass Unterschiede der klinischen Daten wahrscheinlich auf andere, arzneimittelunabhängige Ursachen zurückzuführen sind. (36) Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene agonistische CD28-Antikörper große Unterschiede in ihren klinischen Charakteristika aufweisen, sodass nicht sicher von einer Austauschbarkeit dieser beiden Medikamente ausgegangen werden kann. (36, 46) Im September 2014 wurde dieser ICI im Zuge eines beschleunigten Entwicklungsverfahrens von der FDA für die Therapie des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen und im darauffolgenden Jahr auch in der EU autorisiert. (31, 47)

Für die S3-Leitlinie des Melanoms wurde die KEYNOTE-054-Studie für die adjuvante Therapie im Stadium III mittels anti-PD-1-Inhibitoren analysiert. (10) Diese Studie ergab, dass Pembrolizumab zu einem signifikant längeren rezidivfreien Überleben als ein Placebo führte. (48)

Insgesamt zeigte sich bei beiden anti-PD-1-Antikörpern ein signifikanter Vorteil für das rezidivfreie Überleben von Stadium III bzw. IV Melanompatienten/ -patientinnen im Vergleich zu der Ipilimumab- bzw. Placebogruppe. Diesen Patienten/ Patientinnen soll, der Leitlinie zufolge, eine adjuvante Therapie mit einem PD-1-Antikörper angeboten werden. (10, 48, 49) Abgesehen von der Therapie des malignen Melanoms, gibt es zahlreiche weitere Indikationen für den Einsatz dieser ICI (s. Tabelle 1).

Pembrolizumab wird als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie oder mit Axitinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, gegeben. (31) Nivolumab wird in einer Dosierung von 3 mg/kg KG in zweiwöchentlichen, Pembrolizumab in einer Dosierung von 2 mg/kg KG in dreiwöchentlichen Intervallen verabreicht. Die Therapie mit PD-1-Inhibitoren erfolgt, solange ein klinischer Nutzen besteht oder keine maßgeblichen Nebenwirkungen auftreten. (40)

### **1.1.2.3 Kombinationstherapie**

Die Tatsache, dass die unterschiedlichen Substanzklassen auf verschiedene Immuncheckpoints gerichtet sind, lässt eine komplementäre Wirkung durch Kombination der CTLA-4- und PD-1-Antikörper vermuten. Ein Regime aus Nivolumab und Ipilimumab wurde im Jahr 2015 als erste onkologische Immunkombination zugelassen. (50) Zwar konnten im Vergleich zur Monotherapie bessere Überlebensraten gezeigt werden, allerdings gingen diese in bis zu 91 % der Fälle mit klinisch relevanten immunvermittelten Nebenwirkungen einher. (6, 51, 52)

#### 1.1.2.4 PD-L1-Inhibitoren

Im Jahr 2016 erfolgte mit **Atezolizumab** im Rahmen eines beschleunigten Verfahrens die Zulassung des ersten Antikörpers gegen PD-L1 für den amerikanischen und ein Jahr später auch für den europäischen Markt. (53) Atezolizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1-κ. Über eine direkte Bindung an PD-L1 blockiert er sowohl PD-1- als auch B7-1-Rezeptoren. (33) Zwar konnte in einer Phase-III-Studie kein Überlebensvorteil im Vergleich zur Chemotherapie als Zweitlinientherapie in Patienten/ Patientinnen mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom festgestellt werden, jedoch litten diese Patienten/ Patientinnen seltener an unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW). (54) In einer weiteren Phase-III-Studie wurde das Medikament mit Docetaxel bei Patienten/ Patientinnen mit vorbehandeltem NSCLC (engl. non-small-cell lung carcinoma, Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) verglichen. Hier konnte ein Überlebensvorteil für Atezolizumab gezeigt werden. (55) Der humanisierte, monoklonale IgG1-λ-Antikörper **Avelumab** wurde ein Jahr später für Patienten/ Patientinnen mit fortgeschrittenem oder metastatiertem Urothelkarzinom oder mit Tumorprogress unter platinhaltiger Chemotherapie in einem beschleunigten Verfahren zugelassen. (56) Auch **Durvalumab** wird zu diesem Zweck und in der Therapie des lokal fortgeschrittenen, inoperablen nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt. (57) Avelumab stellte überdies das erste von der FDA zugelassene Medikament zur Behandlung des metastasierten Merkelzellkarzinoms bei Kindern ab 12 Jahren und Erwachsenen dar. (56, 58)

#### Aktuelle Zulassungsindikationen

ICI werden im Jahr 2020 erfolgreich in der Therapie des malignen Melanoms, des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (non small cell lung cancer, NSCLC), des Nierenzellkarzinoms (engl. renal cell carcinoma, RCC), des klassischen Hodgkin-Lymphoms (classical Hodgkin Lymphoma, cHL), des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und des Halses (squamous cell carcinoma of the head and the neck, SCCHN), des Urothelkarzinoms, des Merkelzellkarzinoms (Merkel cell carcinoma, MCC) und des dreifach-negativen Mammakarzinoms (triple-negative breast cancer, TNBC) in unterschiedlichem Maße eingesetzt. Die genauen Zulassungsindikationen zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit lassen sich der Tabelle 1 entnehmen. (30-35)

Tabelle 1: Zulassungsindikationen der verschiedenen ICI

<b>Status</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Substanz</b>	<b>Anwendungsgebiete</b>
Zulassung in der EU und in den USA	anti-CTLA-4	Ipilimumab (Yervoy)	Melanom, Nierenzellkarzinom (RCC)
	anti-PD-1	Nivolumab (Opdivo)	Melanom, Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), RCC, Klassisches Hodgkin-Lymphom (cHL), Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (SCCHN), Urothelkarzinom (UC)
	anti-PD-1 und anti-CTLA-4	Nivolumab in Kombination mit Ipilimumab	Melanom, RCC
	anti-PD-1	Pembrolizumab (Keytruda)	Melanom, NSCLC, cHL, UC, SCCHN, RCC
	anti-PD-L1	Atezolizumab (Tecentriq)	UC, NSCLC, triple-negatives Mammakarzinom (TNBC)
	anti-PD-L1	Avelumab (Bavencio)	Merkelzellkarzinom (MCC), RCC
	anti-PD-L1	Durvalumab (Imfinzi)	NSCLC
Zulassung in den USA	anti-PD-1	cemiplimab-rwlc (Libtayo)	Plattenepithelkarzinom

Quellen: Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicine Agency, EMA); U.S. Food and Drug Administration (FDA)

### **1.1.3 Immunvermittelte Nebenwirkungen**

Den verzeichneten Therapieerfolgen stehen immunvermittelte Nebenwirkungen (engl. immune related adverse events, irAEs) bei einem Einsatz von ICI gegenüber, welche nicht zu vernachlässigen sind. Es sind unter anderem Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, der Leber und Galle, der Haut und des Unterhautfettgewebes, des endokrinen Systems, und des Nervensystems beschrieben worden. Diese treten meist während der Induktionsphase einer Therapie mit ICI auf. In einigen Fällen konnten sie jedoch sogar Monate nach der letzten Gabe festgestellt werden. (30-33) Bereits in der MDX010-20 Zulassungsstudie von Ipilimumab wurde von Grad 3 - 4 immunvermittelten Nebenwirkungen berichtet, welche in 10 - 15 % der Fälle auftraten und bei sieben Patienten/ Patientinnen (1 %) letal endeten. (38) In der CA184-024-Zulassungsstudie traten bei 56,3 % der Patienten/ Patientinnen in der Ipilimumab-plus-Dacarbazine-Gruppe eine Toxizität Grad 3 - 4 auf, gegenüber 27,5 % in der Kontrollgruppe (Dacarbazin und Placebo). (39) In der Zulassungsstudie Checkmate-238 für den PD-1-Inhibitor Nivolumab wurde bei 14,4 % der Patienten/ Patientinnen über Grad 3 - 4 Nebenwirkungen berichtet und in 9,7 % aller Fälle musste die Therapie aufgrund dieser vorzeitig beendet werden. Auch in der KEYNOTE-054-Studie wurden in 14,7 % der Fälle Grad 3 – 5 Nebenwirkungen, darunter ein Todesfall, beobachtet. (10)

### **1.1.4 Immunvermittelte neurologische Nebenwirkungen**

Insgesamt wurde in den Zulassungsstudien zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit von 364 schwerwiegenden\* und von 2600 weiteren\*\* neurologischen Nebenwirkungen bei insgesamt 8373 Studienteilnehmenden berichtet. Diese traten in 499 Fällen unter einer Therapie mit Ipilimumab, in 802 Fällen unter Nivolumab, in 726 Fällen unter Pembrolizumab und in 765 Fällen unter Atezolizumab auf. Ein Großteil dieser Nebenwirkungen stellte eher unspezifische Symptome, wie etwa Kopfschmerzen (1212) und Schwindel (641) dar, allerdings fanden sich auch immer wieder Berichte über Neuropathien (611). Die Anzahl der berichteten irAEs aus den einzelnen Zulassungsstudien lässt sich der folgenden Tabelle 2 entnehmen.

\* Definition auf ClinicalTrials.gov: „Ein unerwünschtes Ereignis, das zum Tod führt, lebensbedrohlich ist, einen stationären Krankenhausaufenthalt erfordert oder einen laufenden Krankenhausaufenthalt

verlängert, zu einer andauernden oder erheblichen Arbeitsunfähigkeit führt oder die normalen Lebensfunktionen erheblich beeinträchtigt oder eine kongenitale Anomalie oder einen Geburtsfehler verursacht. Medizinische Ereignisse, die nicht zum Tod führen, nicht lebensbedrohlich sind oder keinen Krankenhausaufenthalt erfordern, können als schwerwiegende unerwünschte Ereignisse betrachtet werden, wenn sie Teilnehmende in Gefahr bringen oder einen medizinischen oder chirurgischen Eingriff erfordern, um eines der oben genannten Ergebnisse zu verhindern.“

\*\*Definition auf ClinicalTrials.gov: „Ein unerwünschtes Ereignis, das kein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis ist, d. h., das nicht zum Tod führt, nicht lebensbedrohlich ist, keinen stationären Krankenhausaufenthalt erfordert oder einen laufenden Krankenhausaufenthalt verlängert, nicht zu einer andauernden oder erheblichen Arbeitsunfähigkeit führt oder die normalen Lebensfunktionen erheblich beeinträchtigt und keine angeborene Anomalie oder einen Geburtsfehler verursacht; es bringt Teilnehmende auch nicht in Gefahr und erfordert keinen medizinischen oder chirurgischen Eingriff, um eines der oben genannten Ergebnisse zu verhindern.“

Tabelle 2: Gelistete irAE-N aus den erwähnten Zulassungsstudien

Studie	Anzahl Schwindel	Anzahl Kopfschmerz	Anzahl Neuropathien	Anzahl schwerwiegender UAWs	Anzahl weiterer UAWs	ICI	Anzahl Teilnehmende
<b>NCT00094653</b>	32	85	0	28	115	Ipilimumab	511
<b>NCT00623766</b>	13	28	1	32	71	Ipilimumab	72
<b>NCT00324155</b>	18	43	1	18	54	Ipilimumab	247
<b>NCT01866319</b>	10	27	0	6	36	Ipilimumab	256
<b>NCT01844505</b>	28	69	1	8	144	Nivolumab	313
	38	82	1	17	155	Nivolumab + Ipilimumab	313
	28	75	0	6	133	Ipilimumab	311
<b>NCT01721746</b>	26	41	12	24	104	Nivolumab	268
<b>NCT01721772</b>	10	31	0	9	40	Nivolumab	206
<b>NCT02105636</b>	0	21	4	7	25	Nivolumab	236
<b>NCT01673867</b>	25	32	9	11	81	Nivolumab	287
<b>NCT01668784</b>	35	57	0	21	106	Nivolumab	406
<b>NCT01642004</b>	11	18	4	5	37	Nivolumab	131
<b>NCT02387996</b>	0	17	0	13	17	Nivolumab	270
<b>NCT02181738</b>	26	53	33	18	132	Nivolumab	294
<b>NCT02362594</b>	26	96	1	5	121	Pembrolizumab	509
<b>NCT02256436</b>	19	13	59	3	38	Pembrolizumab	266
	49	78	0	21	127	Pembrolizumab	555
<b>NCT02142738</b>	16	9	2	3	30	Pembrolizumab	154
<b>NCT01848834</b>	24	29	0	16	53	Pembrolizumab	257
<b>NCT02460198</b>	7	17	6	3	29	Pembrolizumab	124
<b>NCT01876511</b>	0	0	7	1	6	Pembrolizumab	113

<b>NCT02335424</b>	35	20	0	9	77	Pembrolizumab	370
<b>NCT01905657</b>	48	64	25	20	164	Pembrolizumab	682
<b>NCT02366143</b>	82	166	445	47	613	Atezolizumab	793
<b>NCT02951767</b>	10	10	0	2	20	Atezolizumab	119
<b>=</b>							
<b>NCT02108652</b>							
	25	31	0	11	72	Atezolizumab	310
<b>SUMME</b>	641	1212	611	364	2600		8373

Quelle: ClinicalTrials.gov

Ergebnisse folgender Studien wurden nicht bei ClinicalTrials.gov veröffentlicht: NCT00289640, NCT00261365, NCT00050102, NCT00135408, NCT00729950, NCT00928031, NCT02453594, NCT02335411, NCT02684006, NCT04441138

### 1.1.5 Biomarker

Sowohl klinische, laborchemische als auch histologische Parameter werden als Biomarker für immunvermittelte Nebenwirkungen unter einer Therapie mit ICI diskutiert. Größtenteils beziehen sich diese auf das Auftreten gastrointestinaler Symptome. Potenzielle Biomarker könnten in den Expressionsraten von Interleukinen, Lymphozyten, Granulozyten und deren Aktivierungsmarker im peripheren Blut oder in Gewebeproben zu finden sein. Bisher sind entsprechende Untersuchungen auf Melanompatienten/ -patientinnen, die mit anti-CTLA-4-Inhibitoren behandelt wurden, beschränkt.

### 1.1.6 Zielsetzung und Fragestellung

- Ermittlung der Häufigkeiten neurologischer Nebenwirkungen unter einer Therapie mit ICI
- Beschreibung auftretender neurologischer Nebenwirkungen
- Immunprofilierung und Korrelierung mit dem Auftreten neurologischer Nebenwirkungen

Aus den zuvor beschriebenen Forschungslücken ergeben sich folgende Fragen, deren Beantwortung den Kern dieser Arbeit darstellen sollen.

**Primär:** Wie häufig treten immunvermittelte neurologische Nebenwirkungen (irAE-N) in einer Kohorte von Patienten/ Patientinnen, die sich an der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter einer Therapie mit ICI befinden, innerhalb von 12 Monaten auf?

**Sekundär:** Verschlechtert eine ICI-Therapie den Allgemeinzustand, die Lebensqualität, die Depressivität, die Symptomatik sowie die selbsteingeschätzte Gedächtnisleistung der behandelten Patienten/ Patientinnen?

**Tertiär:** Zeigen Patienten/ Patientinnen, die durch eine ICI-Therapie irAE-N entwickeln, spezifische Immunzellprofile?

## **2. Material und Methodik**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 REDCap Datenbank**

REDCap (Research Electronic Data Capture) ist eine Browser-basierte, metadatengesteuerte Software zur Erstellung von Fragebögen und Erfassung von Studiendaten. (59)

Sie wurde 2004 an der Vanderbilt University entwickelt und seit 2006 über ein Konsortium für Partner bereitgestellt. (60)

Auch die CRU (Clinical Research Unit) der Charité betreibt hierfür eine Studiendatenbank. „Das im Rahmen einer datenschutzrechtlichen Prüfung freigegebene Betriebskonzept und das dem Betrieb zugrundeliegende Sicherheitskonzept erlauben einen mandantengetrennten Betrieb und können somit als Teil eines eigenen Verfahrens genutzt werden.“ (61)

#### **2.1.2 Chemikalien**

- PBS-Puffer 1x (100 ml 10X Gibco™ DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>, ohne Mg<sup>2+</sup> in 900 ml Aqua destillata angerührt)
- Trypan-Blau Sigma-Aldrich (0,04 % in PBS)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Hersteller PanReac AppliChem
- Freezing Medium FBS + 10 % DMSO (0,5 ml DMSO in 4,5 ml FBS)

#### **2.1.3 Software, Geräte und Verbrauchsmaterialien**

##### Fragebögen und klinische Untersuchung

- iPad zur Nutzung von REDCap
- Notebook für die Messung der Nervenleitgeschwindigkeiten
- Neurografie Evidence 3102evo, Hersteller Neurosoft
- Softwarepaket, Hersteller Neurosoft

##### Einfrieren der Serumproben und PBMCs

- Serum-Blutentnahmeröhrchen, Hersteller BD Medical
- CPT-Blutentnahmeröhrchen, Hersteller BD Medical
- 1,6 ml CryoPure Farbmix, Hersteller Sarstedt

- 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes, Hersteller Eppendorf
- 15 ml Falcon-Tube, Hersteller Falcon
- 50 ml Falcon-Tube, Hersteller Falcon
- Bench BioWizard Golden Line
- Tischzentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 8R
- Mikroskop Leica DC 200
- Fuchs-Rosenthal-Zählkammer
- Taschenrechner
- Corning CoolCell Freezing Container, Artikelnummer 432000
- Stickstofftank Cryospeed Med, Hersteller Linde
- Labfolder

### CyTOF

- Medium
- Benzonase, Sigma-Aldrich, Artikelnummer E1014
- Zellfärbemittel, angesetzt aus 1 µl Benzonase pro 100 ml
- 15 ml Falcon-Tube, Hersteller Falcon, Artikelnummer 352095
- 100 ml Falcon-Tube, Hersteller Falcon, Artikelnummer 357600
- Mehrkanalpipette
- MaxQuant Proteomi-Softwarepaket
- 96 Well konisch V-Bodenplatte, Sarstedt, Artikelnummer 82.1583
- Deepwellplatten, Thermofisher, Artikelnummer 95040462
- Barcode-Master-Mix
- Surface Master Mix (Oberflächenmarker)
- Zellzählerfassungstabelle
- PBS-CyTOF (BSA-frei)
- mDOTA-103-RH
- Facstube, BioScience, Artikelnummer 05-03040-01
- Foxp3-Kit, Miltenyi, Artikelnummer 130-093-142
- Perm-Puffer, Thermofisher, Artikelnummer 15869178
- Aqua Dest. (destilliertes Laborwasser)
- Paraformaldehyd (PFA)
- Iridium-Intercalator, Fluidigm, Artikelnummer 201192A
- EQ 4 Element Calibration Beads, Fluidigm, Artikelnummer 201078

## **2.2 Methodik**

Diese Arbeit umfasst drei Ebenen. Zur theoretischen Einarbeitung in die Thematik wurde eine Literaturrecherche zu bereits publizierten Fallberichten neurologischer Nebenwirkungen nach einer Therapie mit ICI durchgeführt und hierzu eine Übersichtsarbeit erstellt. Anschließend wurde die Kohortenstudie TITAN<sup>2</sup> (Tumorimmuntherapie-assoziierte neurologische Nebenwirkungen) initiiert, um der Fragestellung auch prospektiv nachzugehen. Zusätzlich wurden anhand von Apothekenbestellungen Patienten/ Patientinnen identifiziert, die ICI am Hauttumorzentrum der Charité (HTCC) erhielten und in ihren Akten retrospektiv nach neurologischen Beschwerden im zeitlichen Zusammenhang mit dieser Therapie gesucht.

Die ethischen Standards der institutionellen und nationalen Forschungskommission sowie der Erklärung von Helsinki von 1964 inklusive ihrer späteren Änderungen wurden eingehalten. Eine entsprechende Genehmigung wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin erteilt. Es erfolgte eine Aufklärung und Einholung der Einwilligung aller Studienteilnehmenden zur Studienteilnahme und zur Veröffentlichung der Ergebnisse.

### **2.2.1 Literaturrecherche**

Im Zeitraum vom Oktober bis Dezember 2017 wurde eine systematische Literaturrecherche in den computerisierten Datenbanken medizinischer Fachartikel MEDLINE (PubMed) und Web of Science zum Thema „Neurologische Nebenwirkungen einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren“ durchgeführt. Insgesamt wurden hierzu 42 Artikel eingeschlossen. Die Arbeit wurde in der Fachzeitschrift „Der Nervenarzt“ (62) publiziert. Die einzelnen irAE-N wurden aufgelistet, nach peripher- und zentralnervös bzw. muskulär sortiert und anschließend aufsummiert. Es wurde zudem nach begleitenden immunvermittelten Beschwerden gesucht und auch aus diesen Fällen eine Summe gebildet. Die Fallberichte der irAE-N wurden weiterhin unter dem Aspekt der im Zusammenhang stehenden Substanzklassen sortiert und dementsprechend summiert.

## **2.2.2 Kohortenstudie TITAN<sup>2</sup>**

38 Patienten/ Patientinnen, die eine Therapie mit den ICI erhielten, wurden untersucht. Die Ausgangsuntersuchung = Visite 0 (V0) erfolgte am Tag der Einleitung einer Therapie mit einem ICI. Die Blutentnahme erfolgt vor Applikation des Medikaments und nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten/ Patientinnen.

### **2.2.2.1. Ein- und Ausschlusskriterien**

#### **Einschlusskriterien**

- laufende oder geplante Behandlung mit einem ICI
- Alter  $\geq$  18 Jahre
- schriftliche Einwilligung durch Patienten/ Patientinnen
- Patienten/ Patientinnen einwilligungsfähig und nicht in behördlicher oder gerichtlicher Verwahrung

#### **Ausschlusskriterien**

- postoperatives Delir
- bekannte mittlere oder schwere Depression
- (stattgehabter) Alkoholabusus
- (stattgehabter) Drogenabusus
- bekannte leichte kognitive Beeinträchtigung oder Demenz
- weniger als acht Jahre Schulbildung

### **2.2.2.2 Datenerfassung**

Die Pseudonymisierung der Studienteilnehmer erfolgte über die Zuordnung einer Teilnehmenden-Identifikationsnummer zusammengesetzt aus dem Jahr des Studieneinschlusses und einer durchgehenden laufenden Nummer (Beispiel: Ti2018005). Die Einwilligungserklärungen der Patienten/ Patientinnen wurden in Papierform erbeten und diese wird in einem Ordner im Büro der AG Endres, Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie aufbewahrt. Eine entsprechende Rekrutierungsliste wurde in Form einer Excel-Tabelle auf dem Charité S-Laufwerk angelegt und gespeichert. Daten wurden mithilfe von REDCap Data Entry Forms, welche einen REDCap Account voraussetzen, erhoben und gespeichert. Der Account wurde über eine Kooperation mit dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung (engl.

Berlin Institute of Health, BIH) beantragt und freigeschalten. Insgesamt wurden drei Verlaufsuntersuchungen nach der Ausgangsuntersuchung angestrebt. Eine erste Verlaufsuntersuchung (Visite 1, V1) war nach sechs Wochen, eine zweite (V2) nach sechs Monaten und eine dritte (V3) optional nach einem Jahr geplant. Mithilfe des SAP-Anwendungsportals wurden Informationen ergänzt.

### 2.2.2.3 Fragebögen

Es wurden die folgenden standardisierten Fragebögen genutzt und nach Anleitung ihrer entsprechenden Handbücher ausgewertet:

Fragebogen	Itembereich <sup>1</sup>	Referenz	Handbuch
<b>Allgemeinzustand und Lebensqualität (Karnowsky-Index)</b>	0 – 100 %		
<b>Allgemeinzustand und Lebensqualität (ECOG)</b>	0 – 5		
<b>EORTC-QLQ-C30 Version 3.0</b>	1 – 4	(63)	(64)
<b>EORTC-FA12</b>	1 – 4		
<b>EORTC-QLQ-LC13</b>	1 – 4		
<b>Selbsteinschätzung und Gedächtnisleistung</b>	1 – 5		
<b>Raschbasiertes Depressionsscreening Desci</b>	0 – 4		
<b>PnP-Fragebogen</b>	0 – 4		

<sup>1</sup> Der Itembereich ist die Differenz zwischen dem möglichen Maximum und dem möglichen Minimum der Antwort auf einzelne Items.

Fragebogen	Definition der Aussagen
<b>Allgemeinzustand und Lebensqualität (Karnowsky-Index/ ECOG)</b>	100 / 0 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit 90 / 0 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Fähig zu normaler Aktivität, kaum oder geringe Symptome

	<p>80 / 1 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Normale Aktivität mit Anstrengung möglich, deutliche Symptome</p> <p>70 / 1 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Selbstversorgung, normale Aktivität oder Arbeit nicht möglich</p> <p>60 / 2 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Einige Hilfestellung nötig, selbstständig in den meisten Bereichen</p> <p>50 / 2 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Hilfe und medizinische Versorgung wird oft in Anspruch genommen</p> <p>40 / 3 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Behindert, qualifizierte Hilfe benötigt</p> <p>30 / 3 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Schwerbehindert, Hospitalisation erforderlich</p> <p>20 / 4 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Schwerkrank, Intensive medizinische Maßnahmen erforderlich</p> <p>10 / 4 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Moribund, Unaufhaltsamer körperlicher Verfall</p> <p>0 / 5 = Karnofsky-Index (%) / ECOG- Tod</p>
<b>EORTC-QLQ-C30</b> <b>Version 3.0</b>	<p>1 = Überhaupt nicht.</p> <p>2 = Wenig</p> <p>3 = Mäßig</p> <p>4 = Sehr</p>
<b>EORTC-FA12</b>	<p>1 = Überhaupt nicht.</p> <p>2 = Wenig</p> <p>3 = Mäßig</p> <p>4 = Sehr</p>
<b>EORTC-QLQ-LC13</b>	<p>1 = Überhaupt nicht.</p> <p>2 = Wenig</p> <p>3 = Mäßig</p> <p>4 = Sehr</p>

<b>Selbsteinschätzung zur Gedächtnisleistung</b>	<p>1 = Sehr selten: Die Aussage traf max. einmal im letzten Monat auf mich zu.</p> <p>2 = Selten: Die Aussage traf häufiger als einmal/ Monat aber nicht wöchentlich auf mich zu.</p> <p>3 = Manchmal: Die Aussage traf einmal/ Woche auf mich zu.</p> <p>4 = Häufig: Die Aussage traf an mehreren Tagen/ Woche aber nicht täglich auf mich zu.</p> <p>5 = Sehr häufig: Die Aussage traf (mehrfach) täglich auf mich zu.</p>
<b>Raschbasiertes Depressionsscreening Desci</b>	<p>0 = Nie: Die Aussage traf nie auf mich zu.</p> <p>1 = Selten: Die Aussage traf an einigen wenigen Tagen auf mich zu.</p> <p>2 = Manchmal: Die Aussage traf an ca. der Hälfte der Tage auf mich zu.</p> <p>3 = Meistens: Die Aussage traf an den meisten Tagen auf mich zu.</p> <p>4 = Immer: Die Aussage traf an allen Tagen auf mich zu.</p>
<b>PnP-Fragebogen</b>	<p>0 = Nie: Die Aussage traf nie auf mich zu.</p> <p>1 = Selten: Die Aussage traf an einigen wenigen Tagen auf mich zu.</p> <p>2 = Manchmal: Die Aussage traf an ca. der Hälfte der Tage auf mich zu.</p> <p>3 = Meistens: Die Aussage traf an den meisten Tagen auf mich zu.</p> <p>4 = Immer: Die Aussage traf an allen Tagen auf mich zu.</p>

Der **Karnofsky-Score** wurde wie angegeben übernommen.

Der **EORTC QLQ-C30**-Fragebogen wurde nach Anleitung des entsprechenden Manuals folgendermaßen ausgewertet. (64)

1. Berechnung des Rohwertes (engl. RawScore, RS):  $RS = (I_1 + I_2 + \dots + I_n) / n$

2. Anwendung einer linearen Transformation auf 0-100, um die Punktzahl S zu erhalten. (Bei a. und b. beträgt die Spannweite = 3, bei c. Spannweite = 6.)

a. Funktionelle Skalen:

$$S = \left\{ 1 - \frac{RS - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

b. Symptomskala:

$$S = \left\{ \frac{RS - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

c. Globaler Gesundheitszustand/ Lebensqualität

$$S = \left\{ \frac{RS - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

Der **EORTC FA12**-Fragebogen wurde folgendermaßen ausgewertet:

1. Berechnung des Rohwertes (engl. RawScore, RS):  $RS = (I_1 + I_2 + \dots + I_n) / n$
2. Anwendung einer linearen Transformation auf 0-100, um die Punktzahl S zu erhalten (Spannweite = 3).

$$S = \left\{ \frac{RS - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

Der Fragebogen **Selbsteinschätzung zur Gedächtnisleistung** wurde ausgewertet, indem der Summenwert entsprechend den Definitionen der Aussagen (s. oben) gebildet wurde.

Der Fragebogen **Rasch-basiertes Depressionsscreening (Desc)** wurde nach Anleitung des entsprechenden Manuals ausgewertet. (65) Hierbei spricht ein Summenwert  $\geq 12$  „für das Vorliegen einer depressiven Episode“.

Der **PNP-Fragebogen** wurde folgendermaßen ausgewertet:

1. Berechnung des Rohwertes (engl. RawScore, RS):  $RS = (I_1 + I_2 + \dots + I_n) / n$
2. Zur uniformen Auswertung mithilfe der Formel

$$S = \left\{ \frac{RS - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

wurden die ordinalen Antwortmöglichkeiten von 0-4 auf 1-5 umgewandelt:  
(RS+1)

3. Anwendung einer linearen Transformation auf 0-100, um die Punktzahl S zu erhalten (Spannweite = 4)

$$S = \left\{ \frac{(RS + 1) - 1}{\text{Spannweite}} \right\} * 100 = \left\{ \frac{RS}{\text{Spannweite}} \right\} * 100$$

#### 2.2.2.4 Klinische Untersuchung

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung wurden auf REDCap gespeichert. Dabei wurden folgende Befunde eingetragen:

- Oberflächensensibilität
  - o Sensibilitätsdefizit (strumpfförmig, handschuhförmig)
- Pallästhesie
  - o Pallhypästhesie (Malleolär, Tuberositas tibiae, Spina iliaca, Fingergrundgelenke, Olecranon)
- Reflexabschwächung (ASR, PSR, Adduktoren, RPR, BSR, TSR)
- Paresen

#### 2.2.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologische Untersuchung wurde von den Studienärzten durchgeführt. Dabei wurden folgende Messungen unternommen und in REDCap eingetragen:

- N. suralis
  - o Amplitude  $\leq 3,5 \mu\text{V}$  (ja/ nein, Patienten-/ Patientinnenwert)
  - o NCV  $\leq 39 \text{ m/s}$  (ja/ nein, Patienten-/ Patientinnenwert)
- N. peroneus
  - o Amplitude  $\leq 5 \mu\text{V} \leq 3,5 \mu\text{V}$  (ja/ nein, Patienten-/ Patientinnenwert)
  - o NCV  $\leq 38 \text{ m/s}$  (ja/ nein, Patienten/ Patientinnenwert)
- N. ulnaris
  - o Amplitude  $\leq 5 \mu\text{V}$  (ja/ nein, Patienten-/ Patientinnenwert)
  - o NCV  $\leq 43 \text{ m/s}$  (ja/ nein, Patienten-/ Patientinnenwert)
- F-Wellen
- Zusammenfassung
  - o keine
  - o axonal

- demyelinisierend
- gemischt

Die in REDCap erfassten Daten wurden nach Microsoft Excel exportiert und wie oben beschrieben entsprechend ihrer Anleitung ausgewertet. Mittels GraphPad Prism 9 wurden zu den deskriptiven Daten der einzelnen Fragebögen sog. Violinen-Plots erstellt. Diesen kann der Median (dick gestrichelte Linie), die 25. und 75. Perzentile (dünn gestrichelte Linien) sowie das Minimum und das Maximum (obere bzw. untere Ränder der „Violine“) der Datenpunkte entnommen werden. Der Vorteil gegenüber eines Boxplots besteht darin, dass hierbei zusätzlich zu den genannten deskriptiven Statistiken die Häufigkeitsverteilung der Daten abgelesen werden kann. (66) Die exportierten Daten der klinischen und elektrophysiologischen Untersuchungen wurden nach Sensibilitätsdefiziten, Pallhypästhesien, Reflexabschwächungen, Paresen bzw. Hinweise auf axonale, demyelinisierende, gemischte Nervenschädigungen durchsucht und in Form eines Fließtextes zusammengefasst. Fallbeschreibungen der Studienteilnehmenden, die irAE-N entwickelten, wurden gesondert vorgenommen.

#### **2.2.2.6 Einfrieren von PBMCs und Serum**

Im Rahmen eines Pilotversuchs planten wir prädiktive Biomarker für irAE-N zu finden. Für die Probenentnahme zur Isolierung von mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden CPT-Blutentnahmeröhrchen mit integriertem FICOLL-Gradienten verwendet. Zusätzlich wurde Blut für die Serumanalyse abgenommen. Dem Laborprotokoll entsprechend wurde eine Aufarbeitung der Proben innerhalb von zwei Stunden angestrebt. Anschließend wurden 1-2 ml Serum und die PBMCs über Nacht im  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank im Labor der Experimentellen Neurologie aufbewahrt. Die PBMCs wurden anschließend in einen Stickstofftank transferiert. Zur Dokumentation wurde das elektronische Laborbuch „Labfolder“ genutzt. Der hierzu verwendete Account wurde über eine Kooperation mit dem Berlin Institute of Health erstellt.

## **Laborprotokoll**

### Serumproben

1. 2 Serum-Röhrchen (jeweils 5 ml) Blut abnehmen
2. Zentrifugation: 2000 g, 10 min, 21°C
3. Aliquotieren von zweimal 1 ml Serum in CryoTubes bzw. in 1,5 ml Eppendorf-Tubes
4. zunächst Lagerung in Mr. Frostie bei -80°C über Nacht, anschließend Lagerung bei -80°C

### Isolation der PBMCs mit CPT-Röhrchen

1. 2 CPT-Röhrchen (jeweils 8 ml) Blut abnehmen, Tube mehrfach invertieren, Aufarbeitung innerhalb von 2 Stunden
2. Röhrchen direkt vor dem Zentrifugieren mehrfach invertieren
3. Zentrifugation: 1600 g, 20 min, 21°C
4. unter der Sterilwerkbank aus jedem Röhrchen die oberen 2 ml Serum verwerfen
5. restliches Serum der Röhrchen pro Patient/ Patientin in einem 50 ml-Falcon Tube poolen, jedes Röhrchen zweimal mit 1 ml sterilem PBS vorsichtig spülen und zu dem Serum in das 50 ml Falcon Tube überführen
6. Falcon Tube mit kaltem PBS auf 50 ml auffüllen und invertieren
7. Zentrifugation: 300 g, 15 min, 4°C
8. Überstand unter der Sterilwerkbank verwerfen
9. Zellpellet mit 10 ml kaltem PBS resuspendieren
10. 10 µl Zellsuspension in 90 µl Trypanblau geben
11. Bestimmung der Zellzahl, währenddessen Zentrifugation: 300 g, 15 min, 4°C
12. Überstand unter der Sterilwerkbank verwerfen
13. Zellpellet in 4500 µl FBS + 500 µl DMSO resuspendieren
14. zunächst Lagerung in Mr. Frostie bei -80°C über Nacht, anschließend Überführung in Stickstofftank

### **2.2.2.7 Massenzytometrie (CyTOF)**

Bei der konventionellen Fluoreszenz-Durchflusszytometrie werden Oberflächenantigene von Zellen durch an Farbstoffe, sog. Fluorochrome, gebundenen Antikörpern und anhand der im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenz voneinander unterschieden. Limitiert wird dieses Messverfahren durch das Überlappen einzelner Fluoreszenzspektren der Fluorochrome, sodass pro Zelle höchstens 12-14 Parameter gemessen können. (67) In der Massenzytometrie werden hingegen Metallisotope zur Markierung genutzt, welche durch ihre spezifische Masse eine eindeutige Identifikation der Antigene erlauben. Mithilfe eines Massenspektrometers können sie anhand ihrer Fluggeschwindigkeit (engl. time of flight, TOF) separiert werden. Auf diese Weise können bis zu 50 verschiedene Parameter pro Zelle gemessen werden, was einen erheblichen Vorteil gegenüber der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie darstellt. (67) Daher eignet sich diese Methode besonders gut für die Identifikation von Biomarkern. (67, 68) Die bei dieser Studie verwendeten Antikörperkonjugate können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: In der Massenzytometrie verwendete Antikörperkonjugate

<b>Metallisotop</b>	<b>Ziel</b>	<b>Antikörperklon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Antikörpercocktail</b>
<b>89Y</b>	CD45	HI30	Fluidigm	3089003B	Oberfläche
<b>104Pd</b>	B2M	2M2	Biolegend	316302	Barcode
<b>105Pd</b>	CD57	HCD57	Biolegend	359610	Oberfläche
<b>106Pd</b>	B2M	2M2	Biolegend	316309	Barcode
<b>108Pd</b>	B2M	2M2	Biolegend	316311	Barcode
<b>110Pd</b>	B2M	2M2	Biolegend	316313	Barcode
<b>113In</b>	HLA-DR	L243	DRFZ Berlin	Herstellung durch das Zentrallabor Massenzytometrie, Dr. rer. nat. Mei	Oberfläche
<b>115In</b>	CD3	UCHT1	DRFZ Berlin	Herstellung durch das Zentrallabor Massenzytometrie, Dr. rer. nat. Mei	Oberfläche
<b>140Ce</b>	CD14	RMO52	Beckman- Coulter	A07764	Oberfläche
<b>141Pr</b>	CD196 (CCR6)	G034E3	Fluidigm	3141003A	Oberfläche
<b>142Nd</b>	CD19	HIB-19	Fluidigm	3142001B	Oberfläche
<b>143Nd</b>	CD123	6H6	Fluidigm	3143014B	Oberfläche
<b>144Nd</b>	CD4	RPA-T4	Biolegend	300507	Oberfläche
<b>145Nd</b>	CD185 (CXCR5)	REA103	Miltenyi Biotec	130-098-418	Oberfläche

<b>146Nd</b>	TCR Va7.2	3C10	Biologend	351707	Oberfläche
<b>147Sm</b>	CD279 (PD-1)	EH12.2H7	Biologend	329907	Oberfläche
<b>148Nd</b>	CD11c	Bu15	Biologend	980604	Oberfläche
<b>149Sm</b>	CD25	2A3	Fluidigm	3149010B	Oberfläche
<b>150Nd</b>	CD86 (B7.2)	IT2.2	Fluidigm	3150020B	Oberfläche
<b>151Eu</b>	CD278 (ICOS)	C398.4A	Fluidigm	3151020B	Oberfläche
<b>152Sm</b>	CD24	1B5	Sanquine	M1605	Oberfläche
<b>153Eu</b>	TIGIT	MBSA43	Fluidigm	3153019B	Oberfläche
<b>154Sm</b>	TIM-3	F38-2E2	Fluidigm	3154010B	Oberfläche
<b>155Gd</b>	CD27	2E4	Sanquine	M9185	Oberfläche
<b>156Gd</b>	CD183 (CXCR3)	G025H7	Fluidigm	3156004B	Oberfläche
<b>157Gd</b>	CD16	3G8	Biologend	980104	Oberfläche
<b>158Gd</b>	CD194/CCR4	L291H4	Fluidigm	3158032A	Oberfläche
<b>159Tb</b>	CD197 (CCR7)	G043H7	Biologend	353213	Oberfläche
<b>160Gd</b>	Tbet	4B10	Fluidigm	3160010B	intrazellulär
<b>161Dy</b>	CD28	L293	BD Biosciences	559770	Oberfläche
<b>162Dy</b>	FoxP3	PCH101	Fluidigm	3162011A	intrazellulär
<b>163Dy</b>	CD294 (CRTH2)	BM16	Fluidigm	3163003B	Oberfläche
<b>164Dy</b>	CCR10 (GPR-2)	314305	R&D Systems	MAB3478	Oberfläche
<b>165Ho</b>	CD127 (IL-7Ra)	A019D5	Fluidigm	3165008B	Oberfläche
<b>166Er</b>	CD36	AC106	Miltenyi Biotec	130-100-307	Oberfläche
<b>167Er</b>	anti-Nivolumab	6G5	Genscript	A01848	Oberfläche
<b>168Er</b>	anti-Ipilimumab	26B6H7D9	Genscript	A01859	Oberfläche
<b>169Tm</b>	TCRgd	11F2	Miltenyi Biotec	130-113-503	Oberfläche

<b>170Er</b>	CD152 (CTLA-4)	14D3	Fluidigm	3170005B	intrazellulär
<b>171Yb</b>	CD161	HP-3G10	Biologend	339911	Oberfläche
<b>172Yb</b>	CD273 (PD-L2)	24F.10C12	Fluidigm	3172014B	Oberfläche
<b>173Yb</b>	CD68	Y1/82A	Biologend	333809	Oberfläche
<b>174Yb</b>	CD45RA	4G11	DRFZ Berlin	Herstellung durch das Zentrallabor Massenzytometrie, Dr. rer. nat. Mei	Oberfläche
<b>175Lu</b>	CD274 (PD-L1)	29E.2A3	Fluidigm	3175017B	Oberfläche
<b>176Yb</b>	CD56	NCAM16.2	Fluidigm	3176008B	Oberfläche
<b>194Pt</b>	CD8	GN11/134D7	DRFZ Berlin	Herstellung durch das Zentrallabor Massenzytometrie, Dr. rer. nat. Mei	Oberfläche
<b>196Pt</b>	B2M	2M2	Biologend	316308	Barcode
<b>198Pt</b>	B2M	2M2	Biologend	316304	Barcode
<b>209Bi</b>	CD11b	ICRF44	Fluidigm	3209003B	Oberfläche

## Immunprofilerstellung mittels Massenzytometrie

Die Immunprofilerstellung mittels Massenzytometrie wurde mithilfe einer modifizierten Version des von Budzinski et al. veröffentlichten Protokolls durchgeführt. (69).

### 1. Normalisierung

Die durch die Massenzytometrie gewonnen Rohdaten werden als sog. Rain Plots dargestellt und als Textdatei bzw. im .fcs-Format gespeichert.

In der Massenzytometrie können nach kurzer Zeit Schwankungen in der Signalstärke beobachtet werden, welche auf eine Änderung der Geräteleistung durch sich anlagerndes Zellmaterial und auf notwendige Manipulationen wie die Reinigung und Kalibrierung des Gerätes zwischen den einzelnen Durchläufen zurückgeführt werden können. (70) Die daraus resultierenden Sensitivitätsunterschiede zwischen den Messungen müssen einberechnet werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Normalisierung“. Es werden hierbei sog. Beads (EQ 4 Element Calibration Beads, Fluidigm) eingesetzt, die aus den Elementen Cäsium, Europium, Holmium und Lutetium bestehen. (70) Über einen softwarebasierten zweistufigen Algorithmus können zunächst die Beads identifiziert und anschließend ein Normalisierungsfaktor berechnet und innerhalb eines Zeitintervalls linear interpoliert werden. Unter Interpolation versteht man in der Mathematik das Finden einer stetigen Funktion zu diskreten Daten. Der Normalisierungsfaktor von Cäsium entspricht dann Kanälen mit einer Atommasse unter 140 amu (Atomare Masseneinheit, engl. atomic mass unit), während der für Lutetium Kanälen über 176 amu entspricht. (70)

### **CATALYST**

Zwar entsteht in der Massenzytometrie eine Signalüberlappung in deutlich geringerem Ausmaße als in der Durchflusszytometrie; sie kann aber beispielsweise aufgrund von Geräteeigenschaften, Verunreinigung von Isotopen oder Oxidation dennoch auftreten. Zur Schätzung und Korrektur dieser Interferenzen wurde CATALYST (Cytometriedatenanalyse-Hilfsmittel, engl. Cytometry data analysis tools), ein R-basiertes Software-Paket, verwendet. (71)

## 2. Datenbereinigung

Wichtig bei der Analyse großer Datenmengen ist die Datenbereinigung, also das Entfernen redundanter Information von den Rohdaten. Dazu gehören beispielsweise nicht-intakte bzw. tote Zellen sowie die EQ Beads. (72) Klassischerweise werden zytometrische Daten als Serie zweidimensionaler Diagramme dargestellt, in denen Populationen von Interesse, sog. Gates, definiert und in den Diagrammen abgebildet werden. (73) Dies ist aufgrund der hohen Dimensionalität der in der Massenzytometrie generierten Daten nicht möglich. Statt des Gatings sind daher Analyse-Algorithmen bzw. -Programme für die Visualisierung dieser Daten notwendig.

### **OMIQ.ai**

OMIQ.ai ist eine Cloud-basierte Plattform zur automatisierten Datenanalyse. Sie beinhaltet Programme wie FlowSOM, opt-SNE und manuelles Gating. In OMIQ.ai wurden die Daten skaliert und einem sequenziellen FlowSOM-Clustering (100 FlowSOM-Cluster, 30 Meta-Cluster) und opt-SNE unterzogen. (74, 75)

### **FlowSOM**

Traditionelles Gating beruht auf der Auswahl definierter Zellpopulationen. Für die große Anzahl an bei der Massenzytometrie verwendeten Markern ist es schwierig, den Überblick über deren Verhalten zu definierten Zellpopulationen zu behalten, sodass oftmals wertvolle Informationen nicht erkannt werden. Mithilfe einer selbstorganisierenden Karte (engl. self-organizing map, SOM) kann dieses Problem angegangen werden. Selbstorganisierende Karten wie FlowSOM sind nicht-supervidierte Lernverfahren zur Clusteranalyse und Dimensionalitätsreduktion. Sie finden ihre Anwendung in der Visualisation von Ergebnissen nach einem manuellen Gating und können Informationen über Subpopulationen liefern, die im manuellen Gating möglicherweise übersehen wurden. (74)

### **Opt-SNE**

Eine statistische Methode zur Visualisierung stellt t-SNE (t-verteilte stochastische Nachbareinbettung, engl. t-distributed stochastic neighbor embedding) dar. Hierbei handelt es sich um eine nichtlineare Technik zur Einbettung hochdimensionaler Daten in einen niedrigdimensionalen Raum. Jedoch erlaubt t-SNE es nicht, Datensätze mit einer großen Anzahl an Beobachtungen zu skalieren, sodass es keine geeignete

Darstellung massenzytometrisch generierter Daten bietet. Eine neuere Methode, diese Einschränkungen zu adressieren, stellt opt-SNE (optimierte t-SNE) dar. Mittels opt-SNE werden die empirisch günstigsten und auf die entsprechenden Datensätze zugeschnittenen t-SNE-Parameter automatisch und in Echtzeit ausgewählt. (75)

### 3. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde in OMIQ.ai mit dem Signifikanzanalyse-von-Microarrays- (SAM)-Algorithmus durchgeführt. (74)

#### **SAM-Algorithmus**

SAM ist ein statistisches Analyseverfahren, welches über Unterschiede zwischen nach Metadaten organisierten Dateien berichtet, indem es Signalunterschiede ausgewählter Marker innerhalb dieser Populationen aufzeigt. (76)

#### **GraphPad**

Mittels GraphPad Prism 8 wurden sog. Boxplots erstellt. Hierbei erstreckt sich eine Box immer von der 25. bis zur 75. Perzentile und weist eine Linie auf, die den Median präsentiert. Durch sog. Whiskers an den Boxplots werden die Minimal- bzw. Maximalwerte dargestellt. (77)

#### **Laborprotokoll**

##### CyTOF

1. Proben zügig auftauen
2. Vorbereitung von 15 ml Medium + 0,75 µl Benzonase = 1/20.000 pro Probe
3. Überführung der Zellsuspension in das Medium
4. Zentrifugation ohne Inkubationszeit: 300 g, 10 min
5. Überstand verwerfen
6. Zellfärbemittel ansetzen: pro 100 ml CSM 1 µl Benzonase
7. Resuspension in 1 ml CSM (PBS + BSA + Azid für CyTOF (metallfrei))
8. In 15 ml Tube filtrieren, mit CSM auf 10 ml auffüllen
9. Zellzahl bestimmen: 20 µl pro Probe am MaxQuant (Zellzahl x 10 (Verdünnungsfaktor) x 10 (Gesamtvolumen))
10. Zentrifugation: 300 g, 10 min, Überstand verwerfen

11. In 100 µl CSM resuspendieren und in 96-v-bottom-Platte überführen (mit 100 µl Tube spülen = 200 µl Gesamtvolumen pro Well)
12. Zentrifugation: 500 g, 5 min
13. Mit Kamm und Ecke der v-bottom-Platte Zellen resuspendieren und auf  $2,5 \times 10^6$  in 27 µl einstellen
14. Das Gesamtvolumen des Barcode-Master Mix (s. Tabelle 3) ergibt 50 µl, d.h. 27 µl Zellsuspension mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen + 23 µl Barcode Master Mix
15. Falls die Zellzahl  $< 2,5 \times 10^6$  pro Well ist, trotzdem auf mindestens 27 µl auffüllen
16. Berechnung nach Zellzahlerfassungstabelle
17. Mit der Mehrkanalpipette 27 µl Zellsuspension aus den Platten in den Barcode Master Mix (liegt in PCR-Tubes vor) überführen und mischen
18. Inkubation: 30 min, 4°C
19. Abstoppen durch Zugabe von 100 µl CSM und in Deepwellplatte überführen, PCR-Tube 3 x mit je 100 µl CSM ausspülen und in Deepwellplatte geben, dann Deepwellplatte mit 800 µl/Well auffüllen
20. Zentrifugation: 500 g, 5 min
21. 4 x waschen mit CSM, Zentrifugation: 500 g, 5 min
22. Nach jedem Zentrifugieren mit 1200 µl CSM resuspendieren
23. Proben in 15 ml Falcon Tube filtrieren und poolen und dabei die Wells der Platte gut mit CSM spülen und in den Pool geben
24. Zellzahl bestimmen aus 20 µl Pool
25. Zentrifugation: 500 g, 5 min
26. Zellpellet in 160 µl CSM resuspendieren und 140 µl Surface Master Mix (Oberflächenmarker) dazugeben = GV 300 µl, Inkubation 30 min, 4 °C
27. Auffüllen auf 1,7 ml mit PBS-CyTOF (BSA frei) auf GV 2 ml
28. Zugabe 2 µl mDOTA-103-RH = 1/500 (Lebend-Tod-Färbung), Inkubation 5 min, Raumtemperatur (RT)
29. 2 x waschen mit CSM = 1 x mit CSM auffüllen auf 15 ml, 5 min zentrifugieren, 500 g, 2 x mit 1 ml CSM resuspendieren, Suspension in ein Facstube überführen, Falcontube mit CSM spülen und ins Facstube geben, 5 min zentrifugieren, 500 g
30. Miltenyi Foxp3-Kit vorbereiten: 1 Teil Solution 1 + 3 Teile Solution 2

31. In 500 µl Miltenyi Foxp3 Zellen resuspendieren (Vorbereitung für intrazelluläre Markierung), Inkubation 30 min, 4°C
32. Permeabilisierung vorbereiten: Perm-Puffer 10x Stock 1+9 in Aqua dest (GV 4 ml)
33. Zellen in 500 µl 1x Perm-Puffer resuspendieren, Inkubation 5 min, RT
34. Zentrifugation: 5 min, 700 g
35. Intrazelluläre Markierung (i.c.): Pellet in 285 µl Perm Buffer resuspendieren und 15 µl i.c. Master Mix dazugeben (GV = 300 µl), 30 min, RT
36. 2 x waschen mit 1x Perm-Puffer, Zentrifugation: 5 min, 700 g
37. Zellen resuspendieren in 2 ml 2 % PFA (16 % PFA max.1 Monat geöffnet) in PBS-CyTOF, über Nacht, 4°C
38. 1 x waschen mit CSM
39. Zentrifugation: 5 min, 700 g, Überstand verwerfen
40. Zellen resuspendieren in 1 ml PBS + 2 µl Iridium-Intercalator (1/500) (DNA-Markierung)
41. 1 x waschen mit CSM
42. Resuspendieren in 1 ml PBS-CyTOF
43. Zellzählung
44. 2 x waschen mit Aqua dest., Überstand verwerfen
45. Zellzahl zur Messung auf  $7,5 \times 10^5$ /ml + Beads einstellen (Beads min 1/10 bezogen auf das Gesamtvolumen dazugeben)

MaxQuant = Plattform für Massenspektrometrie-basierte Proteomik-Datenanalyse

### **2.2.3 Retrospektive Arbeit**

Anhand der Apothekenanforderungen des HTCCs wurden Patienten/ Patientinnen identifiziert, für die bis Mai 2018 ICI bestellt wurden. Die entsprechenden Papierakten wurden im Archiv der Klinik für Dermatologie aufgesucht, da sie zu diesem Zeitpunkt nicht digitalisiert vorlagen. Die Akten wurden nach Dokumentationen bezüglich neurologischer Symptome bzw. Diagnosen im Zusammenhang mit der Immuntherapie dieser Patienten/ Patientinnen durchsucht. Dieser Prozess wurde im Januar 2021 für die dann zugänglichen elektronischen Patientenakten wiederholt. Zur Datenerfassung wurde eine Excel-Datei auf dem Charité S-Laufwerk angelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Literaturrecherche

In einer von Oktober bis Dezember 2017 erstellten Übersichtsarbeit zum Thema „Neurologische Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren“ wurde eine systematische Literaturrecherche in den computerisierten Datenbanken medizinischer Fachartikel MEDLINE (PubMed) und Web of Science durchgeführt. Insgesamt wurden 42 Artikel mit 87 Fallberichten neurologischer Nebenwirkungen, darunter sieben Fälle einer okulären oder orbitalen Inflammation und zusätzlich 25 Publikationen von Hypophysitiden als Begleiterscheinung neurologischer immunvermittelter Nebenwirkungen identifiziert. Als Nebenwirkung einer Therapie mit PD-1-Inhibitoren fanden sich 22 Erkrankungen des peripheren und zehn Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Nach Auswertung dieser Fallberichte ergaben sich 15 peripher- und 16 zentralnervöse Nebenwirkungen unter einer Behandlung mit dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab. Weiterhin wurde von drei Nebenwirkungen des peripheren Nervensystems und sieben Nebenwirkungen des zentralen Nervensystems nach einer Kombinationstherapie berichtet. Nach einem Wechsel einer Monotherapie mit einem CTLA-4-Inhibitor auf einen PD-1-Inhibitor kam es in zwei Fällen zu Erkrankungen des peripheren und drei Erkrankungen des zentralen Nervensystems. (62) Einzelne Diagnosen lassen sich der Tabelle 4 entnehmen.

Tabelle 4: Einzelne irAE-N mit ihren Leitsymptomen aus der Literaturrecherche

<b>Betroffener Abschnitt des Nervensystems</b>	<b>n</b>	<b>Klinik</b>	<b>UAW folgender Substanzklassen (Anzahl der Fälle):</b>	<b>Ref.</b>
ZNS	3	Enzephalopathien	Ipilimumab (3)	(78-80)
	10	(Limbische) Enzephalitis	Nivolumab (4), Pembrolizumab (1), Monotherapien in Folge (2), Kombinationstherapie (3)	(81-85)

	1	Hirnstamm-Enzephalitis	Monotherapien in Folge (1)	(86)
	5	Aseptische Meningitis	Ipilimumab (2), Kombinationstherapie (3)	(85, 87, 88)
	2	PRES/ Nekrotische Myelopathie mit PRES	Ipilimumab (1), Nivolumab (1)	(89, 90)
	2	Neurosarkoidose, Granulomatöse ZNS-Erkrankung	Ipilimumab (1), Nivolumab (1)	(88, 91)
	1	Transverse Myelitis	Ipilimumab (1)	(92)
	2	Zentrale Demyelinisierung	Ipilimumab (1), Monotherapien in Folge (1)	(93)
	3	Zerebrales Ödem mit tonisch-klonischen Anfällen	Nivolumab (3)	(94, 95)
	1	Epilepsia partialis continua	Lambrolizumab (1)	(96)
	1	Tolosa-Hunt-Syndrom	Ipilimumab (1)	(88)
	7	Okuläre und orbitale Entzündungen	Ipilimumab (7)	(97)
	25	Hypophysitis	Ipilimumab (25)	(78, 87, 88, 90, 92)
PNS	17	Myasthenia gravis und myasthenes Syndrom	Ipilimumab (3), Nivolumab (6), Pembrolizumab (6), Monotherapien in Folge (1), Kombinationstherapie (1)	(85, 92, 98-109)
	6	GBS und GBS-ähnliche Neuropathie	Ipilimumab (3), Nivolumab (3)	(85, 87, 110-113)
	1	CIDP	Monotherapien in Folge (1)	(114)

	1	Transverser Myelitis ähnelnde Plexopathie	Kombinationstherapie (1)	(85)
	2	Meningo-Radikulitis/Meningo-Radikulo-Neuritis	Ipilimumab (1), Nivolumab (1)	(109, 115)
	6	Periphere Neuropathie	Ipilimumab (2), Nivolumab (1), Pembrolizumab (1), Kombinationstherapie (1), verblindete Medikation (1)	(79, 85, 116)
	1	Periphere sensible Neuropathie mit neurogener Blasenentleerungsstörung	Ipilimumab (1)	(79)
	5	(Poly-)Radikulopathie	Ipilimumab (1), Pembrolizumab (4)	(109, 114, 115)
	1	Mononeuropathia multiplex	Nivolumab (1)	(117)
	1	Entzündliche enterische Neuropathie	Ipilimumab (1)	(118)
	1	Parese des N. phrenicus mit bulbärer Parese	Nivolumab (1)	(85)
Muskulatur	3	Myositis	Ipilimumab (1), Nivolumab (2)	(92, 98, 101)
	2	Rhabdomyolyse	Nivolumab (2)	(107, 117)
	2	Myokarditis und Myositis mit Rhabdomyolyse	Kombinationstherapie (2)	(119)

n = Anzahl der Fälle, Ref. = Referenz

Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche sind Komplikationen, die das zentrale Nervensystem betreffen, am häufigsten aufgeführt (46 Fälle), gefolgt von Beeinträchtigungen des peripheren Nervensystems (42 Fälle). Seltener werden Erkrankungen der Muskulatur beschrieben (7 Fälle).

In den publizierten Fallberichten wurden neurologische Nebenwirkungen nicht selten von weiteren immunvermittelten Syndromen begleitet, die sich wie eingangs beschrieben als Myositiden, Myokarditiden oder Hypophysitiden manifestieren.

Am häufigsten wurden neurologische Nebenwirkungen in Zusammenhang mit einer Therapie mit Ipilimumab (55, davon 25 Hypophysitiden) publiziert. Unter einer Behandlung mit Nivolumab kam es in 26 Fällen zu neurologischen Nebenwirkungen. Eine Kombinationstherapie aus diesen beiden Substanzklassen führte in 11 Fällen zu neurologischen Beschwerden. Es fanden sich weiterhin 12 bzw. 1 Publikation zu neurologischen Nebenwirkungen unter Pembrolizumab bzw. Lambrolizumab. Monotherapien in Folge führten in 6 Fällen zu Beschwerden. Eine weitere Komplikation trat unter verblindeter Medikation auf.

### 3.2 TITAN<sup>2</sup>-Studie

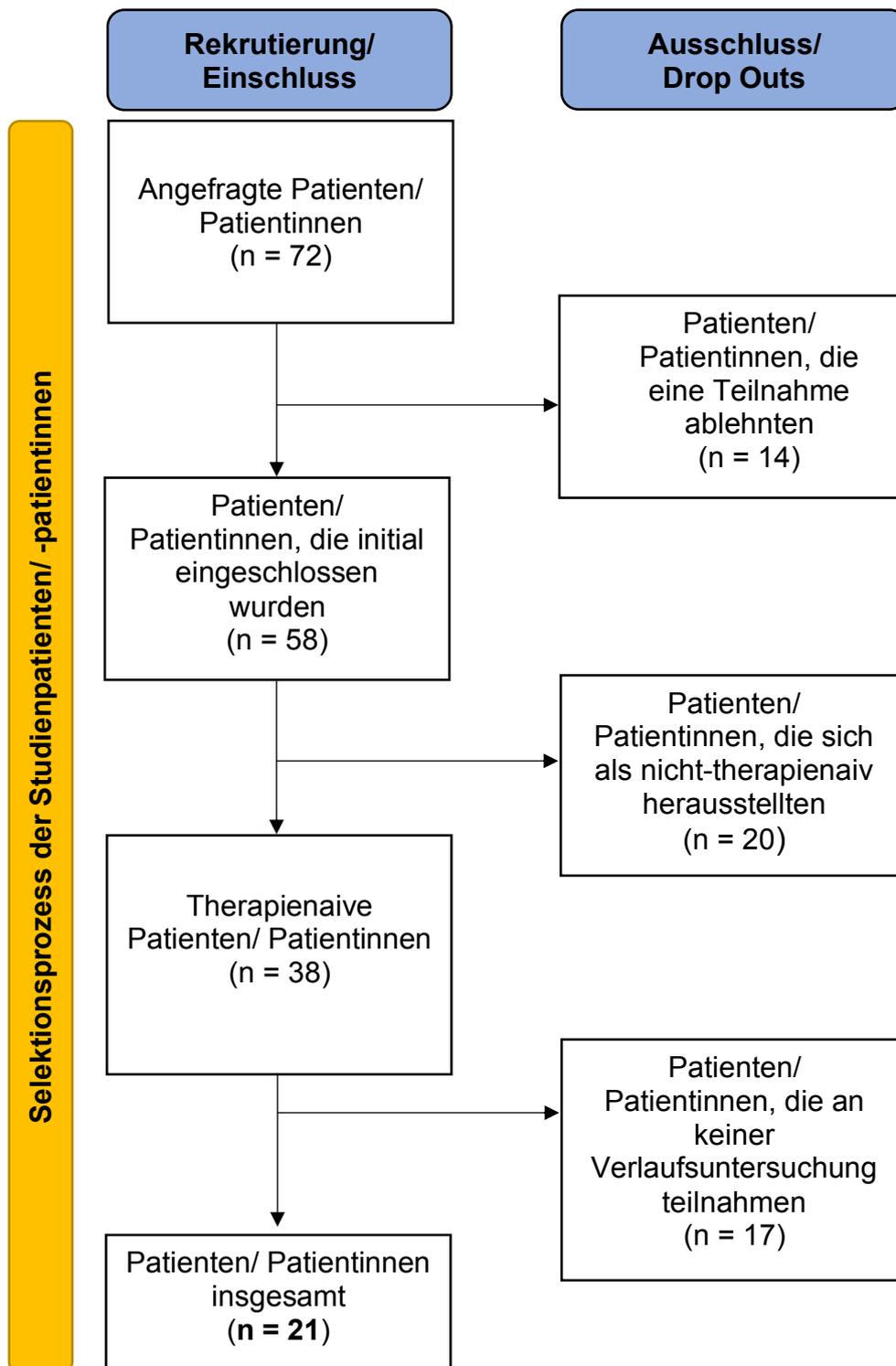


Abbildung 3: Rekrutierungs- und Selektionsprozess der TITAN<sup>2</sup>-Studienteilnehmer und -teilnehmerinnen

### 3.2.1 Beschreibung der Population

Von 38 Studienteilnehmern und -teilnehmerinnen, die mit ICI therapiert wurden, entwickelten zwei (5 %) neurologische Nebenwirkungen (Ti2018027 und Ti2019035). Beide Erkrankte erhielten den anti-PD-1-Antikörper Nivolumab, wobei eine Patientin diesen in Kombination mit Ipilimumab verabreicht bekam. Die neurologischen Nebenwirkungen zeigten sich nach 12 Zyklen Nivolumab (7 Monaten) bzw. nach zwei Gaben Nivolumab + Ipilimumab und beinhalteten eine Myositis (n = 1) und eine Faziale Parese (n = 1). Beide Erkrankte hatten neben ihren neurologischen Symptomen weitere autoimmunologische Beschwerden, darunter eine Thyreoiditis und eine Hepatitis. Im Folgenden werden die beiden Fälle dargestellt.

#### Ti2018027 (Patient mit V.a. Myositis)

Der 63-jährige Patient mit einer Struma diffusa und rezidivierenden depressiven Episoden in der Vorgeschichte erhielt Nivolumab fünf Monate nach der Diagnose und chirurgischen Behandlung eines polypoiden nodulären malignen Melanoms. Im November 2018, eine Woche nach Beginn des ersten Therapiezyklus, verspürte er Hitzewallungen, Geistesabwesenheit und Müdigkeit. Der Laborbefund zeigte eine Hyperthyreose und es wurde eine Autoimmunthyreoiditis diagnostiziert. Er ist zuvor viele Jahre lang mit 50 µg Thyrona-Jod behandelt worden, die Behandlung wurde jedoch ärztlich unterbrochen. Es wurde entschieden, wegen der damit verbundenen leichten Beschwerden keine thyreostatische Therapie einzuleiten. Zweieinhalb Monate später zeigten die Laborbefunde eine euthyreote Stoffwechsellage. Zu seiner Verlaufskontrolle zwölf Monate nach Studieneinschluss berichtete der Patient von seit Frühjahr 2019 bestehenden Muskelschmerzen und Schwäche in den Beinen, die in der elektronischen Patientenakte seit dem 14.05.2019 dokumentiert waren, letzter Zyklus (12. Gabe) am 09.05.20. Die CK-Werte waren im Zeitraum von November 2018 bis Mai 2020 stets normwertig [ $< 190$  U/l], ebenso AST [ $< 50$  U/l]. Der LDH-Wert stieg von August bis Oktober 2019 auf bis zu 431 U/l und im Februar 2019 bis auf 918 U/l an [135-250 U/l]. Elektrophysiologische Untersuchungen liegen nicht vor. Im Hinblick auf die vorbestehende Grunderkrankung wurde die Nivolumab-Behandlung aufgrund eines unzureichenden Therapieansprechens abgebrochen und der Patient erhielt seine letzte Infusion am 29.05.2019. Im Juni 2019 wurde er auf eine Behandlung mit BRAF-/ MEK-Inhibitoren umgestellt und einen Monat später berichtete er über eine Linderung der Schmerzen und der Schwäche, sodass eine Myositis als Ursache der

Beschwerden vermutet wird. Nach Abschluss der V3 entwickelte der Patient im März 2020 des Weiteren ein am ehesten medikamentös-toxisches Nierenversagen unter ICI-Therapie. Ende September wurde er auf eine Immunkombination aus Ipilimumab und Nivolumab umgestellt und im Dezember 2020 mit einer Autoimmunkolitis Grad II diagnostiziert, welche als am ehesten ICI-assoziiert eingeordnet wurde.

#### Ti2019035 (Patientin mit Fazialer Parese)

Die 52-jährige Patientin erhielt zwei Gaben der Kombinationstherapie Nivolumab/Ipilimumab zur Behandlung eines amelanotischen malignen Melanoms der Vulva, das 2009 erstmals diagnostiziert wurde und im Jahr 2019 wieder auftrat. Im September 2020, als die dritte Dosis verabreicht werden sollte, zeigten die Laborbefunde Anzeichen einer Autoimmunhepatitis [ALT = 201 U/l (< 31 U/l); AST = 77 U/l (< 35 U/l); AP = 175 U/l (35-105 U/l); GGT = 158 U/l (5-36 U/l); LDH = 268 U/l (135-250 U/l); Lipase = 87 U/l (13-60 U/l)] und sie stellte sich mit einem subkutanen Ödem vor. Die ICI-Therapie wurde pausiert und sie erhielt eine Woche lang Prednisolon p.o., beginnend mit 50 mg. Drei Tage danach bemerkte die Patientin eine neu aufgetretene Schwellung an der rechten Schläfe, ein tränendes rechtes Auge und einen hängenden rechten Mundwinkel. Sie wurde weitere drei Tage später aufgenommen, nachdem sie sich mit ihren Symptomen im Hauttumorzentrum vorstellte. Das cMRT zeigte eine für eine Fazialisläsion charakteristische Kontrastverstärkung und war negativ für intrakranielle Metastasen. Die elektrophysiologische Untersuchung war ohne pathologische Befunde, insbesondere zeigte sich eine seitengleiche Überleitzeit des Nervus facialis. Die Prednisolontherapie wurde fünf Tage lang auf 60 mg erhöht, gefolgt von einer täglichen Reduktion um 10 mg. Zur Vorbeugung von Hornhautschäden wurde eine topische Therapie mit Augensalbe eingeleitet. Bezüglich der Autoimmunhepatitis zeigten sich laborchemisch sinkende Werte für Transaminasen und GGT. Die Patientin wurde in stabilem Zustand entlassen und für weitere Folgetermine eingeplant.

ALT = Alanin-Aminotransferase; AP = Alkalische Phosphatase; AST = Aspartat-Aminotransferase; CK = Creatinkinase; cMRT = craniale Magnetresonanztomografie; GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase; LDH = Laktatdehydrogenase; P.o. = Per os (Orale Gabe); U/l = Units per liter (Einheiten pro Liter), V.a. = Verdacht auf

### Übrige therapienaive Studienpatienten/ -patientinnen

Bei Patienten/ Patientinnen, welche Pembrolizumab (n = 5), Avelumab (n = 2), Atezolizumab (n = 1) oder im Rahmen der „BMS CA 209-915“-Studie adjuvant Nivolumab + Ipilimumab oder Nivolumab + Placebo (n = 4) erhielten, wurden keine neurologischen Nebenwirkungen beobachtet.

Von den Teilnehmenden waren 14 weiblich und 24 männlich. Ihr medianes Alter betrug 64,2 Jahre (Spannweite von 30 bis 86 Jahren).

Da wir die Patienten/ Patientinnen hauptsächlich aus dem Hauttumorzentrum der Charité rekrutierten, stellte bei den Betroffenen das maligne Melanom die häufigste Therapieindikation (n = 33) dar, gefolgt vom Bronchialkarzinom (n = 2), Merkelzellkarzinom (n = 2) und Nierenzellkarzinom (n = 1).

Bei 11 Patienten/ Patientinnen war eine neurologische Erkrankung in der Vorgeschichte bekannt, darunter eine hypoxische Enzephalopathie (n = 1), ischämische Schlaganfälle (n = 6), epileptische Anfälle (n = 1), ein Querschnittssyndrom (n = 1), eine N. peroneus-Läsion (n = 1), eine Myasthenia gravis (n = 1) sowie leichte Gedächtnisstörungen (n = 1).

Bei 17 von 38 Patienten/ Patientinnen (44,74 %) wurden nicht-neurologische immunvermittelte Nebenwirkungen beobachtet, darunter Hepatitiden (n = 6), Thyreoiditiden (n = 4), Pneumonitiden (n = 2), Pankreatitiden (n = 2), Hypophysitiden (n = 3), Juckreiz (n = 1) und Vitiligo (n = 1), Kolitiden (n = 2), ein diabetisches Koma (n = 1), eine Hypophyseninsuffizienz (n = 1), eine Nebennierenrindeninsuffizienz (n = 1), Fatigue (n = 1) sowie Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Dyspnoe und Transaminasenanstieg (n = 1). Beim Großteil dieser Patienten/ Patientinnen musste eine Behandlung mit ICI aufgrund ihrer Nebenwirkungen pausiert (n = 11) bzw. vorzeitig abgebrochen (n = 5) werden. Im Durchschnitt wurde nach Auftreten der ersten Symptome nach 4,9 Tagen (Spannweite 0 – 20) eine immunmodulatorische Therapie begonnen. Das Behandlungsmanagement der immunvermittelten Nebenwirkungen beinhaltete die Gabe von Steroiden (n = 15). Diese Maßnahmen führten bei allen Patienten/ Patientinnen zu einer Symptomlinderung. Ein Studienpatient (Ti2018013) verstarb nach Abschluss der Studie und Wiedereinleitung einer Immunkombinationstherapie bei Tumorprogress. Bei diesem Teilnehmer kam es möglicherweise durch die Verschlechterung seiner immunvermittelten Hypophysitis zu einer Allgemeinzustandsverschlechterung. Zudem entwickelte sich während seines stationären Aufenthaltes eine Kolitis. Die genauen Charakteristika der TITAN<sup>2</sup> -

Patienten/ Patientinnen bei Therapieeinleitung mit ICI, derjenigen mit irAEs sowie derjenigen, die nach bereits erfolgter Therapieeinleitung (nach „V0“) rekrutiert wurden, können den Tabellen 5 - 7 entnommen werden.

Tabelle 5: Charakteristika der TITAN<sup>2</sup>-Teilnehmenden bei ICI-Einleitung

<b>Lfn</b>	<b>TITAN<sup>2</sup>-ID</b>	<b>Geschlecht (m/w)</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Therapieindikation/ Tumorentität</b>	<b>ICI</b>	<b>Chemotherapien in der Vergangenheit</b>	<b>Neurologische Vorerkrankungen</b>
<b>1</b>	Ti2017001	m	55	Malignes Melanom St. IIIc	Pembrolizumab	keine	keine
<b>2</b>	Ti2017002	m	73	Malignes Melanom St. IV mit zerebralen Metastasen	Nivolumab	Dabrafenib/ Trametinib	keine
<b>3</b>	Ti2017004	m	30	Malignes Melanom St. IIIc	Pembrolizumab (11/2017), Nivolumab + Ipilimumab (12/2017 und 06/2018 – 01/2019), Nivolumab (03/2019)	Dabafenib/ Trametinib (02- 06/2018)	keine
<b>4</b>	Ti2017005	m	53	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab, darauffolgend	keine	Hypoxische Enzephalopathie nach Herz-Kreislauf- Stillstand 2012

					Nivolumab		
<b>5</b>	Ti2017006	w	48	Malignes Melanom St. IIIB	BMS-Studie (Nivolumab oder Nivolumab + Ipilimumab)	keine	keine
<b>6</b>	Ti2018007	m	40	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine, im Verlauf zerebrale Metastasen
<b>7</b>	Ti2018008	w	57	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab bis 03/2018, ab 05/2018 Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine
<b>8</b>	Ti2018009	m	34	Malignes Melanom St. IIIC	BMS-Studie (Nivolumab oder Nivolumab + Ipilimumab), Abbruch aufgrund Progress	keine	keine
<b>9</b>	Ti2018010	w	53	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab,	keine	keine

					darauffolgend Nivolumab		
<b>10</b>	Ti2018011	m	77	Malignes Melanom St. IV mit diffusen zerebralen Filiae	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine
<b>11</b>	Ti2018012	w	64	Malignes Melanom St. IIIB	Nivolumab	keine	keine
<b>12</b>	Ti2018013	m	71	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine
<b>13</b>	Ti2018014	m	62	Malignes Melanom St. IIIB	BMS-Studie (Nivolumab oder Nivolumab + Ipilimumab)	keine	Z.n. Apoplex mit symptomatischer Epilepsie
<b>14</b>	Ti2018015	m	59	Malignes Melanom St. III	Nivolumab + Ipilimumab, dauffolgend Nivolumab	keine	keine
<b>15</b>	Ti2018016	w	75	NSCLC St. IV	Atezolizumab	Gemcitabin, Therapieabbruch aufgrund Nebenwirkungen	Akutes Querschnittssyndrom bei progredientem Wachstum der bekannten osteolytischen Metastase in

							BWK 3
16	Ti2018017	m	54	Malignes Melanom St. IIIC	CA209-915- Studie (7 Gaben Nivolumab oder Nivolumab + Ipilimumab), danach Nivolumab + Ipilimumab		keine, im Verlauf zerebrale Metastasen und epileptischer Anfall
17	Ti2018018	w	77	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab, (pausiert für zwei Jahre aufgrund Schlappheit, Müdigkeit)	keine	keine
18	Ti2018019	w	75	Malignes Melanom St. IV	Atezolizumab	Vemurafenib + Cobimetinib	Z.n. Apoplex, im Verlauf zerebrale Metastasen
19	Ti2018020	w	61	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	nach 2. Gabe AZ- Verschlechterung	keine

						und Umstellung auf BRAKi/ MEKi, nach 2 Jahren Reeinleitung Nivolumab + Ipilimumab	
<b>20</b>	Ti2018022	m	74	Malignes Melanom St. IIIC	Nivolumab	keine	keine
<b>21</b>	Ti2018024	w	80	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab	keine	keine
<b>22</b>	Ti2018025	w	68	Malignes Melanom St. IIIC	Nivolumab	zuvor BMS-Studie (Nivolumab oder Nivolumab + Ipilimumab), hierunter mehrere irAEs	Z.n. mehrzeitigen Hirninfarkten im Mediastromgebiet links
<b>23</b>	Ti2018026	m	78	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab	MEKi, zuvor Nivolumab erhalten (unklar, ab wann)	Myasthenia gravis

<b>24</b>	Ti2018027	m	63	Malignes Melanom St. IIIC	Nivolumab	keine	keine
<b>25</b>	Ti2018028	m	74	Malignes Melanom St. III	Nivolumab (Therapiebeginn unklar)	keine	keine
<b>26</b>	Ti2018029	m	58	NSCLC	Nivolumab	keine	keine
<b>27</b>	Ti2019030	m	62	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab	keine	Myositis und GBS-ähnliches Syndrom (nach 8. Gabe)
<b>28</b>	Ti2018031	w	77	Nierenzellkarzinom	Nivolumab + Ipilimumab	keine	bereits 2 Monate vor Therapieeinleitung leichte Gedächtniseinschränkungen, zerebrale Metastasen nicht sicher auszuschließen
<b>29</b>	Ti2019032	m	44	Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom St. IA	im Nachhinein festgestellt: keine ICI (R-CHOP)	-	-
<b>29</b>	Ti2019033	m	63	Malignes Melanom St. III	Pembrolizumab	keine	Meralgia paraesthetica
<b>30</b>	Ti2019034	m	60	Malignes Melanom St. IIIC	Nivolumab	keine	keine

<b>31</b>	Ti2019035	w	52	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine
<b>32</b>	Ti2019036	m	58	Malignes Melanom St. IV	Pembrolizumab	unbek.	axonale Polyneuropathie, Hypophysitis unter ICI
<b>33</b>	Ti2019037	m	86	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab	keine	Z.n. Apoplex
<b>34</b>	Ti2019038	w	67	Malignes Melanom St. IIIB	Nivolumab	keine	keine
<b>35</b>	Ti2020049	m	78	Malignes Melanom St. X	Nivolumab	keine	keine
<b>36</b>	Ti2020050	m	66	Merkelzellkarzinom St. IIIB	Avelumab	keine	Z.n. Apoplex
<b>37</b>	Ti2020051	m	79	Merkelzellkarzinom St. IV	Avelumab	keine	Z.n. zerebraler Ischämie im Stromgebiet der A. cerebri media rechts, N. peroneus Läsion links
<b>38</b>	Ti2020052	w	80	Malignes Melanom St. IIIB	Nivolumab	keine	keine

Tabelle 6: TITAN<sup>2</sup>-Patienten/ Patientinnen mit irAE

<b>Lfn.</b>	<b>TITAN<sup>2</sup>-ID</b>	<b>irAEs</b>	<b>Pausierung (nein/ ja)</b>	<b>Abbruch (nein/ ja)</b>	<b>Tage bis Therapie der irAEs (seit Symptombeginn)</b>	<b>Steroide (nein/ ja)</b>	<b>Ivig (nein/ ja)</b>	<b>Plasma- pherese (nein/ ja)</b>	<b>Verstorben (nein/ ja)</b>
<b>1</b>	Ti2018008	Hepatitis	nein	ja	5	ja	nein	nein	nein
<b>2</b>	Ti2018010	Thyreoiditis	nein	nein	0	nein	nein	nein	nein
<b>3</b>	Ti2018011	Pneumonitis	ja	ja	2	ja	nein	nein	nein
<b>4</b>	Ti2018013	Pankreatitis + Hypophysitis + Nebennierenrindeninsuffizienz + Hypophyseninsuffizienz	nein	nein	8	ja	nein	nein	nach Studienende
<b>5</b>	Ti2018014	Pneumonitis	ja	nein	3	ja	nein	nein	nein
<b>6</b>	Ti2018015	Hepatitis + Pankreatitis + Vitiligo	ja	nein	20	ja	nein	nein	nein
<b>7</b>	Ti2018017	Kolitis	ja	nein	3	ja	nein	nein	nein
<b>8</b>	Ti2018018	Fatigue	ja	ja	7	ja	nein	nein	nein
<b>9</b>	Ti2018020	AZ-Verschlechterung + Dyspnoe + Transaminasenanstieg	ja	nein	1	ja	nein	nein	nein
<b>10</b>	Ti2018025	Hepatitis + Thyreoiditis + Hypophysitis	ja	ja	13	ja	nein	nein	nein

<b>11</b>	Ti2018027	Thyreoiditis	ja	ja	7	nein	nein	nein	nein
<b>12</b>	Ti2019030	Hepatitis + Thyreoiditis	ja	nein	0	ja	nein	nein	nein
<b>13</b>	Ti2018031	Bewusstseinsstörung	nein	nein	7	ja	nein	nein	nein
<b>14</b>	Ti2018035	Hepatitis	ja	nein	3	ja	nein	nein	nein
<b>15</b>	Ti2018036	Hypophysitis	unbekannt	nein	unbekannt	ja	nein	nein	nein
<b>16</b>	Ti2019038	Hepatitis + Kolitis	ja	nein	0	ja	nein	nein	nein
<b>17</b>	Ti2020050	Juckreiz	nein	nein	0	ja	nein	nein	nein

AZ = Allgemeinzustand

Tabelle 7: Charakteristika der Teilnehmenden, die nach „V0“ rekrutiert wurden

<b>Lfn</b>	<b>Rekrutierungs ID</b>	<b>Ge- schlecht (m/w)</b>	<b>Alter in Jah- ren</b>	<b>Therapie- indikation/ Tumorentität</b>	<b>ICI</b>	<b>Chemo- therapie in der Vergangen- heit</b>	<b>Neurologische Vor- erkrankungen</b>	<b>irAE-Ns (Zeitpunkt)</b>
<b>1</b>	Ti2018021	m	33	EBV- assoziiertes klassisches Hodgkin- Lymphom St. IIA	Nivolumab	CHOP + Rituximab, Brentuxi- mab	Inflammator- ische Neuropathie mit Hirnnerven- beteiligung	GBS (nach 9. Gabe)

<b>2</b>	Ti2018023	m	75	Urothel- karzinom der Harnblase	Pembroli- zumab	Cisplatin + Gemcitabin	keine	Schwerpunkt- neuropathie und Hypophysitis (nach 6. Gabe)
<b>3</b>	Ti2018029	m	58	NSCLC	Nivolumab	keine	keine	keine
<b>4</b>	Ti2019039	w	69	NSCLC	Nivolumab	4 Zyklen Carboplatin + Paclitaxel	singuläre Hirnmetastase links parietal	Chemotherapie- induzierte Polyneuropathie CTC I – II°; V.a. Immuntherapie- assoziierte Myopathie (nach 16 Monaten)
<b>5</b>	Ti2019040	m	77	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine	Myokarditis, Myositis, Thyreoiditis, Pankreatitis, Axonal demyelinisierende, motorischer Neuropathie

								(4 Monate nach Therapiebeginn)
6	Ti2019041	m	57	Merkelzellkarzinom, Malignes Melanom	Avelumab (EMR-10070-003 Studie)	keine	keine	V.a. medikamenteninduzierte Myopathie, rechtsseitige Abduzensparese (14 Monate nach Therapiebeginn)
7	Ti2019042	m	68	Thymuskarzinom Masaoka-Koga-St. III	Nivolumab	4 Zyklen neoadj. Cisplatin, Adriamycin und Cyclophosphamid	keine	Rhabdomyolyse, Myokarditis, Myositis der Augenmuskulatur, Autoimmunhepatitis, Thyreotoxische Krise (9 Tage nach 2. Gabe)
8	Ti2019043	m	58	Pulmonales Adenokarzinom	Nivolumab	4 Zyklen Cisplatin +	keine	Therapiestopp wegen

						Vinorelbin, 10 Zyklen Peme- trexed, Carboplatin, Bevacizu- mab. 6 Zyklen Paclitaxel, Carboplatin, Bevacizu- mab		Hypothyreose und Myositis (nach 6. Gabe)
<b>9</b>	Ti2019044	w	58	NSCLC mit zerebralen Metastasen	Nivolumab	Gemcitabin, Avastin und Cisplatin, dann Alimta und Cisplatin	Symptomatische fokale, teils generalisierte Epilepsie Linksseitige brachiofaziale Hemiparese bei zerebralen Metastasen	Serie fokaler Anfälle (seit Therapiebeginn jeweils 1 Woche nach Gabe, zum aktuellen Zeitpunkt 2 Gaben erfolgt)

<b>10</b>	Ti2019045	m	78	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab, dann Nivolumab	keine	keine	GBS-ähnliches Syndrom mit progredienter Paraparese, Dysphagie, peripherer Fazialisparese rechts, Okulomotoriusparese links (nach 4. Gabe)
<b>11</b>	Ti2019046	m	62	Malignes Melanom St. IIIC	4 Gaben Ipilimumab, nach 1 Monat Wechsel zu Nivolumab	keine	Im Verlauf zerebrale Metastase	Zuckungen der linken Augenpartie, Therapieabbruch bei ARDS (nach 1. Gabe Nivolumab)
<b>12</b>	Ti2019047	w	75	Metastasiertes Plattenepithelkarzinom, Z.n.	Cemiplimab / Regeneron	Cisplatin + 5-FU	keine	Epilepsie mit komplex fokalen Anfällen und PNP

				Malignem Melanom	2810 ONC 1540 Studie			(2 Monate nach Ende der 3-jährigen Therapie)
<b>13</b>	Ti2019048	m	64	Malignes Melanom St. IV	Pembroli- zumab, Pausierung und Wieder- beginn	keine	RRMS ED 1990, Depression und Panikattacken, Autoimmun- thyreoiditis de Quervain, V.a. seronegative rheumatoide Arthritis	Verschlechterung der MS- Symptomatik (nach 4. Gabe), Autoimmun- hypophysitis, Autoimmun- nephritis, Autoimmun- neuropathie (6 Monate nach Wiederbeginn)
<b>14</b>	Ti2020053	m	74	Malignes Melanom St. III C	Pembroli- zumab	keine	keine	Kardiotoxische Reaktion + Uveitis
<b>15</b>	Ti2020054	m	79	Malignes Melanom St. IV	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine	Myositis mit begleitender Myokarditis

								(1 Monat nach 1. Gabe)	
16	Ti2021055	m	77	Bronchialkarzinom	Nivolumab	Carboplatin/ Paclitaxel	keine	keine	schwere axonale PNP mit Atrophien der Hand- und Fußmuskulatur (4 Jahre nach Beginn)
17	Ti2021056	m	69	Melanom des Auges	Nivolumab	keine	keine	keine	Hypophysitis, Thyreoiditis, Myositis, Myokarditis, Neuropathie (3 Monate nach 1. Gabe)
18	Ti2021057	m	69	Malignes Melanom	Nivolumab + Ipilimumab	keine	keine	keine	Bein-betonte führend demyelinisierende Polyneuropathie, Myositis (4 Monate nach 1. Gabe)

<b>19</b>	Ti2021058	m	61	HCC	Atezoli- zumab + Bevaci- zumab (11/2020)	keine	Meningitis in der Kindheit	Okulär und proximal betonte Myositis mit Begleitmyokarditis (1 Monat nach 1. Gabe)
<b>20</b>	Ti2021059	w	78	Malignes Melanom St. IIIIC	Pembrolizu mab	keine	keine	keine

ARDS = Akutes Lungenversagen (engl. Acute respiratory distress syndrome), GBS = Guillain-Barré-Syndrom, PNP = Polyneuropathie, St. = Stadium, Z. n. = Zustand nach

### 3.2.2 Fragebögen

Je nach Fragebogen liegen von 17 bis 21 Studienpatienten/ - patientinnen sowohl Baseline-Daten als auch mindestens eine Verlaufsuntersuchung im Zeitraum von 6 Wochen bis 12 Monaten vor. Anhand von Violinen-Plots werden die Angaben aus den Fragebögen dargestellt.

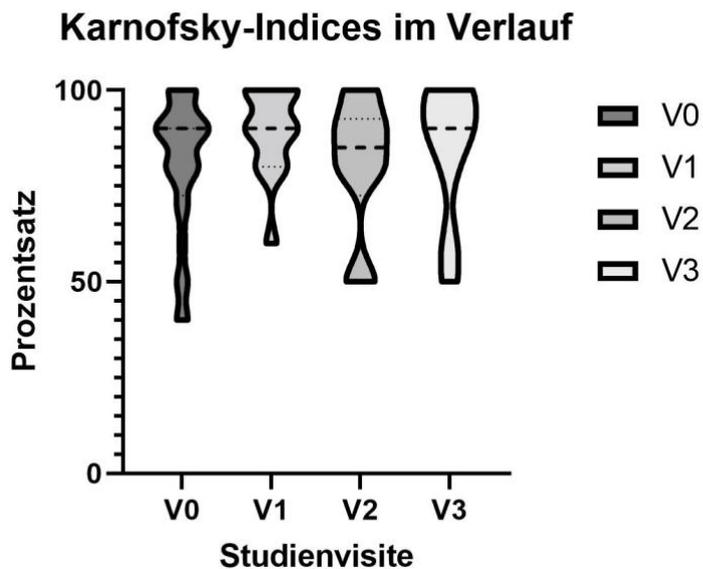


Abbildung 4: Karnofsky-Indices der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Es zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Lebensqualität der Teilnehmenden im Verlauf der Studie.

Rücklauf: V0 (20), V1 (14), V2 (10), V3 (9).

### EORTC-QLQ-C30

Dieser Fragebogen beinhaltet die Subskalen „Funktionsfähigkeit“, „Symptomatik“, und „Globaler Gesundheitszustand/ Lebensqualität“. Die Skalen und Einzelwerte reichen von 0 bis 100 Punkten. Ein hoher Skalenwert steht für ein hohes Antwortniveau.

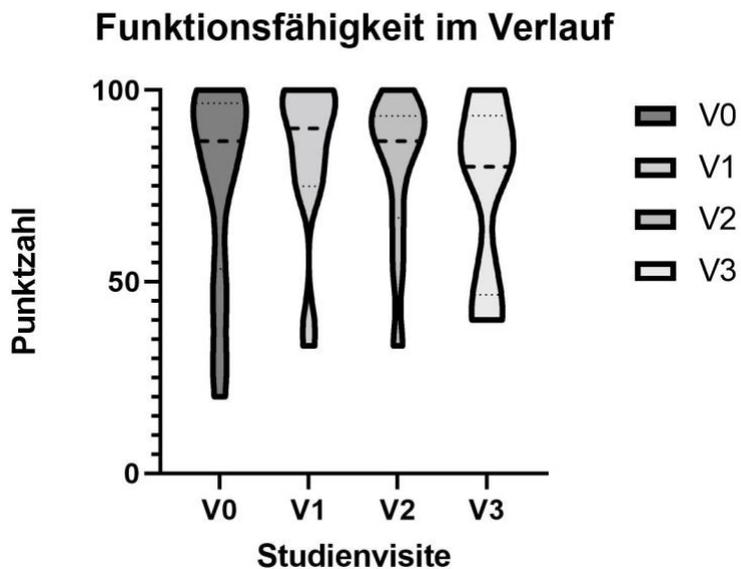


Abbildung 5: Funktionelle Subskala des EORTC.QLQ-C30 zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Diese Subskala beinhaltet die physische, kognitive und emotionale Funktion sowie die Rollenfunktion der Betroffenen. Mit der Rollenfunktion ist gemeint, inwiefern sich die Teilnehmenden auf der Arbeit und in der Freizeit eingeschränkt gefühlt haben. Ein hoher Wert in der Funktionsskala steht für ein hohes Niveau der Funktionsfähigkeit. In unserer Kohorte zeigte sich zunächst eine Besserung der Funktionsfähigkeit, welche jedoch im Verlauf der Studie wieder abnahm.

Rücklauf: V0 (21), V1 (16), V2 (11), V3 (9).

### Symptomatik im Verlauf

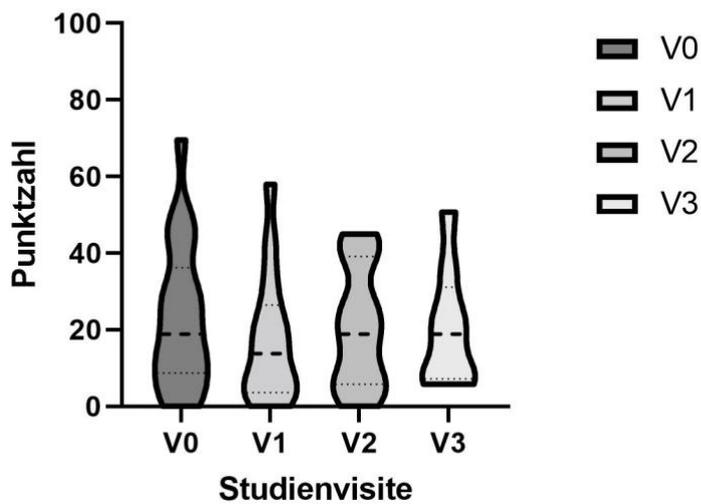


Abbildung 6: Symptom-Subskala des EORTC.QLQ-C30 zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Ein hoher Wert in dieser Skala steht für ein hohes Maß an Symptomatik. Sie nahm zwar zu Beginn der Studie ab, jedoch litten die Teilnehmenden im Studienverlauf wieder vermehrt an Symptomen.

Rücklauf: V0 (21), V1 (16), V2 (11), V3 (9).

### Globaler Gesundheitszustand/ Lebensqualität im Verlauf

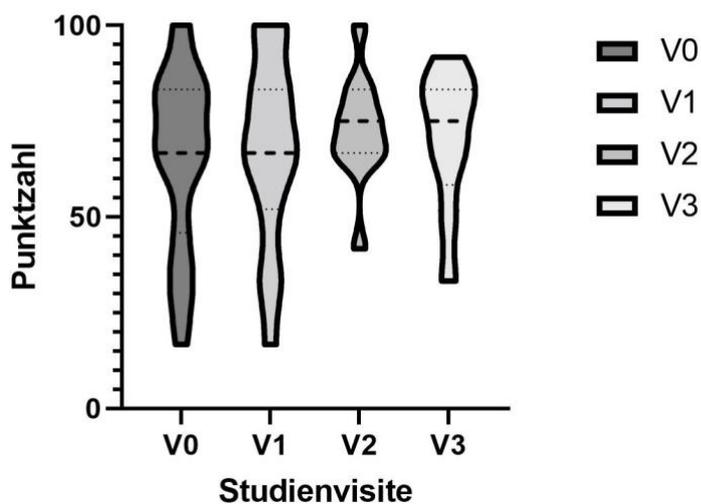


Abbildung 7: Subskala für den globalen Gesundheitszustand/ die Lebensqualität der Teilnehmenden zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Ein hoher Wert in dieser Skala steht für einen hohen globalen Gesundheitszustand/ eine hohe Lebensqualität. Nach Therapiebeginn stiegen diese Parameter in unserer Kohorte an, es zeigte sich also eine Besserung des Gesundheitszustandes und der Lebensqualität.

Rücklauf: V0 (21), V1 (16), V2 (11), V3 (9).

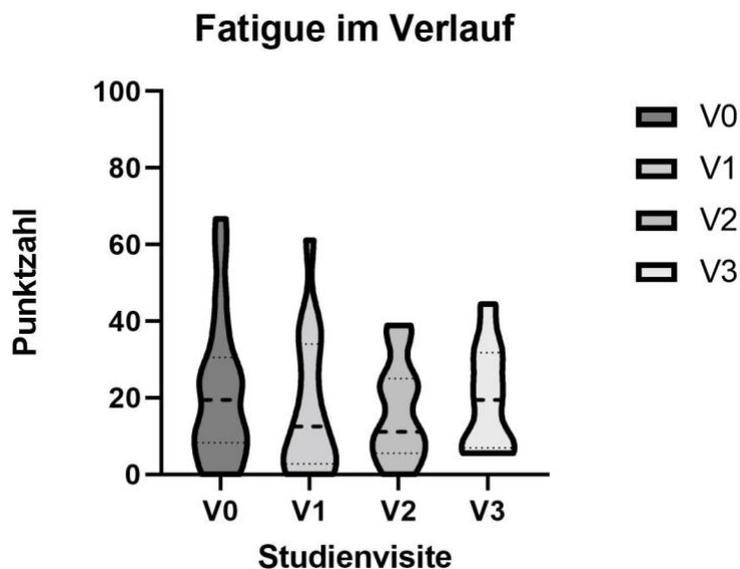


Abbildung 8: Fatigue-Symptomatik der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Verwendet wurde der standardisierte Fragebogen „EORTC-FA12“ auf einer Skala von 0 bis 100 Punkten. Ein hoher Wert in dieser Skala steht für ein hohes Maß an Fatigue. Im frühen Verlauf der Studie berichteten die Teilnehmenden von einer Besserung der Fatigue-Symptomatik, welche jedoch zum Zeitpunkt der Abschlussuntersuchung wieder zunahm.

Rücklauf: V0 (21), V1 (16), V2 (11), V3 (9).

### Selbsteinschätzung zur Gedächtnisleistung im Verlauf

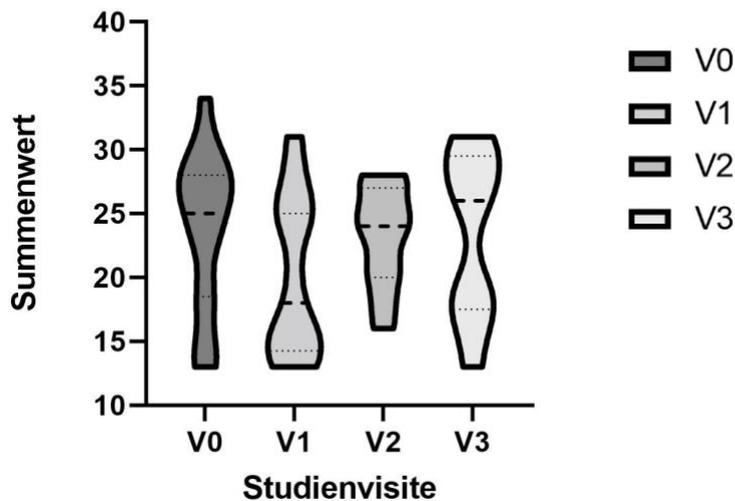


Abbildung 9: Selbsteinschätzung zur Gedächtnisleistung der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Verwendet wurde eine Skala von 13 bis 65 Punkten. Ein hoher Wert steht für eine geringe Gedächtnisleistung. Die Betroffenen schätzten ihre Gedächtnisleistung zu Beginn der Therapie als am besten ein, sie nahm ihrem Empfinden nach am Ende der Studie jedoch wieder ab.

Rücklauf: V0 (17), V1 (12), V2 (11), V3 (9).

### Depressivität im Verlauf

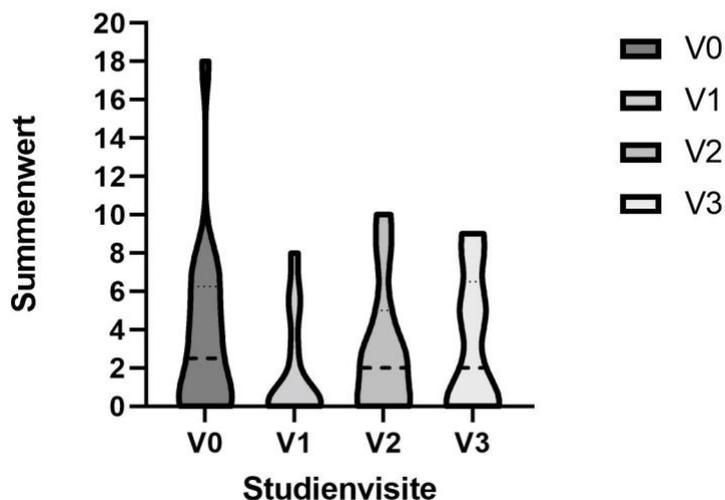


Abbildung 10: Depressivität der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Verwendet wurde der standardisierte Fragebogen „Rasch-basiertes Depressionsscreening Desci“. Ein Summenwert von  $\geq 12$  spricht für das Vorliegen einer depressiven Episode. Die Depressivität nahm im Verlauf der Studie ab.

Rücklauf: V0 (18), V1 (13), V2 (11), V3 (9).

### Polyneuropathie-Symptome im Verlauf

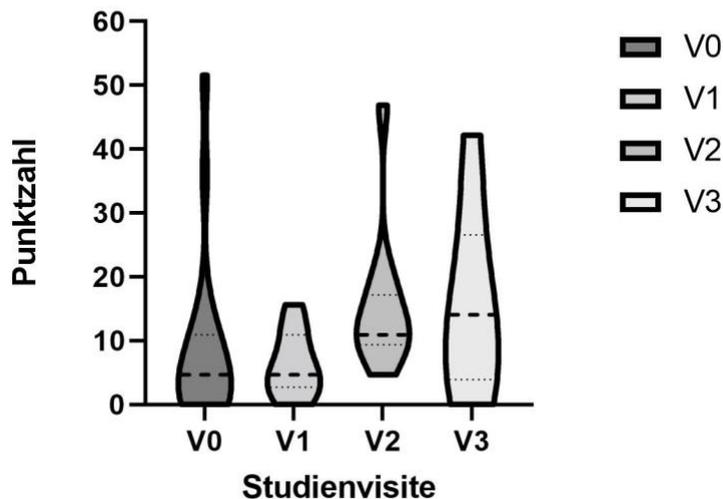


Abbildung 11: Polyneuropathie-Symptome der Studienpatienten und -patientinnen zum Zeitpunkt der einzelnen Studienvisiten

Die Daten stammen aus dem standardisierten „PNP-Fragebogen“ und werden auf einer Skala von 0 bis 100 Punkten dargestellt. Eine hohe Punktzahl spricht für ein hohes Maß an Polyneuropathie-Symptomatik. Die Symptomatik nahm im Verlauf der Studie zu.

Rücklauf: V0 (19), V1 (14), V2 (11), V3 (9).

### 3.2.3 Klinisch-neurologische Untersuchungen

Von 13 Studienteilnehmenden (Ti2017003; Ti2017005; Ti2017006; Ti2018012; Ti2018013; Ti2018014; Ti2018015; Ti2018027; Ti2018034; Ti2020049; Ti2020050; Ti2020051; Ti2020052) liegt sowohl eine Baseline- als auch mindestens eine Verlaufsuntersuchung im Zeitraum von 6 Wochen bis 12 Monaten vor. Ti2018027 und Ti2018035 wurden gesondert in Form von Fallberichten aufgeführt. Für sie liegen eine V0 bzw. eine V1 und eine V3 vor.

Visite 0: 20 Patienten und Patientinnen wurden vor ihrer ersten ICI-Therapie neurologisch untersucht. 7 Teilnehmende (Ti2017001; Ti2017004; Ti2018007; Ti2018008; Ti2018010; Ti2018016; Ti2018018) werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da für sie keine Verlaufsuntersuchung vorliegt. Bei zwei Teilnehmenden (Ti2017006; Ti2020050) zeigte sich ein Sensibilitätsdefizit, welches sich jedoch weder handschuh- noch strumpfförmig darstellte. 6 (Ti2017003; Ti2017005; Ti2018014; Ti2018027; Ti2020049; Ti2020050) wiesen eine Pallhypästhesie auf. Eine Abschwächung der Muskeleigenreflexe war bei zwei (Ti2018027; Ti2020049) Patienten festzustellen. Paresen hatte keiner der Untersuchten.

Visite 1: 8 Patienten und Patientinnen wurden 6 Wochen nach ihrer ersten ICI-Therapie neurologisch untersucht. Bei keinem der Untersuchten zeigte sich ein Sensibilitätsdefizit. 5 (Ti2018012; Ti2018013; Ti20180014; Ti2018034; Ti2020050) wiesen eine Pallhypästhesie auf. Eine Abschwächung der Muskeleigenreflexe war bei einem Patienten (Ti2018034) festzustellen. Eine Studienteilnehmerin (Ti2019035) wies eine faziale Parese auf.

Visite 2: 9 Patienten und Patientinnen wurden 6 Monate nach ihrer ersten ICI-Therapie neurologisch untersucht. Bei keinem der Untersuchten zeigte sich ein Sensibilitätsdefizit. 6 (Ti2017006; Ti2018012; Ti20180014; Ti2018015; Ti2020050; Ti2020052) wiesen eine Pallhypästhesie auf. Eine Abschwächung der Muskeleigenreflexe war bei 2 (Ti2018012; Ti2020049) festzustellen. Paresen hatte keiner der Teilnehmenden.

Visite 3: 6 Patienten und Patientinnen (Ti2018027; Ti2018034; Ti2018035; Ti2020050; Ti2020051; Ti2020052) wurden 12 Monate nach ihrer ersten ICI-Therapie neurologisch untersucht. Bei keinem der Untersuchten zeigte sich ein Sensibilitätsdefizit. 3 (Ti2018027; Ti2018034; Ti2020050) wiesen eine Pallhypästhesie auf. Eine Abschwächung der Muskeleigenreflexe war bei keinem festzustellen. Paresen hatte keiner der Teilnehmenden.

### 3.2.4 Elektrophysiologischer Befund

Von 13 Studienteilnehmenden liegt sowohl eine Baseline- als auch mindestens eine Verlaufsuntersuchung im Zeitraum von 6 Wochen bis 12 Monaten vor. Es wurde die Amplitude und die Nervenleitgeschwindigkeit des N. suralis, N. peroneus sowie des N. ulnaris rechts bestimmt. Ti2019035 wird gesondert aufgeführt. Von dieser Patientin liegt eine V1 und eine V3 vor.

Visite 0: 19 Patienten und Patientinnen wurden vor ihrer ersten ICI-Therapie elektrophysiologisch untersucht. 6 Teilnehmende (Ti2017004; Ti2018007; Ti2018008; Ti2018010; Ti2018018; Ti2018019) werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da für sie keine Verlaufsuntersuchung vorliegt. Somit waren zu Beginn der Studie zwei Teilnehmende elektrophysiologisch auffällig, nämlich Ti2018034 mit einer Amplitudenminderung des N. suralis auf 2,4  $\mu\text{V}$  [3,5  $\mu\text{V}$ ] und des N. peroneus auf 2,4  $\mu\text{V}$  [5  $\mu\text{V}$ ] sowie Ti2020051 mit einer Amplitudenminderung des N. suralis auf 2,7  $\mu\text{V}$  [3,5  $\mu\text{V}$ ], einer verminderten Nervenleitgeschwindigkeit desselben Nervs auf 31,8 m/s [39 m/s] sowie des N. ulnaris auf 41,7 m/s [43 m/s].

Visite 1: 8 Patienten und Patientinnen wurden 6 Wochen nach ihrer ersten ICI-Therapie elektrophysiologisch untersucht. Bei niemandem zeigte sich eine demyelinisierende, jedoch bei einem (Ti2018013) eine axonale Nervenschädigung mit einer Amplitudenminderung des N. suralis auf 3,1  $\mu\text{V}$  [3,5  $\mu\text{V}$ ]. Für Ti2018034 und Ti2020051 liegt keine V1 vor. Die elektrophysiologische Untersuchung von Ti2019035 ergab keinen Hinweis auf eine Polyneuropathie und somit keinen Hinweis auf eine Schädigung des N. facialis im Rahmen einer Polyneuropathie. Es zeigte sich eine seitengleiche Überleitzeit des N. facialis.

Visite 2: 8 Patienten und Patientinnen wurden 6 Monate nach ihrer ersten ICI-Therapie elektrophysiologisch untersucht. Bei 3 (Ti2018016; Ti2020050; Ti2020051) zeigte sich eine axonale bzw. gemischte Nervenschädigung. Ti2018016 wies eine Amplitudenminderung des N. peroneus auf 1,72  $\mu\text{V}$  [5  $\mu\text{V}$ ] auf. Bei Ti2020050 zeigte sich eine Amplitudenminderung des N. suralis mit 2,7  $\mu\text{V}$  [3,5  $\mu\text{V}$ ] und des N. peroneus mit 0,2  $\mu\text{V}$  [5  $\mu\text{V}$ ] sowie eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit des N. peroneus mit 35,6 m/s [38 m/s]. Ebenfalls ergab sich bei Ti2020051 eine Amplitudenminderung

des N. suralis auf 1,8  $\mu$ V [3,5  $\mu$ V] sowie des N. peroneus auf 0,86  $\mu$ V [5  $\mu$ V]. Bei niemandem zeigte sich eine demyelinisierende Nervenschädigung.

Visite 3: 2 Patienten und Patientinnen wurden 12 Monate nach ihrer ersten ICI-Therapie elektrophysiologisch untersucht (Ti2018027; Ti2018034). Bei keinem zeigte sich eine axonale, demyelinisierende oder gemischte Nervenschädigung, insbesondere nicht bei Ti2018034, welcher zur V0 eine axonale Läsion aufwies.

### **3.2.5 Massenzytometrie (CyTOF)**

Bei diesem Teilbereich der Arbeit handelt es sich um einen Pilotversuch zur Etablierung prädiktiver Biomarker bezüglich irAE-N. Hierzu wurden Proben von 17 Tumorpatienten/ -patientinnen, die mit ICI behandelt wurden, entweder vor Therapiebeginn (Kontrollgruppe) und bei regelmäßigen Untersuchungen nach Einleitung der Therapie oder nach Entwicklung von neurologischen Nebenwirkungen untersucht. PBMC wurden isoliert und mittels Massenzytometrie unter Verwendung eines Antikörper-Panels mit 44 Oberflächenmarkern zur T-Zell-Phänotypisierung analysiert. Acht Patienten/ Patientinnen mit immunvermittelten Nebenwirkungen (Ti2018020; Ti2018021; Ti2018023; Ti2018025; Ti2018026; Ti2018027; Ti2018028; Ti2019035) wurden mit neun Patienten/ Patientinnen (Ti2017001; Ti2017002; Ti2017006; Ti2018009; Ti2018012; Ti2018013; Ti2018014; Ti2018016; Ti2018022) verglichen, die 6 Monate nach der ersten Behandlung immunvermittelte Nebenwirkungen entwickelten. PBMCs von Kontrollpatienten/ -patientinnen wurden vor Behandlungsbeginn und 6-12 Wochen nach der Erstbehandlung analysiert. Um verschiedene Untergruppen von Immunzellen zu identifizieren, wurden die Daten getrennt für T-Zellen und Nicht-T-Zellen durch nicht-supervidiertes Clustering analysiert (s. Abbildung 12B und 13A), gefolgt von einer Signifikanzanalyse von Microarrays (SAM) mit einer False Discovery Rate (FDR)-Grenze von 0,05, wobei irAE-N mit Kontrollpatienten/ -patientinnen (CTL) nach der Behandlung verglichen wurden. (74) Wir stellten keinen signifikanten Unterschied der absoluten Lymphozytenzahlen in den beiden Gruppen fest (mediane Lymphozytenzahlen irAE-N: 1,89/ nl, CTL-Pre: 1,6/ nl, CTL-Post: 1,4/ nl, p=0,86). Angesichts der Tatsache, dass ICI-Zielstrukturen hauptsächlich von T-Zellen exprimiert werden, haben wir uns bei der Untersuchung der Daten zunächst auf T-Zell-Untergruppen konzentriert.

### T-Zellcluster

Patienten/ Patientinnen, die an irAE-N leiden, zeigten eine charakteristische Zunahme von drei verschiedenen T-Zellclustern (#TC1, #TC17, #TC30) im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abbildung 12C), unabhängig vom Meta-Clustering-Ansatz.

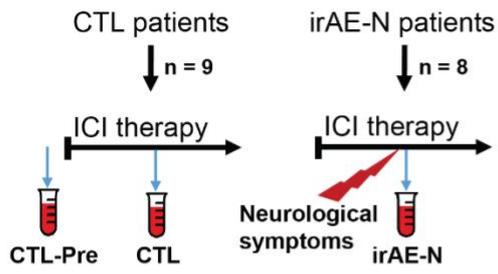
Cluster #TC1 umfasst T-Zellen, die CD4, CD25, FOXP3 und CTLA-4 exprimieren. Es zeigte sich ein 2-facher Anstieg bei irAE-N-Patienten ( $d = -1,86$ ,  $q < 0,0001$ ; s. Abbildung 12C-D).

Die beiden anderen identifizierten T-Zell-Untergruppen sind CD8<sup>+</sup> Zellen (s. Abbildung 12C-E), die jeweils CD28, Tbet und TIGIT exprimieren und entweder CCR4<sup>-</sup> und CXCR3<sup>+</sup> (Cluster #TC30, 3,5-facher Anstieg,  $d = 1,1$ ,  $q < 0,38$ ) oder CCR4<sup>-</sup> und CXCR3<sup>-</sup> (Cluster #TC17, 5,0-facher Anstieg,  $d = 2$ ,  $q < 0,0001$ ) aufweisen.

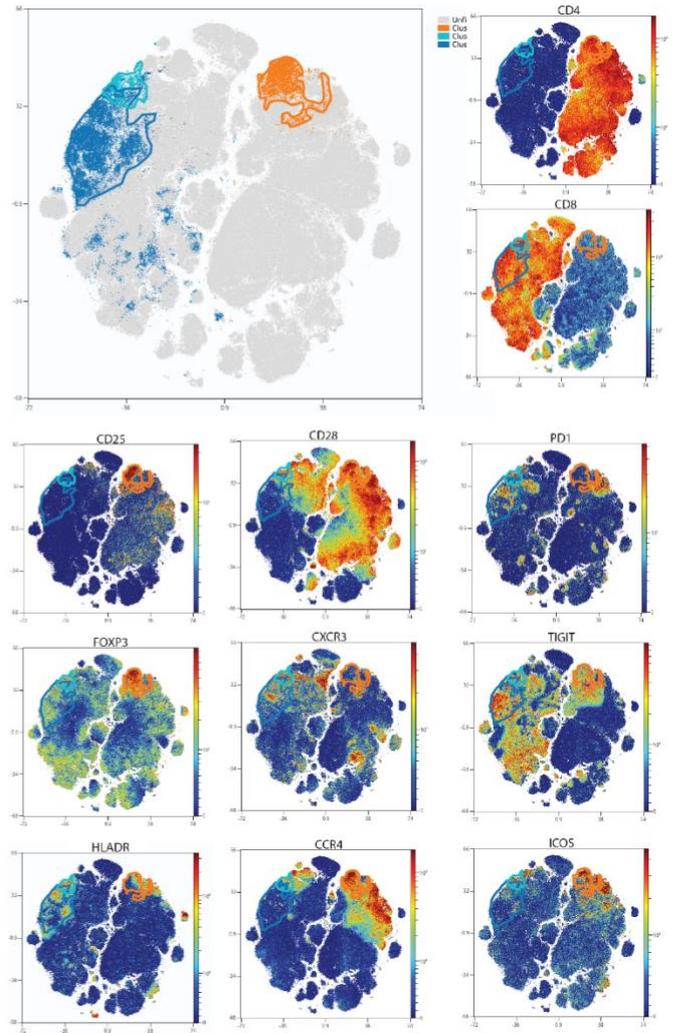
### Andere Zellcluster

Darüber hinaus analysierten wir die Häufigkeit weiterer Zellcluster, darunter die von B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritischen Zellen, Basophilen und Monozyten sowie deren Untergruppen (s. Abbildung 13A-B). Innerhalb dieser Cluster wurden bei irAE-N im Vergleich zu CTL mittels SAM-Analyse nicht-klassische Monozyten (Cluster 19, 4,5 - fache Abnahme,  $d = 1,9$ ,  $q < 0,38$ ) und CD56<sup>+</sup> CD16dim NK-Zellen (Cluster 11, 2 - fache Abnahme,  $d = 1,6$ ,  $q < 0,38$ ) sowie CD27<sup>-</sup> B-Zellen (Cluster 14, 1,7 - fache Abnahme,  $d = 1,4$ ,  $q < 0,38$ ) seltener gefunden (s. Abbildung 13 C-D).

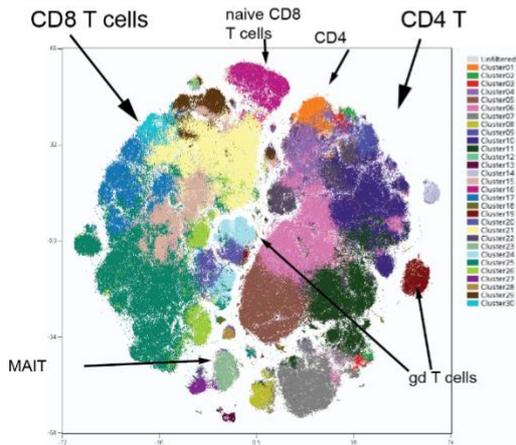
A



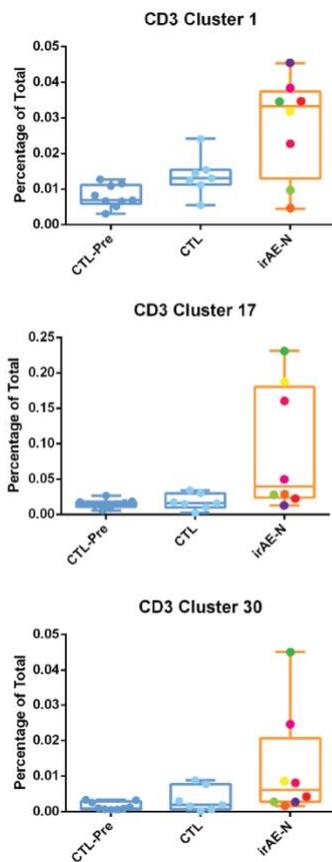
C



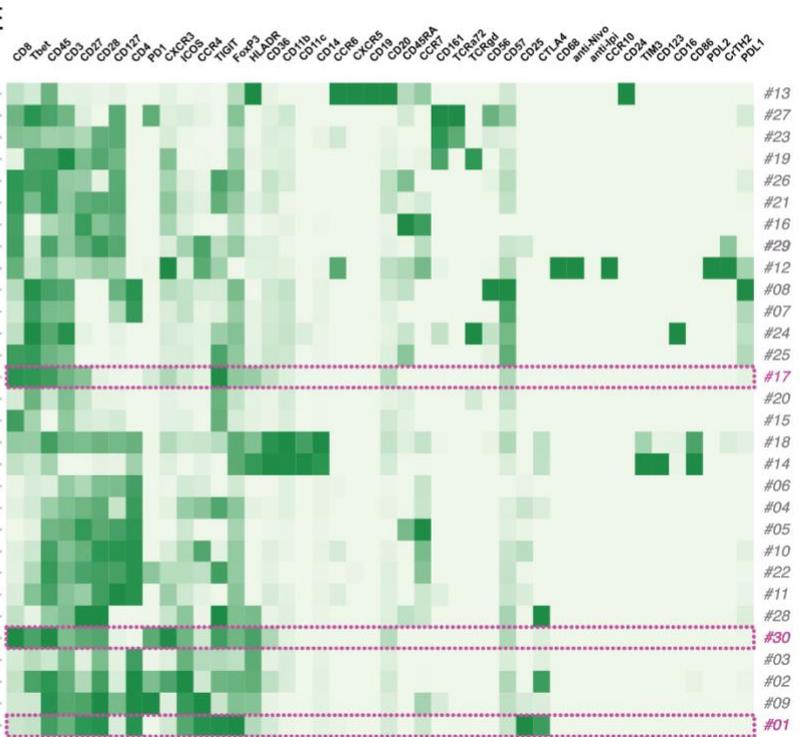
B



D



E



ICI therapy = ICI-Therapie, neurological symptoms = neurologische Symptome, patients = Patienten/ Patientinnen, Percentage of total = Prozentualer Anteil am Ganzen, T cells = T-Zellen

## Abbildung 12: Identifizierung der mit irAE-N assoziierten T-Zell-Populationen

(A) Ablauf und Zeitpunkte der PBMC-Isolierung für die massenzytometrische Untersuchung. (B) opt-SNE-Diagramm der CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Blut. Es sind 30 FlowSOM-Metacluster von T-Zellen angegeben. (C) opt-SNE-Diagramm aus (B), das die drei Cluster #TC1, #TC17 und #TC30 zeigt, welche signifikant häufiger bei irAE-N-Patienten/ Patientinnen im Vergleich zu Kontrollpatienten/ -patientinnen (CTL) nach ICI-Therapie vorkommen (durch SAM-Analyse ermittelt, Signifikanz bei FDR < 0,05). Die kleineren Diagramme zeigen die Expression ausgewählter Marker. Die Positionen der Cluster 1, 17 und 30 sind angegeben. (D) Boxplots mit Häufigkeiten der Cluster #TC1, #TC17 und #TC30 unter den CD3<sup>+</sup>-Zellen. (E) Heatmap, die die normalisierte Markerexpression für alle 30 T-Zell-Cluster zeigt. Die Cluster 1, 17 und 30 sind hervorgehoben. Stärkere Signale sind in einem tieferen Grünton dargestellt.



### Abbildung 13: Identifizierung der mit irAE-N assoziierten CD3<sup>-</sup> Populationen

(A) opt-SNE-Plot von Nicht-T-Zellen im Blut. 30 FlowSOM-Metacluster von Nicht-T-Zellen aus den PBMC werden angegeben. (B) opt-SNE-Diagramm aus (A), das die drei Cluster 11, 14 und 19 zeigt, die mit signifikant unterschiedlicher Häufigkeit bei irAE-N-Patienten/ Patientinnen im Vergleich zu Kontrollpatienten/ -patientinnen nach ICI-Therapie auftreten (durch SAM-Analyse ermittelt, Signifikanz bei  $FDR < 0,05$ ). Die kleineren Diagramme zeigen die Expression ausgewählter Marker. (C) Boxplots mit Häufigkeiten der Cluster 11, 14 und 19 unter den CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> Zellen. (D) Heatmap, die die normalisierte Markerexpression für alle 30 Nicht-T-Zell-Cluster zeigt. Die Cluster 11, 14 und 19 sind hervorgehoben. Stärkere Signale sind in einem tieferen Grünnton dargestellt.

### 3.3 Retrospektive Arbeit

Es wurden 177 Patienten/ Patientinnen identifiziert, für die bis Mai 2018 im Hauttumorzentrum der Charité (HTCC) ICI bestellt wurden. Davon wurden sieben bereits in die TITAN<sup>2</sup>-Studie eingeschlossen. Im Januar 2021 wurde in den elektronischen Patientenakten der 170 Patienten/ Patientinnen nach neurologischen Diagnosen gesucht und, falls diese gelistet waren, deren Ursache in den Arztbriefen nachvollzogen.

Neurologische Beschwerden nach Therapiebeginn wurden bei 40 von 170 (22,53 %) der Patienten/ Patientinnen dokumentiert. Hiervon erhielten zum Zeitpunkt des Auftretens 14 Erkrankte Pembrolizumab, zwölf Erkrankte Nivolumab sowie zwölf Erkrankte eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab und zwei erhielten Ipilimumab. Bei 29 dieser Patienten/ Patientinnen stellen Metastasen bzw. bekannte Vorerkrankungen eine alternative Erklärung für die dokumentierten Beschwerden dar. Einige Patienten/ Patientinnen litten unter mehreren Komplikationen, sodass sich insgesamt 35 neurologische Nebenwirkungen unter Nivolumab bzw. Pembrolizumab, 16 neurologische Nebenwirkungen unter einer Kombinationstherapie und zwei neurologische Nebenwirkungen unter einer Therapie mit Ipilimumab ergaben. Am häufigsten wurden epileptische Anfälle ( $n = 9$ ) dokumentiert, welche jedoch in sieben Fällen mit zerebralen Metastasen einhergingen und darauf zurückgeführt wurden. Weiterhin traten Beschwerden am Bewegungsapparat, wie Muskelschwäche ( $n = 4$ ), Muskelschmerzen ( $n = 2$ ) und motorische Defizite bzw. eine Gangstörung ( $n = 4$ ) auf. Verwirrheitszustände, Orientierungs-, Kognitions-, bzw. Gedächtnisstörungen ( $n = 8$ ) sowie Vigilanzminderungen ( $n = 4$ ) wurden ebenfalls mehrfach dokumentiert. Auch sehr

seltene Erkrankungen, wie die Amyloid-Beta-assoziierte Angiitis oder das Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom, traten bei mit ICI behandelten Patienten/ Patientinnen auf. Bei fünfzehn Patienten/ Patientinnen wurden neben neurologischen Symptomen weitere Autoimmunerkrankungen im zeitlichen Zusammenhang mit der Immuntherapie festgestellt. Insgesamt ließen sich diese bei 57 Betroffenen finden. Die neurologischen und die zusätzlichen autoimmunologischen Beschwerden sowie die Charakteristika der Patienten/ Patientinnen aus der Apothekenbestellung mit neu auftretenden neurologischen Symptomen während ihrer ICI-Therapie können der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Charakteristika der Teilnehmenden aus der retrospektiven Arbeit

<b>Substanz</b>	<b>n</b>	<b>Neurologische Beschwerden</b>	<b>Metastasierung/ Vorerkrankung</b>	<b>Andere autoimmunologische Beschwerden</b>	<b>Zeitpunkt des Auftretens der neurologischen Symptome</b>
<b>Nivolumab</b>	1	Intermittierender Verwirrheitszustand	Autoimmunkolitis-bedingt	Autoimmunkolitis	nach 3. Gabe
	1	Fokaler epileptischer Anfall	kein Nachweis von intrakraniellen Metastasen	-	nach ca. 4 Monaten
	2	Generalisierter epileptischer Anfall	zerebrale Metastasen (1)	-	nach ca. 4 Monaten
	1	Gedächtnisprobleme	unbek.	Rheumatische Ganzkörperschmerzen, Fatigue, intermittierender Juckreiz	nach ca. 4 Monaten
	1	Intrazerebrale Blutung	Metastasen ausgeschlossen	-	ca. 5 Monate nach letzter Gabe
	1	Sehstörung	AMD und Chorioretinitis	Rheumatische Ganzkörper-schmerzen, Fatigue, intermittierender Juckreiz	nach ca. 4 Monaten

1	Schwindel	zerebelläre Metastase	-	nach 12. Gabe
1	Insomnie	unbek.	Gelenkbeschwerden	nach ca. 3 Monaten
1	Amyloid-Beta- assoziierte Angiitis (mnestisches Syndrom, parathymes Lachen, Orientierungsstörung, Vigilanzminderung, Mutismus)	kein Nachweis von intrakraniellen Metastasen	-	nach 22. Gabe
1	Muskelschmerz	Fibromyalgie	Autoimmunkolitis	nach ca. 5 Monaten
2	Muskelschwäche	Fibromyalgie (1)	V.a. Hypophysitis (1), Autoimmunkolitis	nach ca. 5 Monaten; nach 1 Jahr
1	Gangstörung	Ossäre und zerebrale Metastasen	Autoimmunpankreatitis	nach ca. 3 Monaten
1	Motorische Funktionseinschränkung	Sturz	-	nach ca. 6 Monaten
1	Harn-/ Stuhlinkontinenz	zerebrale Metastasen	-	nach ca. 5 Monaten

<b>Pembrolizumab</b>	1	Wernicke- Enzephalopathie	unbek.	-	unbek.
	1	Synkope, Stürze, Desorientiertheit	unbek.	-	nach 5. Gabe
	1	Schwindel	unbek.	-	nach ca. 5 Monaten
	1	Hirnnervenausfall	Infiltration des Sinus cavernosus	-	nach ca. 1 Monat
	1	Vigilanzminderung	zerebrale Metastasen (1)	-	nach ca. 3 Monaten; spätestens nach 1 Monat
	1	Passagere Aphasie	zerebrale Metastase	-	nach ca. 1 Monat
	1	Sehstörungen	unbek.		spätestens nach 9. Gabe
	1	Axonal betonte sensomotorische Neuropathie	Critical-illness PNP bei Intensivpflichtigkeit	Hyperparathyreoidismus, Hypothyreose, Pankreasstörung mit diabetischer Entgleisung	nach ca. 8 Monaten
	2	Verwirrheitszustände	3 Monate nach Intensivpflichtigkeit	Hyperparathyreoidismus, Hypothyreose,	nach ca. 8 Monaten; 7 Tage nach 1. Gabe

		(1), zerebrale Metastasen (1)	Pankreasstörung mit diabetischer Entgleisung	
1	Sonstiger Hirninfarkt	unbek.	-	nach ca. 14 Monaten
1	Restless-Legs-Syndrom	unbek.	Autoimmunkolitis	nach ca. 2 Monaten
1	Meningitis/ Ventrikulitis	zerebrale und zerebelläre Metastasen	-	nach ca. 2 Monaten
1	Orientierungsstörung	zerebrale Metastasen	-	unbek.
1	Dysarthrie	zerebrale Metastasen	-	unbek.
3	Epileptischer Anfall	zerebrale Metastasen (3)	-	nach ca. 2 Monaten; 10 Tage nach 1. Gabe, nach ca. 5 Monaten
1	Harn-/ Stuhlinkontinenz	zerebrale Metastasen	-	nach ca. 1 Monat
<b>Nivolumab + Ipilimumab</b>	1 Dysarthrie	zerebrale Metastase	Autoimmunenterokolitis	nach 1. Gabe

	1	Sehstörung/ Doppelbilder	zerebrale Metastase	-	nach 3. Gabe
	1	Verschlechterung der Kognition	zerebrale Metastase	Autoimmunerokolitis	nach 1. Gabe
	2	Vigilanzminderung	zerebrale Metastase mit Hirnödem (1), Spinalkanalstenose (1)	-	nach ca. 1 Monat
	1	Muskelschmerzen (Nackenschmerzen)	zerebrale Metastase	Autoimmunerokolitis	nach 1. Gabe
	2	Muskelschwäche	zerebrale Metastase	Autoimmunerokolitis (1), Autoimmunhepatitis (1)	nach 1. Gabe
	1	Myositis	unbek.	-	nach ca. 2 Monaten
	3	Epileptischer Anfall	zerebrale Metastase (3) und neurochirurgisch (1)	-	spätestens nach 1 Monat (2)
	1	Neurologisch- motorische Defizite	zerebrale Metastasen	Mukokutane Nebenwirkung bei makulösem	nach ca. 1 Monat

				Hautausschlag und Gingivitis	
	1	Kopfschmerz	unbek.	-	spätestens nach 1 Monat
	1	Lakunärer Mediainfarkt	unbek.	-	nach ca. 11 Monaten
	1	Delir/ HOPS	zerebrale Metastasen	-	nach ca. 9 Monaten
<b>Ipilimumab</b>	1	Dermatomyositis	Paraneoplasie	-	3 Tage nach 2. Gabe
	1	Vogt-Koyanagi-Harada- Syndrom	unbek.	-	nach 1. Gabe

AMD = Altersbedingte Makuladegeneration, HOPS = Hirnorganisches Psychosyndrom, PNP = Polyneuropathie, unbek. = unbekannt, V. a. = Verdacht auf

### 3.4 Zusammenfassung

Um der Frage nach der Häufigkeit, der klinischen Präsentation sowie potenzieller prädiktiver Biomarker neurologischer Nebenwirkungen nach einer Therapie mit ICI nachzugehen, wurde 1) eine Literaturrecherche zu publizierten Fallberichten, 2) die Kohortenstudie TITAN<sup>2</sup> sowie 3) eine retrospektive Identifikation von neurologischen Nebenwirkungen anhand der Apothekenbestellungen des HTCCs durchgeführt.

#### Häufigkeiten

1) Die Literaturrecherche ergab zum Zeitpunkt der Durchführung 42 Publikationen zu insgesamt 112 neurologischen Nebenwirkungen. Davon waren 39 (34,82 %) auf PD-1-Inhibitoren, 55 auf CTLA-4-Inhibitoren (49,11 %) und 11 (9,82 %) auf eine Kombinationstherapie zurückführbar.

2) Zwei der 38 Teilnehmenden der TITAN<sup>2</sup>-Studie (5 %) erlitten irAE-Ns. Davon erhielt ein Patient Nivolumab und eine Patientin eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab.

3) Im Rahmen der retrospektiven Arbeit wurden 40 von 170 Patienten/ Patientinnen (23,53 %) identifiziert, bei denen im Verlauf einer ICI-Therapie neurologische Beschwerden dokumentiert wurden. Davon traten 36 (65,45 %) im zeitlichen Zusammenhang mit einer Therapie mit PD-1-Inhibitoren, zwei (3,64 %) unter CTLA-4-Inhibitoren und 17 (30,91 %) unter einer Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab auf.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Häufigkeiten von irAE-N

	1) Literaturrecherche	2) TITAN <sup>2</sup> -Studie	3) Retrospektive Arbeit
irAE-Ns durch PD-1-Inhibitoren	n = 39 (34,82 %)	n = 1 (50 %)	n = 35 (66,04 %)
irAE-Ns durch CTLA-4-Inhibitoren	n = 55 (49,11 %)	n = 0	n = 2 (3,77 %)
irAE-Ns durch Kombinationstherapie/ Monotherapien in Folge	n = 11 (9,82 %) / n = 6 (5,36 %)	n = 1 (50 %)	n = 16 (30,19 %)

verblindet	n = 1 (0,89 %)	-	-
<b>Gesamt</b>	<b>n = 112</b>	<b>n = 2</b>	<b>n = 53</b>

irAE-Ns = neurological immune-related adverse events; TITAN<sup>2</sup>: Ti2018027, Ti2019035

### Klinische Präsentation

1) In der Literatur fanden sich in 63 Fällen (56,25 %) Nebenwirkungen am zentralen und in 42 Fällen (37,50 %) am peripheren Nervensystem. Hinzu kamen 7 Myopathien (6,25 %).

2) Unter den Teilnehmenden der TITAN<sup>2</sup>-Studie traten ein V.a. Myositis (Ti2017027) und eine faziale Parese (Ti2019035) auf.

3) Retrospektiv wurden 27 irAE-N am zentralen (50,94 %) und 2 irAE-N am peripheren Nervensystem (3,77 %) ermittelt. Weiterhin kam es zu 9 Myopathien (16,98 %) und 15 (28,30 %) nicht eindeutig in diese drei Kategorien zuordenbaren neurologischen Nebenwirkungen.

Tabelle 10: Zusammenfassung der klinischen Präsentation von irAE-N

	1) Literaturrecherche	2) TITAN <sup>2</sup> -Studie	3) Retrospektive Arbeit
Zentrale irAE-Ns	n = 63 (56,25 %)	n = 0	n = 27 (50,94 %)
Periphere irAE-Ns	n = 42 (37,50 %)	n = 1 (50 %)	n = 2 (3,77 %)
Myopathien	n = 7 (6,25 %)	n = 1 (50 %)	n = 9 (16,98 %)
nicht eindeutig zuordenbar*	-	-	n = 15 (28,30 %)
<b>Gesamt</b>	<b>n = 112</b>	<b>n = 2</b>	<b>n = 53</b>

irAE-Ns = neurological immune-related adverse events; TITAN<sup>2</sup>: Ti2018027, Ti2019035

\*Dysarthrie, Gangstörung, Harn-/ Stuhlinkontinenz, Hirnnervenausfall, Insomnie, Motorische Funktionseinschränkung, Schwindel, Sehstörungen, Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom

### Prädiktive Biomarker

Bei diesem Pilotversuch zur Phänotypisierung von Immunzellen mittels Massenzytometrie ließen sich Cluster von Immunzellen identifizieren, die sich bei Patienten/ Patientinnen mit irAE-N sowohl von denen unbehandelter als auch von ICI-behandelter Patienten/ Patientinnen ohne irAE-N unterscheiden. Die in dieser Studie identifizierten mit irAE-N assoziierten Marker umfassen 1) eine erhöhte Anzahl an T-

Zell-Untergruppen mit Epitopen, die typisch für CD4<sup>+</sup> Treg- und aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind, 2) eine reduzierte Anzahl an CD56<sup>+</sup> CD16dim NK-Zellen, 3) eine reduzierte Anzahl an naiven CD27<sup>-</sup> B-Zellen und 4) eine reduzierte Anzahl an nicht-klassischen Monozyten im peripheren Blut von irAE-N Patienten/ Patientinnen. 5) CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Cluster #TC30 in der vorliegenden Studie) nahmen nach ICI-Behandlung bei Kontrollpatienten zu und waren bei irAE-N-Patienten noch stärker erhöht.

Tabelle 11: Zusammenfassung der CyTOF-Ergebnisse

<b>T-Zellcluster</b>	<b>Charakteristika</b>
<b>#TC1</b>	T-Zellen mit folgenden Markern: <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD25-TC</li> <li>- FOXP3-TC</li> <li>- CTLA-4-TC</li> </ul> #TC1 häufiger bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe
<b>#TC17</b>	CD8 <sup>+</sup> TC mit folgenden Markern: <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD28</li> <li>- Tbet</li> <li>- TIGIT</li> <li>- CCR4- CXCR3-</li> </ul> #TC17 häufiger bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe
<b>#TC30</b>	CD8 <sup>+</sup> TC mit folgenden Markern: <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD28</li> <li>- Tbet</li> <li>- TIGIT</li> <li>- CCR4<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup></li> </ul> #TC30 häufiger bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe
<b>Andere Zellcluster</b>	<b>Charakteristika</b>
<b>Monozyten</b>	Nicht-klassische Monozyten seltener bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe
<b>NK-Zellen</b>	CD56 <sup>+</sup> CD16dim NK-Zellen seltener bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe
<b>B-Zellen</b>	CD27 <sup>-</sup> B-Zellen seltener bei irAE-N im Vergleich zur Kontrollgruppe

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung autoimmunvermittelter neurologischer Syndrome

In einer ersten, speziell auf neuromuskuläre Nebenwirkungen fokussierten Studie im deutschsprachigen Raum, wurden Ergebnisse zu 38 Melanompatienten/ -patientinnen veröffentlicht, die in einem Zeitraum von insgesamt 5,5 Jahren während einer Therapie mit ICI an einer Myositis, Myokarditis, Myasthenia gravis, Polymyalgia rheumatica und/ oder Radikuloneuropathie erkrankten oder durch eine asymptotische Erhöhung des CK-Spiegels auffielen. Die meisten dieser Nebenwirkungen waren schwerwiegend (49 % Grad 3 – 4) und es wurde von zwei Todesfällen (5 %) aufgrund einer Myositis bzw. Myositis mit begleitender Myokarditis berichtet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich immunvermittelte neuromuskuläre Nebenwirkungen in ihrer Präsentation stark von ihren idiopathischen Pendanten unterscheiden und im Vergleich häufiger lebensbedrohlich sein können. (120) Die immunvermittelte Myositis (immune-related myositis, irMyositis) tritt laut FDA bzw. EMA in weniger als 1 % bzw. selten ( $\geq 1/10.000$  bis  $< 1/1.000$ ) unter einer Therapie mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab auf. (32, 121) Dies gilt laut FDA zwar auch für Pembrolizumab, in der Produktinformation der EMA ist sie jedoch als häufige Nebenwirkung ( $\geq 1/100$  bis  $1/10$ ) aufgelistet und endete für einen Patienten in der KEYNOTE-054-Studie tödlich. (32, 48, 121) Gelegentlich ( $\geq 1/1.000$  bis  $< 1/100$ ) bzw. in weniger als 1 % der Fälle tritt diese Nebenwirkung auch unter einer Therapie mit dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab und unter einer Therapie mit den PD-L1-Inhibitoren Avelumab und Atezolizumab auf. (30, 33, 34, 53, 56, 122) Muskuloskelettaler Schmerz stellt bei einigen Substanzklassen mit  $\geq 20$  % eine der häufigsten Nebenwirkungen (47, 53, 56, 121) bzw. mit 2.4 – 3 % eine der häufigsten Grad 3 – 4 Nebenwirkungen dar (56, 121).

In einer von Touat et al. durchgeführten retrospektiven Studie wurde diskutiert, dass es sich bei der irMyositis möglicherweise um eine neue Krankheitsentität handelt. Sechs von zehn untersuchten Patienten/ Patientinnen entwickelten eine irMyositis, die sie durch gemeinsame klinisch-pathologische Merkmale charakterisieren konnten. Zusammenfassend waren dies: (1) Symptombeginn während der ersten zwei Monate der Behandlung mit raschem Fortschreiten der Symptomschwere; (2) Myalgie in Assoziation mit axialer, Gliedergürtel- und okulomotorischer Schwäche; (3) starker Anstieg des CK-Spiegels, verbunden mit pathologischen Ergebnissen in der elektrophysiologischen Untersuchung; (4) Nicht-Vorhandensein von anti-AChR und

Myositis-assoziierten Autoantikörpern; (5) einzigartiges Muster von entzündlichen und nekrotischen Veränderungen in der Skelettmuskelbiopsie; und (6) signifikante klinische Verbesserung nach Therapiepause und Behandlung mit Kortikosteroiden. (123) Vier von sechs Patienten/ Patientinnen dieser Studie entwickelten zusätzlich eine Myokarditis, welche auf Grundlage eines Echokardiogramms oder MRTs diagnostiziert wurde. (123) In immunvermittelten Myopathien wird der PD-1-Signalweg durch dysfunktionale T-Zellen beeinflusst. Bei der irMyositis zeichnen sich diese durch eine vermehrte Expression von PD-1, LAG-3 (Lymphozyten-Aktivierungsgen 3) und TIM-3 (T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne-3) aus und dringen in den Skelettmuskel ein. Gleichzeitig regulieren sie die Muskelfasern PD-L1 und PD-L2 hoch und stimulieren somit die PD-1-Expression. (124)

## 4.2 Interpretation der eigenen Ergebnisse

### Häufigkeiten

Aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten können keine sicheren Inzidenzen berechnet werden. Anhand der durchgeführten Literaturrecherche, Kohortenstudie sowie retrospektiven Auswertung schätzen wir die Inzidenz immunvermittelter neurologischer Nebenwirkungen nach einer Therapie mit ICI auf 5 (TITAN<sup>2</sup>) - 23 (retrospektive Arbeit) %. Dem MedDRA (Medizinisches Wörterbuch für Aktivitäten im Rahmen der Arzneimittelzulassung, engl. Medical Dictionary for Regulatory Activities) entsprechend treten sie demnach „häufig“ bis „sehr häufig“ auf. Aufgrund der geringen Größe der untersuchten Stichprobe besteht jedoch eine sehr hohe Unsicherheit (s. Kapitel 4.3 Limitationen).

### Klinische Präsentation

Die Literaturrecherche bot einen ersten Einblick in die Vielfältigkeit neurologischer Nebenwirkungen nach einer Therapie mit ICI. Mithilfe der TITAN<sup>2</sup>-Studie sollten diese unter kontrollierten Bedingungen besser beobachtet werden. Im Verlauf der Studie zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Lebensqualität der Studienteilnehmenden gemessen am Karnofsky-Index. Im Median blieb dieser in den ersten beiden Visiten bei 90 % (fähig zu normaler Aktivität, kaum oder geringe Symptome), sank nach 6 Monaten lediglich auf 80 % (normale Aktivität mit Anstrengung möglich, deutliche Symptome), um nach 12 Monaten wieder auf 90 %

anzusteigen. Hingegen stieg der globale Gesundheitszustand bzw. die Lebensqualität gemessen am EORTC-QLQ-C30 im Verlauf der Therapie, nämlich zwischen der ersten und zweiten Verlaufsuntersuchung, an und blieb bis zum Studienende auf diesem Niveau. Auch die Depressivität nahm im Verlauf der Studie ab. Nur ein Patient erreichte den für das Vorliegen einer depressiven Episode sprechenden Summenwert von  $\geq 12$ , nämlich 18. Dieser wurde zur V0 erreicht und bei den nächsten Verlaufsuntersuchungen deutlich unterschritten (8 Punkte zur V2 und 9 Punkte zur V3). Es lässt sich vermuten, dass möglichen Nebenwirkungen in der Gesamtbewertung der Therapie durch die Studienteilnehmenden weniger Bedeutung in Hinblick auf die Lebensqualität, den globalen Gesundheitszustand und die Depressivität beigemessen werden. Die anhand des EORTC-QLQ-C30 gemessene Funktionalität der Studienteilnehmenden zeigte zur ersten Verlaufsuntersuchung nach 6 Wochen eine Besserung und sank zur letzten Verlaufsuntersuchung nach 12 Monaten ungefähr auf das Ausgangsniveau ab. Die anhand dieses Fragebogens ermittelte Symptomatik der Patienten/ Patientinnen zeigte denselben Verlauf. Gesondert wurde das Symptom Fatigue anhand des EORTC-FA12 ermittelt, welches ein ähnliches Muster aufwies. Die Fatigue nahm zu den Visiten 1 und 2 ab und stieg nach 12 Monaten wieder an. Im Median war sie nach 6 Monaten am geringsten und zu Beginn und Ende der Studie am höchsten ausgeprägt. Weiterhin wurde die Gedächtnisleistung zu Beginn und zum Ende der Studie am niedrigsten und zur ersten Verlaufsuntersuchung nach 6 Wochen am höchsten selbsteingeschätzt. Ursächlich könnte ein zunächst gutes Ansprechen der ICI sein, welches im Verlauf einsetzenden Nebenwirkungen bzw. einem zunehmenden Tumorprogress weicht. Eine Erklärung für die anfänglich stärker ausgeprägte Fatigue könnte bei einer noch nicht eingeleiteten Therapie die Tumor-assoziierte Fatigue bieten. Dasselbe Symptom könnte auch zum Studienende durch ein Überwiegen der Nebenwirkungen bzw. der Folgen des Tumorprogresses entstehen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu wissen, wann ICI ihre höchste Wirksamkeit erreichen. Bisher eingesetzte Wirksamkeitskriterien wie RECIST (engl. Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) wurden ursprünglich für die Evaluation von Chemotherapien entwickelt, bei denen eine Verkleinerung der Tumormasse mit dem Therapieansprechen korreliert. Dies berücksichtigt jedoch nicht die Tatsache, dass bei gezielten Krebstherapien oftmals das Gesamtüberleben verbessert wird, ohne, dass die Tumormasse sich verkleinert. (125) Neue Wirksamkeitskriterien werden derzeit diskutiert. (125) Anhand

unserer Beobachtungen lässt sich die Vermutung anstellen, dass die Wirksamkeit in Bezug auf die genannten Parameter nach ca. 6 Wochen am höchsten ist und daher die Beschwerden der Teilnehmenden zu dieser Zeit am geringsten ausgeprägt sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Allgemeinzustand und die Lebensqualität, die Depressivität, die Funktionalität und die Symptomatik inklusive Fatigue sowie die Gedächtnisleistung in dieser Kohorte nicht durch die Therapie mit ICI verschlechtert wurden.

Mittels PNP-Fragebogen wurden Beschwerden abgefragt, die auf eine Polyneuropathie hindeuten können. Dem Violinen-Plot lässt sich entnehmen, dass diese im Verlauf der Studie zunahmten. Klinisch wies Ti2019035 eine faziale Parese ohne elektrophysiologisches Korrelat auf. Ti2018027 berichtete zudem über eine Muskelschwäche und Schmerzen in den Beinen, die nach Absetzen der ICI sistierten. Eine Pallhypästhesie wurde bei 3 Teilnehmenden (Ti2018012; Ti2018013; Ti2018034) nach 6 Wochen und bei 3 Teilnehmenden (Ti2017006; Ti2018015; Ti2020052) nach 6 Monaten erstmals festgestellt. Bei Ti2018034 und Ti018012 wurden zudem zur V1 bzw. zur V2 erstmals abgeschwächte Achillessehnenreflexe beobachtet. Diese wurden bei Ti2018034 zur V3 nicht mehr als abgeschwächt bewertet, daher könnte es sich um einen untersuchungsbedingten Befund gehandelt haben. Auch elektrophysiologisch konnten bei einigen Teilnehmenden im Verlauf neuropathische Symptome festgestellt werden. So wies Ti2018013 eine axonale Nervenschädigung des N. suralis auf. Weiterhin wurde eine axonale Nervenschädigung von Ti2018016 und Ti2020050 zur V2 erstmals festgestellt. Eine in der V2 diagnostizierte gemischte Nervenschädigung von Ti2020051 war bereits in der V0 aufgefallen. Jedoch war die verminderte NLG des N. suralis sowie des N. ulnaris nicht reproduzierbar und es zeigte sich stattdessen eine neue Amplitudenminderung des N. peroneus. Alternativ zu irAE-N könnte sie untersuchungsbedingt aufgetreten sein. Die zur V3 nicht mehr reproduzierbaren auffälligen Befunde von Ti2018034 wurden auf die Beinödeme und den vorbekannten Diabetes mellitus zurückgeführt.

Bekannt ist, dass verschiedene Zytostatika Neuropathien auslösen können. Besonders hohe Inzidenzen werden bei Antikörperkonjugaten, Platinkomplexen, Proteaseinhibitoren, Taxanen und Vinca-Alkaloiden festgestellt. (126) Diese sog. CIPN (engl. chemotherapy-induced peripheral neuropathy, Chemotherapie-induzierte periphere Neuropathien) haben einen überwiegend sensorischen oder sensomotorischen Charakter und manifestieren sich innerhalb der ersten sechs Zyklen

bzw. in den ersten 6 Monaten einer Chemotherapie. (127) In der Vergangenheit wurde außerdem gezeigt, dass die Kombination von Chemotherapien mit ICI das Risiko für höhergradige Neuropathien im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie erhöhen. (128) Dies steht im Einklang mit der Beobachtung aus den Fallberichten peripherer Neuropathien nach ICI-Therapie. In unserer Studie haben wir ebenfalls einen Anstieg neuropathischer Symptome 6 Monate nach Therapiebeginn festgestellt. Dieser Symptombeginn stellt eine interessante Gemeinsamkeit von CIPN und irAE-N dar, zumal aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen dieser Therapeutika unterschiedliche Pathomechanismen der Nervenschädigungen zu vermuten sind. Mithilfe von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten bisher einerseits Gene identifiziert werden, die in Zusammenhang mit CIPN bei unterschiedlichen Chemotherapeutika stehen. Zusätzlich fand man auch relevante Gene für einzelne Angriffspunkte der Nervenschädigung, z.B. für die Nervenentwicklung und Neuronenausdehnung (FOXC1 und ITGA1), für Schmerz-signalisierende Neurotransmitter (TAC1), für das Neuritenwachstum (EPHA5 und FZD3), für die Neurodegeneration (VAC14) und für die zelluläre Struktur (CEP72). (129) Obwohl den irAE-N aufgrund ihres Wirkmechanismus andere Ursachen als den CIPN zugrunde liegen, können diese Kenntnisse dazu beitragen, die immunvermittelte Nervenschädigung besser zu verstehen. In Zukunft sollten GWAS dazu genutzt werden, analog zu CIPN Gene zu identifizieren, die in direktem Zusammenhang mit irAE-N stehen. Sie hätten das Potential als Prädiktoren für die Ausbildung dieser Nebenwirkungen genutzt zu werden.

Anhand der retrospektiven Arbeit wurden 40 Patienten/ Patientinnen mit neurologischen Symptomen während ihrer ICI-Therapie identifiziert. Jedoch gab es bei 29 (72,5 %) eine alternative Erklärung für diese Symptomatik wie z.B. zerebrale Metastasen bei fortgeschrittenem Tumor. Fraglich bleibt, ob diese 29 Fälle tatsächlich irAE-N darstellen oder andere Ursachen haben. Da der Fokus bei der Dokumentation dieser Symptome möglicherweise nicht auf der Erfassung immunvermittelter Nebenwirkungen lag und die Daten nicht immer vollständig und einheitlich erhoben wurden, könnten erheblich Informationslücken entstanden sein. Nichtsdestotrotz lässt sich feststellen, dass bei einem Großteil der Patienten/ Patientinnen neurologische Beschwerden während ihrer Therapie vorlagen.

Es stellt sich die Frage, wie mit auftretenden irAE-Ns umgegangen werden soll, da sie oftmals einen Therapieabbruch für die Betroffenen bedeuten. Strategien zur

Behandlung dieser seltenen Nebenwirkungen sind etabliert worden. Sie umfassen die Gabe hochdosierter i.v. Steroide mit der Möglichkeit zur Eskalation auf die Gabe von Ivig bzw. der Durchführung einer Plasmapherese. (62) Zum aktuellen Zeitpunkt kann eine Therapie mit ICI laut EMA so lange durchgeführt werden, wie ein klinischer Nutzen besteht oder bis die Behandlung nicht mehr vertragen wird. (30, 32) Neben der Entwicklung von prädiktiven Biomarkern stellen kürzere Therapiezyklen einen Ansatz zur Begrenzung möglicher (neurologischer) Nebenwirkungen dar. Einige Publikationen legen nahe, dass Patienten/ Patientinnen, die eine Therapie mit ICI aufgrund von irAEs abbrechen, vergleichbare Therapieerfolge wie Patienten/ Patientinnen, die die Therapie nicht abbrechen, erzielen bzw. sogar länger überleben können. Zurückgeführt wird dies auf die Theorie, dass bei diesen Patienten/ Patientinnen eine stärkere Immunreaktion ausgelöst wird. Bestärkt wird diese durch die Beobachtung, dass der Therapieerfolg bei einigen Erkrankten auch nach Beendigung der ICI-Gabe anhielt. (130) Eine bessere Eingrenzung der Therapiedauer könnte die Erkrankten in Zukunft vor irAE schützen.

### Biomarker

Für die Suche nach potenziellen prädiktiven Biomarkern führten wir mittels CyTOF eine Phänotypisierung von Immunzellen durch. Da die Zielstrukturen von ICIs hauptsächlich von T-Zellen exprimiert werden, lag bei der Analyse der massenzytometrischen Daten der Fokus auf der Untersuchung der T-Zellcluster. Zudem betrachteten wir weitere Zellcluster, darunter Monozyten, NK-Zellen und B-Zellen.

### **T-Zellcluster**

Aktivierte CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Treg

#TC1 stellt einen Phänotyp dar, der typisch für CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) ist. (75, 131) Cluster #TC17 und #TC30 sind typisch für aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. (75) Aktivierte zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren u. A. CTLA-4-Rezeptoren, welche CD4<sup>+</sup> Helfer- und regulatorische T-Zellen modulieren und somit die T-Zellaktivierung hemmen. (18) Das Auftreten des Treg-Clusters (#TC1) scheint in unseren Untersuchungen der auffälligste Befund zu sein. Fünf von acht irAE-N-Patienten zeigten das höchste Aufkommen von Cluster 1 in der Gesamtstudie im Vergleich zu 9 Kontrollen vor und 7 während der ICI-Behandlung. Diese Tendenz

wurde auch für #TC17 beobachtet, hier zeigten vier irAE-N die höchsten Frequenzen. Die Ergebnisse für #TC30 wurden jedoch durch eine beträchtliche Variabilität innerhalb der Probanden/ Probandinnen in den Cluster-Frequenzen überlagert. Die Annahme, dass eine Verringerung von regulatorischen T-Zellen zu einer gestörten Regulation der Autoimmunität führt, wurde bei Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 und Multipler Sklerose bestätigt und steht unserer Beobachtung einer Zunahme von CD4<sup>+</sup> Treg (Cluster #TC1) bei Patienten/ Patientinnen mit irAE-N, entgegen. (132) In Studien anderer Autoimmunerkrankungen, wie systemischem Lupus Erythematoses und rheumatoider Arthritis, waren die Befunde jedoch variabler, sodass sich eine große Heterogenität innerhalb Treg-vermittelter Syndrome vermuten lässt. (132-135)

### **CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

CXCR3<sup>+</sup> ist ein Rezeptorprotein, das an der Oberfläche von T-Zellen vorkommt und die Anhäufung sowie die sog. Bystander-Aktivierung, also die rezeptorunabhängige und zytokinabhängige Aktivierung von Gedächtnis CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ermöglicht. Seine Liganden werden an Orten der frühen Immunaktivierung exprimiert. (136) CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind typisch für aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren in unserer Studie festgestellte Erhöhung nach ICI-Behandlung bestätigte frühere Beobachtungen. (137) Eine exzessive Zytotoxizität durch Bystander-aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann inflammatorisch und immunpathologisch wirken und somit vermutlich auch irAE-Ns hervorrufen. (138)

### **Weitere Zellcluster**

#### **CD56<sup>+</sup> CD16dim NK-Zellen**

Eine wichtige Untergruppe von menschlichen NK-Zellen stellen CD56<sup>+</sup>CD16dim dar. Sie können mittels Zytokinproduktion sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beeinflussen. Nach ihrer Aktivierung wirken sie zytotoxisch auf aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen und entfalten somit eine suppressive Wirkung ähnlich der von regulatorischen T-Zellen. (139) In der Vergangenheit ist berichtet worden, dass zirkulierende CD56<sup>+</sup> Zellen ihre Expression von CD16 und PD-1 nach einer ersten Behandlung mit Ipilimumab erhöhten. (140) Die von uns hingegen gemessene und für reife NK-Zellen typische Abnahme von CD56<sup>+</sup> CD16dim NK-Zellen wurde auch bei anderen entzündlichen Zuständen wie Sepsis berichtet. (141, 142). Zudem geht auch das Fortschreiten der Erkrankung bei

Immunsupprimierten, wie HIV-infizierten Menschen, mit einer Abnahme von CD56<sup>+</sup> NK-Zellen einher. (143) Die Zunahme von CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wiederum wurde bei Patienten/ Patientinnen im Anschluss einer MS-Therapie mit Daclizumab bzw. IFN- $\beta$  beobachtet und war mit einem guten Therapieansprechen assoziiert. (144, 145) Somit stehen diese Berichte in Einklang mit unserer Beobachtung und es lässt sich vermuten, dass eine Abnahme von CD56<sup>+</sup> NK-Zellen mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems einhergeht.

### **Naive CD27- B-Zellen**

B-Zellen lassen sich anhand ihrer IgD- und CD27-Expression in die folgenden Untergruppen einteilen: IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (naive B-Zellen), IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel), IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (Gedächtnis-B-Zellen mit Klassenwechsel) und IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (doppelnegative) B-Zellen. (146) Die Rolle doppelnegativer B-Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird postuliert, dass sich dahinter eine Art erschöpfte Gedächtnis-B-Zelle ohne die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Replikation verbirgt, welche im Alter bzw. bei verschiedenen chronisch-entzündlichen Zuständen vermehrt auftritt. (146-148) Ihre Zunahme wurde auch bei neurologischen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose gesehen. (149) Bei Patienten/ Patientinnen mit Myasthenia gravis fand sich bei der Immunphäotypisierung von Gedächtnis-B-Zellen neben der Vermehrung doppelnegativer ein Rückgang der naiven IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen. (150) Letzteren stellten wir auch in unserer Studie fest. Meffre et al. berichteten, dass Patienten/ Patientinnen mit Autoimmunerkrankungen an Defekten in der frühen B-Zell-Toleranz litten, welche auf eine veränderte B-Zell-Rezeptor-Signalübertragung und dysregulierte T-Zellen zurückgeführt werden könne. Dies führe entgegen unserer Beobachtung zur Ansammlung autoreaktiver naiver B-Zellen, welche durch Antigenpräsentation an die T-Zellen zu einer gesteigerten Autoreaktivität führten. (151) Sie spekulierten des Weiteren, dass eine Therapie mit ICI eine Störung der B-Zell-Toleranz bewirken und diese Patienten/ Patientinnen dadurch anfällig für immunvermittelte Symptome machen würde. Eine interessante Überlegung ist demzufolge die Blockade von B-Zellen als therapeutische Strategie zur Verhinderung von irAEs bei ICI-behandelten Tumorpatienten/-patientinnen. (151, 152)

## **Nicht-klassische Monozyten**

Monozyten lassen sich in drei Untergruppen einteilen. Während klassische Monozyten phagozytär ohne inflammatorische Kennzeichen wirken, zeigen nicht-klassische Monozyten entzündliche Eigenschaften bei ihrer Aktivierung und tragen Merkmale für die Antigenpräsentation. Der intermediäre Subtyp weist sowohl phagozytäre als auch entzündliche Funktionen auf. Anhand ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 lassen sie sich zudem in CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> (klassische), CD14<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> (nicht-klassische) und CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (intermediäre) einteilen. (153) CD16<sup>+</sup> Monozyten scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu spielen. So wurde bereits eine Zunahme dieser Zellen in Erkrankungen wie Sarkoidose, rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, Sjögren Syndrom, Asthma und Immunthrombozytopenie beobachtet. (154-160) Sie spielen zudem eine funktionelle Rolle in neurologischen Erkrankungen wie der MS. (160) Die von uns beobachtete reduzierte Anzahl von nicht-klassischen Monozyten bei Patienten/ Patientinnen mit irAE-N zeigte sich auch bei therapienaiven Patienten/ Patientinnen mit schubförmig remittierender Multiplen Sklerose. Die Ursachen ordneten die Autoren der genannten Studie als sekundär ein, z.B. durch eine unzureichende Rekrutierung der Monozyten aus dem Knochenmark oder einem unausgewogenen Differenzierungsprozess dieser Zellen. Auch die Verlagerung von CD16<sup>+</sup> Monozyten aus der Peripherie zu den Orten des Entzündungsgeschehens, wie die Ergebnisse dieser Forschungsgruppe es nahelegten, stellt eine Erklärung für unsere Beobachtung dar. (160)

## **4.3 Limitationen**

Zwar stellen Fallberichte einen wichtigen Eckpfeiler für die Veröffentlichung neuer Arzneimittelnebenwirkungen dar, jedoch können durch sie keine Aussage zu Inzidenzen getroffen werden. (161) Daher diene dieser erste Schritt der Beschreibung von Manifestationsformen der irAE-N. Zur Quantifizierung dieser Nebenwirkungen werden prospektive Kohortenstudien, wie TITAN<sup>2</sup>, durchgeführt. Da ein Großteil unserer Studienteilnehmenden aus dem Hauttumorzentrum der Charité rekrutiert wurde, an dem onkologische Patienten/ Patientinnen mit komplexen Krankheitsbildern und vielfältigen Komorbiditäten behandelt werden, ist von einem Selektionsbias auszugehen. Möglicherweise ist unsere Stichprobe daher nicht repräsentativ für die Gesamtheit der für diese Substanzen in Frage kommenden Patienten/ Patientinnen.

Besser wäre eine multizentrische Untersuchung, die beispielsweise auch Erkrankte in peripheren Häusern oder in onkologischen Niederlassungen einschließen würde. Zudem ist von einem Non-Response- bzw. Reporting-Bias auszugehen, d.h. unsere Studienergebnisse wurden dadurch verzerrt, dass Teilnehmende, denen es besonders schlecht erging, wahrscheinlich auch aus der Studie ausstiegen, da diese eine zusätzliche Belastung für sie bedeutete. Somit könnten der Allgemeinzustand und die Lebensqualität sowie die übrigen untersuchten Qualitäten der Patienten/ Patientinnen während der Therapie überschätzt worden sein. Weiterhin kam es zu Fallzahlproblemen, da es sich bei neurologischen Nebenwirkungen einer ICI-Therapie insgesamt um seltene Ereignisse, die zum damaligen Zeitpunkt auf 3-10 % der Fälle geschätzt wurde, handelt. Es wurde angestrebt mindestens 10 Patienten/ Patientinnen mit irAE-N zu erfassen. Bei einer Drop-Out-Rate von 12,5 % wurde daher der Einschluss von 200 Erkrankten in einem Rekrutierungszeitraum von zwei Jahren geplant. Dieses Ziel wurde nicht erreicht. Ein Großteil der Visiten konnte zudem aufgrund von organisatorischen Hindernissen bzw. einer hohen Drop-Out-Rate von bis zu 43,3 % (Fragebogen „ zur Gedächtnisleistung“) nicht in dem geplanten Ausmaß realisiert werden, was die Interpretation der Studienergebnisse verzerrt und weswegen eine deskriptive Darstellung der erhobenen Daten vorgenommen wurde. Ursächlich könnte die lange Visitendauer, die die Bearbeitung von 5 Fragebögen, eine Blutentnahme, eine körperliche sowie eine elektrophysiologische Untersuchung, beinhaltete, sein. In einer weiteren Studie könnte dies durch eine Reduktion der zu untersuchenden Items umgangen werden, z.B. indem man nur Fragebögen ausfüllen lässt. Dies hätte wiederum eine weniger ausführliche Datenerfassung zur Folge. Alternativ könnte mehr Studienpersonal eine parallele Untersuchung ermöglichen und somit den Zeitaufwand für die Erkrankten reduzieren.

Während der körperlichen und elektrophysiologischen Untersuchung sowie bei der Zellisolation kann es weiterhin zu einem Informationsbias im Sinne von Erhebungs- bzw. Messfehlern gekommen sein. Um diese Gefahr zu minimieren, haben wir standardisierte Messinstrumente verwendet, z.B. beim Ausfüllen der Fragebögen dasselbe iPad, bei der elektrophysiologischen Untersuchung denselben Computer und im Labor die etablierte SOP. Noch besser wäre es gewesen, immer die gleichen Untersucher zu gewährleisten; dies war uns bei der elektrophysiologischen Untersuchung leider nicht möglich.

In Betracht zu ziehen ist bei Beobachtungsstudien außerdem eine Verzerrung durch Störgrößen. Beispielsweise könnten bereits bestehende Risikofaktoren für eine neurologische Erkrankung sog. Confounder darstellen. Risikofaktoren für eine Polyneuropathie sind unter anderem ein bereits bestehender Diabetes mellitus, Alkoholabusus, oder berufsbedingt beispielsweise durch Exposition zu Lösungsmitteln und Schwermetallen. Neurologische Beschwerden können außerdem durch zerebrale Filiae der Tumorerkrankung ausgelöst werden. Im Rahmen der TITAN<sup>2</sup>-Studie wurde diese Problematik dementsprechend zu Beginn der Studie adressiert, indem demografische Daten erhoben und Vorerkrankungen sowie vorherige Therapien (insbesondere Chemotherapien und Bestrahlungen) und Medikationen abgefragt wurden. Einige Risikofaktoren, wie beispielsweise die Mangelernährung oder paraneoplastische Syndrome, die es insbesondere bei Tumorpatienten/ -patientinnen zu beachten gilt, sind schwieriger zu ermitteln. Als Confounder bzw. alternative Erklärung für die faziale Parese unserer Studienpatientin Ti2018035 würde eine idiopathische Form, wie sie in 60-75 % der Fälle auftritt, in Frage kommen. (162) Auch eine virale oder bakterielle Infektion bzw. deren Reaktivierung (z. B. Neuroborreliose, Zoster) sind mögliche Differentialdiagnosen/ Confounder für das Auftreten einer fazialen Parese, welche laborchemisch nicht ausgeschlossen wurden. Auch die Symptome einer Myositis bei Ti2018027 könnten im Rahmen eines paraneoplastischen Geschehens oder einer Virusinfektion (z.B. Coxsackie) aufgetreten sein. Die Laborwerte dieses Patienten waren zum Zeitpunkt der Beschwerden blande.

Die Isolation der PBMCs wurde innerhalb von 2 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt. Dies bedeutete einen großen organisatorischen Aufwand und begrenzte den zeitlichen Rahmen für die übrigen Untersuchungen der Studienvsiten. Künftig würde eine geeignete Lagerung und Sammlung der Blutprobe eine enorme Prozessoptimierung bedeuten. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Massenzytometrie standen außerdem keine PBMCs von irAE-N-Patienten vor Beginn der ICI-Therapie zur Verfügung. Das Kollektiv aus der Nebenwirkungskohorte stellt sich zudem sehr uneinheitlich dar, da die Patienten/ Patientinnen zu unterschiedlichsten Zeitpunkten rekrutiert wurden. Angesichts des seltenen Auftretens von irAE-N müssten mehr als 600 Patienten prospektiv untersucht werden, um eine vergleichbare Anzahl von irAE-N-Ereignissen zu erhalten. Wir wählten daher in dieser Teilarbeit ein fallkontrollähnliches Studiendesign.

Auch die retrospektive Arbeit ist Limitationen unterlegen. So ist hierbei nur ein zeitlicher Zusammenhang, jedoch keine Kausalität nachweisbar. Des Weiteren unterscheidet sich die Informationsqualität zwischen den einzelnen Patienten/ Patientinnen zum Teil erheblich. Während bei einigen sowohl in den Papierakten als auch in der elektronischen Akte vollständige Verlaufsdokumentationen und ausführliche Arztbriefe sowohl die Grunderkrankung als auch die auftretenden Beschwerden beschrieben, war bei anderen Erkrankten wenig Information in denselben Quellen zu finden. Dies könnte zu einer Fehleinstufung der dokumentierten Beschwerden geführt haben. Hinzu kommt, dass nicht alle Patienten/ Patientinnen bei neurologischen Beschwerden einem Neurologen/ einer Neurologin vorgestellt wurden bzw. oftmals kein neurologisches Konsil vorlag, sodass die Symptome eventuell schon vor dieser Analyse fehlinterpretiert worden sind. In Zukunft sollten neurologische Beschwerden fachspezifisch beurteilt werden, d.h. alle Erkrankte mit V.a. neurologische Nebenwirkungen sollten fachärztlich vorgestellt werden. Andererseits kann es sein, dass bei Patienten/ Patientinnen mit neurologischen Vorerkrankungen bzw. zerebralen Metastasen verstärkt auf neurologische Symptome geachtet wurde. Zwar ist es sehr wahrscheinlich, dass ihre Beschwerden auf diese Komorbiditäten rückführbar sind, jedoch ist dies nicht zwangsweise der Fall. Zumindest sollte in Betracht gezogen werden, dass auch neurologisch Vorerkrankte zusätzlich irAE-N entwickeln können, welche ggf. anders zu therapieren sind.

#### **4.4 Bisher veröffentlichte Studien**

Nach unserem Kenntnisstand stellt unsere Studie die bisher erste prospektiv-klinische Studie zu neurologischen Nebenwirkungen unter einer Therapie mit ICI dar. Jedoch sind andere Autoren und Autorinnen dieser Fragestellung mithilfe anderer Studientypen bereits nachgegangen. In einer in der JAMA Neurology publizierten retrospektiven Kohortenstudie wurden Daten von 347 Patienten/ Patientinnen der Mayo Clinic in Minnesota, die von Ende 2014 bis Mai 2016 mit einem PD-1-Inhibitor behandelt wurden, erfasst und ausgewertet. Dabei wurde die modifizierte Rankin-Skala für die Schweregradeinteilung genutzt und Ergebnisse von elektrophysiologischen Messungen miteinbezogen. Insgesamt wurden zehn Patienten/ Patientinnen (2,9 %) mit neurologischen Nebenwirkungen identifiziert. (163) Wie in unserer Studie treten hier irAE-N also „häufig“ auf. An derselben Klinik wurden unter 654 Patienten/ Patientinnen, die eine Therapie mit PD-1-Inhibitoren erhielten,

fünf Patienten/ Patientinnen (0,7 %) identifiziert, die währenddessen Myopathien erlitten. (164) Insgesamt stellt dies ein sehr viel größeres Patienten-/Patientinnenkollektiv dar als in unserer Studie. Allerdings handelt es sich hierbei um eine reine retrospektive Auswertung. Von Vorteil ist, dass es sich bei TITAN<sup>2</sup> um eine klinisch-prospektive Studie handelt, welche es erlaubt, Kausalitäten nachzuvollziehen. Die kleine Kohorte wurde insofern versucht auszugleichen, indem weitere Quellen, wie die Fallberichte und die retrospektive Analyse des Kollektivs aus der Apothekenbestellung in diese Arbeit einbezogen wurden. Weiterhin wurde in unserer Studie eine Vielfalt an Modalitäten (Fragebögen, Klinik, Funktionsdiagnostik, PBMCs) untersucht, sodass sie ein breiteres Spektrum an potenziellen Nebenwirkungen erfasst und verschiedene Aspekte neurologischer Beschwerden abdeckt.

In einer von Rogiers et al. veröffentlichten Studie von 2020 wurde wie in unserer Studie eine Kombination aus Fragebögen und objektiven Parametern genutzt, um die Langzeitfolgen von irAE nach Ipilimumab bei Melanompatienten/ -patientinnen zu untersuchen. (165) Die in dieser ebenfalls monozentrischen Studie rekrutierte Studienpopulation mit 17 Melanom-Erkrankten im medianen Alter von 57 Jahren (Spannweite 33-86 Jahren) ist mit unserer Kohorte vergleichbar. Der Endpunkt unterscheidet sich von dem unserer Studie, da hier die Langzeitfolgen von irAE und nicht deren Neuauftreten untersucht wurden. Dementsprechend unterscheiden sich auch die Methodiken. In dieser Studie wurden sog. „Überlebende“ untersucht, die definiert wurden als krankheitsfrei für mindestens 2 Jahre nach Beginn der Ipilimumab-Therapie. Sie wurden aus der Datenbank zweier prospektiven Studien identifiziert. Neben dermatologischen und gastrointestinalen Beschwerden gehörten eine Pneumonitis, eine Sarkoidose, Fatigue-Symptomaten, Grippe-ähnliche Syndrome sowie Hypophysitiden und ein Guillain-Barré-Syndrom zu den untersuchten irAEs. Es wurde eine Baseline und eine Verlaufsuntersuchung nach 12 Monaten durchgeführt. In dieser Studie wurde ebenfalls der EORTC QL-C30 verwendet sowie Fragebögen bezüglich Depression, Fatigue und subjektiver Einschränkung der Kognition. Der Cogstate Battery Test wurde benutzt, um objektiv die neurokognitive Funktion auszuwerten. In Hinblick auf den EORTC QLQ-C30 zeigte sich in dieser Studie kein Unterschied verglichen mit der Allgemeinbevölkerung. Symptome einer Depression wurden bei 9, Fatiguesymptomatik bei 7 von 17 Teilnehmenden festgestellt. 3 von 7 berichteten eine Verschlechterung der selbsteingeschätzten Kognition. All diese Werte blieben stabil im Rahmen des 1-Jahres-Follow-Ups. Bis auf die Erwähnung eines

Patienten mit einer behandelten Depression ist nicht bekannt, ob die Studienteilnehmenden vor ihrer Ipilimumab-Therapie bereits an Vorerkrankungen diesbezüglich litten. Diese Studie unterstreicht, wie wichtig es ist, insbesondere Patienten/ Patientinnen, die unter neuroendokrinen und neurologischen irAEs nach einer ICI-Therapie gelitten haben, langfristig zu betreuen.

Auch potenzielle Biomarker für irAE-N wurden in der Vergangenheit bereits versucht zu identifizieren. In einer retrospektiven Studie untersuchten Daly et al. computertomografisch die Skelettmuskulatur von Patienten/ Patientinnen, welche mit Ipilimumab behandelt wurden und fanden einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten Muskelmasse bzw. Sarkopenie und dem Auftreten von Nebenwirkungen, darunter auch neurologische Symptome. (166) Fong et al. stellten entgegen ihrer Erwartung eine größere Diversifizierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten/ Patientinnen, die irAEs entwickelten im Vergleich zu nebenwirkungsfreien Patienten/ Patientinnen fest. (167) Eine retrospektive Multizenterstudie mit 156 Patienten/ Patientinnen ergab, dass die absoluten Eosinophilenzahlen signifikant mit dem Auftreten von irAE assoziiert ist ( $p=0,032$  bzw.  $p=0,007$ ). Angesichts der Tatsache, dass diese auch mit erhöhten Interleukin-17-Werten in Zusammenhang stehen, sind zwei Untersuchungen hervorzuheben, die dieses Zytokin auch als möglichen Biomarker untersuchten. (168) In einer Studie mit 52 Patienten/ Patientinnen von Callahan et al. konnte eine Assoziation der Dynamik von Interleukin-17-Spiegeln mit gastrointestinalen Nebenwirkungen gefunden und eine derartige Korrelation auch von Tarhini et al. beschrieben werden. (169) Eine Beteiligung von Interleukin-17 an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist seit einigen Jahren bekannt. (170) Ebenfalls im Zusammenhang mit gastrointestinalen irAEs wurde in zwei Phase-II-Studien mit insgesamt 162 Patienten/ Patientinnen zu drei definierten Zeitpunkten Vollblutproben mittels Genexpressionsanalyse nach potenziellen Biomarkern untersucht. Dabei wurde eine Erhöhung der Neutrophilen-Aktivierungsmarker CD177 und CEACAM1 festgestellt. (171) Während die meisten Forschungsgruppen einen Fokus auf die Untersuchung des peripheren Bluts legten, untersuchten Berman et al. auch Gewebeproben der gastrointestinalen Mukosa nach veränderten Antikörperspiegeln und Zellinfiltrationen. Zwar konnten sie keinen zuverlässigen prädiktiven Biomarker für die Entstehung von gastrointestinalen Nebenwirkungen ausfindig machen, doch auch ihre Untersuchungen legen nahe, dass es sich hierbei um eigenständige Krankheitsentitäten handeln könnte. (172)

Tabelle 12: Diskutierte Biomarker für irAEs unter ICI-Therapie

Untersucher Parameter	Substanz	Art der Nebenwirkung	Zeitpunkt seit Therapiebeginn	Ref.
Reduzierte Muskelmasse	Ipilimumab	Schwäche der unteren Extremitäten, Neuropathie, Ataxie	vor Therapiebeginn	(166)
Diversifizierung des T-Zell- Repertoires	Ipilimumab	nicht spezifiziert	innerhalb von zwei Wochen	(167)
Neutrophile Granulozyten in Gewebeproben	Ipilimumab	Gastrointestinale Nebenwirkungen	nach ein bis zwei Wochen	(172)
CD177- und CEACAM1- Genexpression	Ipilimumab	Gastrointestinale Nebenwirkungen	nach drei und elf Wochen	(171)
Eosinophile Granulozyten	Ipilimumab	nicht spezifiziert	nach sieben Wochen	(173)
Interleukin-17	Ipilimumab	Diarrhö/ Kolitis	nach sechs Wochen	(169)
Interleukin-17	Ipilimumab	Kolitis	nach sieben und zwölf Wochen	(174)

Ref. = Referenz

#### 4.5 Ausblick

Aufgrund der Alterung der Gesellschaft steigt die Gesamtzahl der Krebserkrankungen in der Bevölkerung an. Für das Jahr 2020 wurden in Deutschland 510.000 neue Erkrankungsfälle erwartet; im Jahr 2016 waren es noch rund 492.000 Neudiagnosen. Solide Tumoren stellen den Großteil dieser Erkrankungen dar. (175, 176) Eine im Mai 2019 veröffentlichte Querschnittsstudie ergab, dass schätzungsweise 43,62 % der US-amerikanischen Krebspatienten/ -patientinnen im Jahr 2018 für eine Therapie mit ICI in Frage kamen. Im Vergleich dazu waren es 2011, im Jahr der Erstzulassung, 1,54

%. (177) Es ist davon auszugehen, dass die Anwendungsgebiete von ICI erweitert werden und demzufolge die Anzahl der mit diesen Medikamenten behandelten Patienten/ Patientinnen zukünftig steigen wird. (178) Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist die große Bandbreite neurologischer Nebenwirkungen nach einer Therapie mit ICI. Sie betreffen nicht nur das zentrale oder periphere Nervensystem, sondern auch die motorische Endplatte und Muskulatur. Sie werden nicht selten von weiteren immunvermittelten Syndromen begleitet. Schätzungsweise treten sie in 5 - 23 % der Fälle auf. Von besonderer Bedeutung ist das Register zur Erfassung unerwünschter Arzneimittelwirkungen unter einer Therapie mit ICI. Eine Auswertung bisheriger Eintragungen stellte die erste wissenschaftliche Arbeit im deutschsprachigen Raum speziell zu neuromuskulären Nebenwirkungen dar. (120) Diese sollte in Zukunft für künftige retrospektive Analysen von irAE-N genutzt werden. Durch die Immunprofilierung mittels Massenzytometrie konnte eine eindeutige Immunzellsignatur gefunden werden, die mit neurologischen Nebenwirkungen nach einer Behandlung mit ICI assoziiert ist. In Zukunft bedarf es weiterer Studien zur Validierung und Evaluierung des klinischen Nutzens dieser potenziellen Biomarker. Dies trägt zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie bei und liefert erste Erkenntnisse zur Entwicklung eines Biomarkers für die Diagnose als auch zur Überwachung von neurologischen Nebenwirkungen bei der Therapie. Letztendlich kann dies auch zur Optimierung der Substanzen bzw. deren Einsatzes beitragen und so die Prognose der Patientinnen und Patienten entscheidend verbessern.

## 5. Literaturverzeichnis

1. European-Medicines-Agency. Yervoy 2020. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yervoy#authorisation-details-section>. (letzter Zugriff: 17.03.2020)
2. Huang P-W, Chang JW-C. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. Biomedical Journal. 2019.
3. Zentrum-für-Krebsregisterdaten. Malignes Melanom der Haut 2019. URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom\\_inhalt.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_inhalt.html). (letzter Zugriff: 17.12.2019)
4. European-Medicines-Agency. Yervoy EPAR assessment report 2011. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yervoy-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yervoy-epar-public-assessment-report_en.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
5. Serrone L, Zeuli M, Segal F, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. Journal of experimental clinical cancer research: CR. 2000.
6. European-Medicines-Agency. Opdivo EPAR assessment report 2015. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/opdivo-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/opdivo-epar-public-assessment-report_en.pdf). (letzter Zugriff: 18.03.2020)
7. Luce JK, Thurman WG, Isaacs BL, Talley RW. Clinical trials with the antitumor agent 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide(NSC-45388). Cancer chemotherapy reports. 1970:119-24.
8. Hill GJ, Moss SE, Golomb FM, Grage TB, Fletcher WS, Minton JP, Kremenz ET. DTIC and combination therapy for melanoma: III. DTIC (NSC 45388) Surgical Adjuvant Study COG Protocol 7040. Cancer. 1981;47(11):2556-62.
9. Falkson G, Van der Merwe A, HC F. Clinical experience with 5-(3, 3-bis (2-chloroethyl)-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide (NSC-82196) in the treatment of metastatic malignant melanoma. Cancer chemotherapy reports. 1972.
10. Onkologie L. S3-Leitlinie Melanom - LL\_Melanom\_Langversion\_3.2 2019. URL: [https://derma.de/leitlinien/leitlinien/detail/news/malignes-melanom-2019-version-32/index.php?eID=tx\\_securedownloads&p=1054&u=0&g=0&t=1584564355&hash=0745a99239604fbc7e43bf87e893890cb0dd8a2a&file=/fileadmin/derma/1\\_d](https://derma.de/leitlinien/leitlinien/detail/news/malignes-melanom-2019-version-32/index.php?eID=tx_securedownloads&p=1054&u=0&g=0&t=1584564355&hash=0745a99239604fbc7e43bf87e893890cb0dd8a2a&file=/fileadmin/derma/1_d)

erma.de\_WebRoot/Aerzte/Leitlinien/LL\_Melanom\_Langversion\_3.2.pdf. (letzter Zugriff: 17.03.2020)

11. Ginex PK, Brassil K, Ely B. Immunotherapy: Exploring the state of the science. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2017;21.
12. Leach D, Krummel M, Allison J. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-6.
13. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urba WJ, Robert C, O'Day SJ, Hoos A, Humphrey R, Berman DM. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1291(1):1.
14. Abbott M, Ustoyev Y, editors. *Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy*. Seminars in oncology nursing; 2019: Elsevier.
15. Gasparri ML, Ruscito I, Taghavi K, Farooqi AA, Papadia A, Focaccetti C, Barnaba V, Panici PB, Mueller MD. *The Immunobiology of Cancer: From Tumor Escape to Cancer Immunoediting Towards Immunotherapy in Gynecologic Oncology. Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements*: Springer; 2017. p. 193-204.
16. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*. 1996;14(1):233-58.
17. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2017;43(3):604-11.
18. Pardoll D, editor *Cancer and the immune system: basic concepts and targets for intervention*. Seminars in oncology; 2015: Elsevier.
19. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006;313(5795):1972-5.
20. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.

21. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:561.
22. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(8):561-84.
23. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
25. Abrams SI, Khleif SN, Bergmann-Leitner ES, Kantor JA, Chung Y, Hamilton JM, Schlom J. Generation of stable CD4+ and CD8+ T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations. *Cellular immunology*. 1997;182(2):137-51.
26. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2016:1-8.
27. Martin-Liberal J, de Olza MO, Hierro C, Gros A, Rodon J, Tabernero J. The expanding role of immunotherapy. *Cancer treatment reviews*. 2017;54:74-86.
28. Shen M, Ren X. Highlights on immune checkpoint inhibitors in non–small cell lung cancer. *Tumor Biology*. 2017;39(3):1010428317695013.
29. Dyck L, Mills KH. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European journal of immunology*. 2017;47(5):765-79.
30. European-Medicines-Agency. INN-ipilimumab 2011. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
31. European-Medicines-Agency. INN-pembrolizumab 2011. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
32. European-Medicines-Agency. INN-nivolumab 2015. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)

33. European-Medicines-Agency. INN-atezolizumab 2019. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecentriq-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
34. European-Medicines-Agency. INN-avelumab 2019. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/bavencio-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/bavencio-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
35. European-Medicines-Agency. INN-durvalumab 2019. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfizi-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imfizi-epar-product-information_de.pdf). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
36. Fessas P, Lee H, Ikemizu S, Janowitz T. A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. *Seminars in oncology*. 2017;44(2):136-40.
37. Drugs.com. FDA Approves Yervoy for Late-Stage Melanoma 2011. URL: <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-yervoy-late-stage-melanoma-2569.html#moreResources>. (letzter Zugriff: 17.03.2020)
38. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
39. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Jr., Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2517-26.
40. Kähler KC, Hassel JC, Heinzerling L, Loquai C, Mössner R, Ugurel S, Zimmer L, Gutzmer R, Onkologie fdKKNdAD. Nebenwirkungsmanagement bei Immun-Checkpoint-Blockade durch CTLA-4-und PD1-Antikörper beim metastasierten Melanom. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2016;14(7):662-83.

41. Ribas A, Kefford R, Marshall MA, Punt CJ, Haanen JB, Marmol M, Garbe C, Gogas H, Schachter J, Linette G, Lorigan P, Kendra KL, Maio M, Trefzer U, Smylie M, McArthur GA, Dreno B, Nathan PD, Mackiewicz J, Kirkwood JM, Gomez-Navarro J, Huang B, Pavlov D, Hauschild A. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(5):616-22.
42. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992;11(11):3887-95.
43. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang X-T, Huang H, Feingersh D, Garcia C, Wu Y, Kuhne M, Srinivasan M. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer immunology research*. 2014;2(9):846-56.
44. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbe C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine*. 2015;372(4):320-30.
45. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, Hoeller C, Khushalani NI, Miller WH, Jr., Lao CD, Linette GP, Thomas L, Lorigan P, Grossmann KF, Hassel JC, Maio M, Sznol M, Ascierto PA, Mohr P, Chmielowski B, Bryce A, Svane IM, Grob JJ, Krackhardt AM, Horak C, Lambert A, Yang AS, Larkin J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(4):375-84.
46. Hunig T. The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(5):317-8.
47. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Keytruda 2020. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/125514s066lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/125514s066lbl.pdf). (letzter Zugriff: 18.03.2020)

48. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, Haydon A, Lichinitser M, Khattak A, Carlino MS, Sandhu S, Larkin J, Puig S, Ascierto PA, Rutkowski P, Schadendorf D, Koornstra R, Hernandez-Aya L, Maio M, van den Eertwegh AJM, Grob JJ, Gutzmer R, Jamal R, Lorigan P, Ibrahim N, Marreaud S, van Akkooi ACJ, Suci S, Robert C. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2018;378(19):1789-801.
49. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, Dalle S, Schenker M, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Grob JJ, Butler MO, Middleton MR, Maio M, Atkinson V, Queirolo P, Gonzalez R, Kudchadkar RR, Smylie M, Meyer N, Mortier L, Atkins MB, Long GV, Bhatia S, Lebbe C, Rutkowski P, Yokota K, Yamazaki N, Kim TM, de Pril V, Sabater J, Qureshi A, Larkin J, Ascierto PA. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2017;377(19):1824-35.
50. Mullard A. FDA approves first immunotherapy combo. *Nature Publishing Group*; 2015.
51. Shoushtari AN, Friedman CF, Navid-Azarbaijani P, Postow MA, Callahan MK, Momtaz P, Panageas KS, Wolchok JD, Chapman PB. Measuring Toxic Effects and Time to Treatment Failure for Nivolumab Plus Ipilimumab in Melanoma. *JAMA Oncology*. 2018;4(1):98-101.
52. Cuzzubbo S, Javeri F, Tissier M, Roumi A, Barlog C, Doridam J, Lebbe C, Belin C, Ursu R, Carpentier AF. Neurological adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: Review of the literature. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2017;73:1-8.
53. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Tecentriq 2018. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/761034s010lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761034s010lbl.pdf). (letzter Zugriff: 25.03.2020)
54. Powles T, Durán I, Van Der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, Oudard S, Retz MM, Castellano D, Bamias A. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2018;391(10122):748-57.

55. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, Gadgeel SM, Hida T, Kowalski DM, Dols MC. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. 2017;389(10066):255-65.
56. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Bavencio 2017. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/761049s003lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761049s003lbl.pdf). (letzter Zugriff: 25.03.2020)
57. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Imfinzi 2018. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/761069s002lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761069s002lbl.pdf). (letzter Zugriff: 26.03.2020)
58. Drugs.com. FDA Approves Bavencio (avelumab) for Metastatic Merkel Cell Carcinoma 2017. URL: <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-bavencio-avelumab-metastatic-merkel-cell-carcinoma-4502.html>. (letzter Zugriff: 26.03.2020)
59. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *Journal of biomedical informatics*. 2009;42(2):377-81.
60. REDCap. About – REDCap. URL: <https://projectredcap.org/about/>. (letzter Zugriff: 17.03.2020)
61. Health Blo. BIH Biomedical Academy - REDCap Advanced - Aktuelles 2019. URL: <https://www.bihealth.org/de/aktuell/bih-biomedical-academy-redcap-advanced/>. (letzter Zugriff: 17.03.2020)
62. Knauss S, Ginesta Roque L, Hühnchen P, Heinzerling L, Böhmerle W, Endres M. Neurologische Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren. *Der Nervenarzt*. 2019;90(2):138-47.
63. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, Filiberti A, Flechtner H, Fleishman SB, de Haes J. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(5):365-76.

64. Fayers P, Aaronson NK, Bjordal K, Sullivan M. EORTC QLQ–C30 scoring manual: European Organisation for Research and Treatment of Cancer; 1995.
65. Forkmann T, Böcker, M., Wirtz, M., Norra, C., Gauggel, S. Rasch-basiertes Depressionsscreening: PsydiX.org; 2010. URL: <https://psydix.org/psychologische-testverfahren/desc/>. (letzter Zugriff: 08.03.2022)
66. GraphPad-Guides. Violin plots 2022. URL: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/user-guide/graphing-box-and-whisker-and-v.htm>. (letzter Zugriff: 03.10.2022)
67. Heck S, Bishop CJ, Ellis RJ. Immunophenotyping of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Mass Cytometry. *Single Cell Methods*: Springer; 2019. p. 285-303.
68. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical chemistry*. 2009;81(16):6813-22.
69. Budzinski L, Schulz AR, Baumgart S, Burns T, Rose T, Hirseland H, Mei HE. Osmium-labeled microspheres for bead-based assays in mass Cytometry. *The Journal of Immunology*. 2019;202(10):3103-12.
70. Fluidigm-Technical-Note. Normalization of Mass Cytometry Data Using EQ Four Element Calibration Beads 2021. URL: [file:///C:/Users/Lorena/AppData/Local/Temp/\(400237\)+Data+Normalization+Guide\\_CyTOF+SW+v6.7.pdf](file:///C:/Users/Lorena/AppData/Local/Temp/(400237)+Data+Normalization+Guide_CyTOF+SW+v6.7.pdf). (letzter Zugriff: 14.06.2021)
71. Chevrier S, Crowell HL, Zanotelli VR, Engler S, Robinson MD, Bodenmiller B. Compensation of signal spillover in suspension and imaging mass cytometry. *Cell Systems*. 2018;6(5):612-20. e5.
72. Bagwell CB, Inokuma M, Hunsberger B, Herbert D, Bray C, Hill B, Stelzer G, Li S, Kollipara A, Ornatsky O, Baranov V. Automated Data Cleanup for Mass Cytometry. *Cytometry Part A*. 2020;97(2):184-98.
73. Brodie TM, Tosevski V. High-Dimensional Single-Cell Analysis with Mass Cytometry. *Current protocols in immunology*. 2017;118:5.11.1-5..25.
74. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, Saeys Y. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A*. 2015;87(7):636-45.

75. Belkina AC, Ciccolella CO, Anno R, Halpert R, Spidlen J, Snyder-Cappione JE. Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. *Nature communications*. 2019;10(1):1-12.
76. OMIQ. OMIQ Data Science Platform2021. URL: <file:///C:/Users/Lorena/AppData/Local/Temp/omiq-cytometry-analysis-tutorial-1.pdf>. (letzter Zugriff: 14.04.2021)
77. GraphPad-Guides. Box and whiskers graphs 2021. URL: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/user-guide/box-and-whiskers.htm>. (letzter Zugriff: 03.10.2022)
78. Carl D, Grüllich C, Hering S, Schabet M. Steroid responsive encephalopathy associated with autoimmune thyroiditis following ipilimumab therapy: a case report. *BMC Research Notes*. 2015;8.
79. Conry RM, Sullivan JC, Nabors LB, 3rd. Ipilimumab-induced encephalopathy with a reversible splenic lesion. *Cancer immunology research*. 2015;3(6):598-601.
80. Stein MK, Summers BB, Wong CA. Meningoencephalitis following ipilimumab administration in metastatic melanoma. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2015;350.
81. Larkin J, Chmielowski B, Lao CD. Neurologic serious adverse events associated with nivolumab plus Ipilimumab or nivolumab alone in advanced melanoma, including a case series of encephalitis. *Oncologist*. 2017;22.
82. Leitinger M, Varosanec MV, Pikijsa S. Fatal necrotizing encephalopathy after treatment with nivolumab for squamous non-small cell lung cancer: case report and review of the literature. *Frontiers of Immunology*. 2018;9.
83. Salam S, Lavin T, Turan A. Limbic encephalitis following immunotherapy against metastatic malignant melanoma. *BMJ case reports*. 2016;2016.
84. Schneider S, Potthast S, Komminoth P. PD-1 checkpoint inhibitor associated autoimmune encephalitis. *Case Report Oncology*. 2017;10.
85. Spain L, Walls G, Julve M. Neurotoxicity from immune-checkpoint inhibition in the treatment of melanoma: a single centre experience and review of the literature. *Annals of Oncology*. 2016;28.
86. Bossart S, Thurneysen S, Rushing E. Case report: encephalitis, with brainstem involvement, following checkpoint inhibitor therapy in metastatic melanoma. *Oncologist*. 2017;22.

87. Bot I, Blank CU, Boogerd W, Brandsma D. Neurological immune-related adverse events of ipilimumab. *Practical neurology*. 2013;13(4):278-80.
88. Voskens CJ, Goldinger SM, Loquai C. The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the Ipilimumab network. *PLoS ONE*. 2013;8.
89. Tchapyjnikov D, Borst AJ. Immune-related Neurological Symptoms in an Adolescent Patient Receiving the Checkpoint Inhibitor Nivolumab. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2017;40(7):286-8.
90. Abdallah AO, Herlopian A, Ravilla R. Ipilimumab-induced necrotic myelopathy in a patient with metastatic melanoma: a case report and review of literature. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2016;22.
91. Murphy KP, Kennedy MP, Barry JE. New-onset mediastinal and central nervous system sarcoidosis in a patient with metastatic melanoma undergoing CTLA4 monoclonal antibody treatment. *Oncology Research and Treatment*. 2014;37.
92. Liao B, Shroff S, Kamiya-Matsuoka C, Tummala S. Atypical neurological complications of ipilimumab therapy in patients with metastatic melanoma. *Neuro-Oncology*. 2014;16(4):589-93.
93. Maurice C, Schneider R, Kiehl TR. Subacute CNS demyelination after treatment with nivolumab for melanoma. *Cancer immunology research*. 2015;3.
94. Zhu X, McDowell MM, Newman WC. Severe cerebral edema following nivolumab treatment for pediatric glioblastoma: case report. *Journal of Neurosurgery - Pediatrics*. 2017;19.
95. Bouffet E, Larouche V, Campbell BB. Immune checkpoint inhibition for hypermutant glioblastoma multiforme resulting from germline biallelic mismatch repair deficiency. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34.
96. Mandel JJ, Olar A, Aldape KD, Tremont-Lukats IW. Lambrolizumab induced central nervous system (CNS) toxicity. *Journal of the neurological sciences*. 2014;344(1-2):229-31.
97. Papavasileiou E, Prasad S, Freitag SK, Sobrin L, Lobo A-M. Ipilimumab-induced Ocular and Orbital Inflammation—A Case Series and Review of the Literature. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2015;00(00):1-7.
98. Chen YH, Liu FC, Hsu CH, Chian CF. Nivolumab-induced myasthenia gravis in a patient with squamous cell lung carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96.

99. Gonzalez NL, Puwanant A, Lu A. Myasthenia triggered by immune checkpoint inhibitors: new case and literature review. *Neuromuscular Disorders*. 2017;27.
100. Johnson DB, Saranga-Perry V, Lavin PJM. Myasthenia gravis induced by ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33.
101. Kimura T, Fukushima S, Miyashita A. Myasthenic crisis and polymyositis induced by one dose of nivolumab. *Cancer Sci*. 2016;107.
102. Lau KHV, Kumar A, Yang IH, Nowak RJ. Exacerbation of myasthenia gravis in a patient with melanoma treated with pembrolizumab. *Muscle Nerve*. 2016;54.
103. Loochtan AI, Nickolich MS, Hobson-Webb LD. Myasthenia gravis associated with ipilimumab and nivolumab in the treatment of small cell lung cancer. *Muscle Nerve*. 2015;52.
104. Nguyen BHV, Kuo J, Budiman A. Two cases of clinical myasthenia gravis associated with pembrolizumab use in responding melanoma patients. *Melanoma Research*. 2017;27.
105. Polat P, Donofrio PD. Myasthenia gravis induced by nivolumab therapy in a patient with non–small-cell lung cancer. *Muscle Nerve*. 2016;54.
106. Sciacca G, Nicoletti A, Rampello L. Benign form of myasthenia gravis after nivolumab treatment. *Muscle Nerve*. 2016;54.
107. Shirai T, Sano T, Kamijo F. Acetylcholine receptor binding antibody-associated myasthenia gravis and rhabdomyolysis induced by nivolumab in a patient with melanoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2016;46.
108. Zhu J, Li Y. Myasthenia gravis exacerbation associated with pembrolizumab. *Muscle Nerve*. 2016;54(3):506-7.
109. Zimmer L, Goldinger SM, Hofmann L. Neurological, respiratory, musculoskeletal, cardiac and ocular side-effects of anti-PD-1 therapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2016;60.
110. Gaudy-Marqueste C, Monestier S, Franques J. A severe case of ipilimumab-induced guillain-barre syndrome revealed by an occlusive enteric neuropathy: a differential diagnosis for ipilimumab-induced colitis. *Journal of Immunotherapy*. 2013;36.
111. Schneiderbauer R, Schneiderbauer M, Wick W. PD-1 antibody-induced Guillain-Barre syndrome in a patient with metastatic melanoma. *Acta Dermato-Venereologica*. 2017;97.

112. Tanaka R, Maruyama H, Tomidokoro Y. Nivolumab-induced chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy mimicking rapid-onset Guillain-Barré syndrome: a case report. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2016;46.
113. Wilgenhof S, Neyns B. Anti-CTLA-4 antibody-induced Guillain-Barre syndrome in a melanoma patient. *Annals of Oncology*. 2011;22.
114. de Maleissye M-F, Nicolas G, Saiag P. Pembrolizumab-Induced Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *The New England journal of medicine*. 2016;375:296-7.
115. Bompaire F, Mateus C, Taillia H. Severe meningo-radiculo-neuritis associated with ipilimumab. *Invest New Drugs*. 2012;30.
116. Thaipisuttikul I, Chapman P, Avila EK. Peripheral neuropathy associated with ipilimumab: a report of 2 cases. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2015;38(2):77-9.
117. Sakai K, Mochizuki H, Mochida K. A case of nivolumab-induced severe mononeuropathy multiplex and rhabdomyolysis. *Case Report Medicine*. 2017;2017.
118. Bhatia S, Huber BR, Upton MP, Thompson JA. Inflammatory enteric neuropathy with severe constipation after ipilimumab treatment for melanoma: a case report. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2009;32(2):203-5.
119. Johnson DB, Balko JM, Compton ML. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. *The New England journal of medicine*. 2016;375.
120. Moreira A, Loquai C, Pföhler C, Kähler KC, Knauss S, Heppt MV, Gutzmer R, Dimitriou F, Meier F, Mitzel-Rink H. Myositis and neuromuscular side-effects induced by immune checkpoint inhibitors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2019;106:12-23.
121. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Opdivo 2018. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/125554s058lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125554s058lbl.pdf). (letzter Zugriff: 12.06.2018)
122. US-Food-and-Drug-Administration. Highlights of prescribing information - Yervoy 2011. URL: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/125377s073lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/125377s073lbl.pdf). (letzter Zugriff: 19.03.2020)

123. Touat M, Maisonobe T, Knauss S, Ben Hadj Salem O, Hervier B, Auré K, Szwebel T-A, Kramkimel N, Lethrosne C, Bruch J-F, Laly P, Cadranel J, Weiss N, Béhin A, Allenbach Y, Benveniste O, Lenglet T, Psimaras D, Stenzel W, Léonard-Louis S. Immune checkpoint inhibitor-related myositis and myocarditis in patients with cancer. *Neurology*. 2018;91(10):e985-e94.
124. Knauss S, Preusse C, Allenbach Y, Leonard-Louis S, Touat M, Fischer N, Radbruch H, Mothes R, Matyash V, Böhmerle W. PD1 pathway in immune-mediated myopathies: Pathogenesis of dysfunctional T cells revisited. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2019;6(3):e558.
125. Borcoman E, Nandikolla A, Long G, Goel S, Le Tourneau C. Patterns of response and progression to immunotherapy. *American Society of clinical oncology*. 2018;38:169-78.
126. Boehmerle W, Huehnchen P, Endres M. Neurologische Nebenwirkungen von Zytostatika. © Georg Thieme Verlag KG; 2014. p. 21-34.
127. Wang M, Cheng HL, Lopez V, Sundar R, Yorke J, Molassiotis A. Redefining chemotherapy-induced peripheral neuropathy through symptom cluster analysis and patient-reported outcome data over time. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1151.
128. Tian Y, Gao A, Wen Q, Wang S, Zhang S, Yang X, Su G, Sun Y. Immune-related neurological toxicities of PD-1/PD-L1 inhibitors in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:3279.
129. Zajączkowska R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6):1451.
130. Marron TU, Ryan AE, Reddy SM, Kaczanowska S, Younis RH, Thakkar D, Zhang J, Bartkowiak T, Howard R, Anderson KG. Considerations for treatment duration in responders to immune checkpoint inhibitors. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2021;9(3).
131. Georgiev P, Charbonnier L-M, Chatila TA. Regulatory T cells: the many faces of Foxp3. *Journal of clinical immunology*. 2019;39(7):623-40.
132. Long SA, Buckner JH. CD4+ FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *The journal of immunology*. 2011;187(5):2061-6.
133. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+ CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2007;178(4):2579-88.

134. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debré P, Piette J-C, Gorochoy G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2005;175(12):8392-400.
135. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*. 2003;33(1):215-23.
136. Maurice NJ, McElrath MJ, Andersen-Nissen E, Frahm N, Prlic M. CXCR3 enables recruitment and site-specific bystander activation of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature communications*. 2019;10(1):1-15.
137. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang N-AA, Andrews MC, Sharma P, Wang J, Wargo JA, Pe'er D. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. *Cell*. 2017;170(6):1120-33. e17.
138. Crosby EJ, Clark M, Novais FO, Wherry EJ, Scott P. Lymphocytic choriomeningitis virus expands a population of NKG2D<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that exacerbates disease in mice coinfecting with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*. 2015;195(7):3301-10.
139. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56<sup>bright</sup> NK cells: an update. *The Journal of Immunology*. 2016;196(7):2923-31.
140. Tallerico R, Cristiani CM, Capone M, Madonna G, Mallardo D, Simeone E, Dominijanni A, Grimaldi AM, Colucci F, Ascierto PA. Analysis of T and NK cells immune response in Ipilimumab treated Melanoma patients. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):1-2.
141. Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Frontiers in immunology*. 2013;4:499.
142. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Critical care*. 2012;16(3):1-14.
143. Mantegani P, Tambussi G, Galli L, Din CT, Lazzarin A, Fortis C. Perturbation of the natural killer cell compartment during primary human immunodeficiency virus 1 infection primarily involving the CD56<sup>bright</sup> subset. *Immunology*. 2010;129(2):220-33.

144. Bielekova B, Richert N, Herman M, Ohayon J, Waldmann T, McFarland H, Martin R, Blevins G. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;77(21):1877-86.
145. Martinez-Rodriguez J, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, Comabella M. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical immunology*. 2011;141(3):348-56.
146. Min YG, Park C, Kwon YN, Shin JY, Sung JJ, Hong YH. B Cell Immunophenotyping and Transcriptional Profiles of Memory B Cells in Patients with Myasthenia Gravis. *Experimental neurobiology*. 2019;28(6):720-6.
147. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Pellicano M, Vitello S, Lio D, Candore G, Caruso C. A double-negative (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mechanisms of ageing and development*. 2009;130(10):681-90.
148. Martorana A, Balistreri CR, Bulati M, Buffa S, Azzarello DM, Camarda C, Monastero R, Caruso C, Colonna-Romano G. Double negative (CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) B lymphocytes: a new insight from telomerase in healthy elderly, in centenarian offspring and in Alzheimer's disease patients. *Immunology letters*. 2014;162(1 Pt B):303-9.
149. Fraussen J, Marquez S, Takata K, Beckers L, Montes Diaz G, Zografou C, Van Wijmeersch B, Villar LM, O'Connor KC, Kleinstein SH, Somers V. Phenotypic and Ig Repertoire Analyses Indicate a Common Origin of IgD(-)CD27(-) Double Negative B Cells in Healthy Individuals and Multiple Sclerosis Patients. *Immunology*. 2019;203(6):1650-64.
150. Rincon-Arevalo H, Wiedemann A, Stefanski AL, Lettau M, Szelinski F, Fuchs S, Frei AP, Steinberg M, Kam-Thong T, Hatje K, Keller B, Warnatz K, Radbruch A, Lino AC, Schrezenmeier E, Dörner T. Deep Phenotyping of CD11c(+) B Cells in Systemic Autoimmunity and Controls. *Frontiers of Immunology*. 2021;12:635615.
151. Meffre E, O'Connor KC. Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunological Reviews*. 2019;292(1):90-101.
152. Damsky W, Jilaveanu L, Turner N, Perry C, Zito C, Tomayko M, Leventhal J, Herold K, Meffre E, Bosenberg M. B cell depletion or absence does not impede anti-tumor activity of PD-1 inhibitors. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):1-7.

153. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-14.
154. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Circulating CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are expanded in sarcoidosis patients. *The Journal of dermatology*. 2003;30(7):503-9.
155. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(3):671-7.
156. Koch S, Kucharzik T, Heidemann J, Nusrat A, Luegering A. Investigating the role of proinflammatory CD16<sup>+</sup> monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;161(2):332-41.
157. Wildenberg ME, Welzen-Coppens JM, van Helden-Meeuwsen CG, Bootsma H, Vissink A, van Rooijen N, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. Increased frequency of CD16<sup>+</sup> monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjögren syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(3):420-6.
158. Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>, but not CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clinical immunology*. 2009;130(3):338-46.
159. Zhong H, Bao W, Li X, Miller A, Seery C, Haq N, Bussel J, Yazdanbakhsh K. CD16<sup>+</sup> monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;120(16):3326-35.
160. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, Pfeifenbring S, Stadelmann C, Schwab S, Linker RA. Pivotal role for CD16<sup>+</sup> monocytes in immune surveillance of the central nervous system. *The Journal of Immunology*. 2016;196(4):1558-67.
161. Stricker BH, Psaty BM. Detection, verification, and quantification of adverse drug reactions. *BMJ*. 2004;329(7456):44-7.
162. Greco A, Gallo A, Fusconi M, Marinelli C, Macri G, De Vincentiis M. Bell's palsy and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2012;12(2):323-8.

163. Kao JC, Liao B, Markovic SN, Klein CJ, Naddaf E, Staff NP, Liewluck T, Hammack JE, Sandroni P, Finnes H, Mauermann ML. Neurological Complications Associated With Anti-Programmed Death 1 (PD-1) Antibodies. *JAMA neurology*. 2017;74(10):1216-22.
164. Liewluck T, Kao JC, Mauermann M. PD-1 inhibitor-associated myopathies: emerging immune-mediated myopathies. *Journal of Immunotherapy*. 2018;41(4):208-11.
165. Rogiers A, Leys C, Lauwyck J, Schembri A, Awada G, Schwarze JK, De Cremer J, Theuns P, Maruff P, De Ridder M. Neurocognitive function, psychosocial outcome, and health-related quality of life of the first-generation metastatic melanoma survivors treated with ipilimumab. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020.
166. Daly LE, Power DG, O'Reilly Á, Donnellan P, Cushen SJ, O'Sullivan K, Twomey M, Woodlock DP, Redmond HP, Ryan AM. The impact of body composition parameters on ipilimumab toxicity and survival in patients with metastatic melanoma. *British journal of cancer*. 2017;116(3):310-7.
167. Fong L, Oh DY, Cham J, Zhang L, Fong G, Kwek SS, Klinger M, Faham M. T cell repertoire diversification is associated with immune related toxicities following CTLA-4 blockade in cancer patients. *Cancer Research*. 2016.
168. Dias PM, Banerjee G. The role of Th17/IL-17 on eosinophilic inflammation. *Journal of autoimmunity*. 2013;40:9-20.
169. Tarhini AA, Zahoor H, Lin Y, Malhotra U, Sander C, Butterfield LH, Kirkwood JM. Baseline circulating IL-17 predicts toxicity while TGF-beta1 and IL-10 are prognostic of relapse in ipilimumab neoadjuvant therapy of melanoma. *Immunotherapy of Cancer*. 2015;3:39.
170. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:3908061.
171. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, Wang L, Tsuchihashi Z, Hu B, Panting L, Jure-Kunkel M, Ji RR. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11:75.
172. Berman D, Parker SM, Siegel J, Chasalow SD, Weber J, Galbraith S, Targan SR, Wang HL. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in

- dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunology*. 2010;10(1):11.
173. Schindler K, Harmankaya K, Kuk D, Mangana J, Michielin O, Hoeller C, Dummer R, Pehamberger H, Wolchok JD, Postow MA. Correlation of absolute and relative eosinophil counts with immune-related adverse events in melanoma patients treated with ipilimumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014.
174. Callahan MK, Yang A, Tandon S, Xu Y, Subudhi SK, Roman RA, Heine AI, Pogoriler E, Kuk D, Panageas K, Yuan JD, Allison JP, Wolchok JD. Evaluation of serum IL-17 levels during ipilimumab therapy: Correlation with colitis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(15\_suppl):2505-.
175. Robert-Koch-Institut. Neue Zahlen zu Krebs in Deutschland 2019. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2019/16\\_2019.html](https://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2019/16_2019.html). (letzter Zugriff: 17.03.2020)
176. Krebsarten: Zentrum für Krebsregisterdaten; 17.12.2019. (letzter Zugriff: 17.03.2020)
177. Haslam A, Prasad V. Estimation of the percentage of US patients with cancer who are eligible for and respond to checkpoint inhibitor immunotherapy drugs. *JAMA Network*. 2019;2(5):e192535-e.
178. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *American journal of clinical oncology*. 2016;39(1):98.

## 6. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

### 6.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lorena Ginesta Roque, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Neurologische Nebenwirkungen einer Immuncheckpoint-Therapie/ Neurological adverse events of immune checkpoint therapy selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## 6.2 Anteilserklärung

Lorena Ginesta Roque hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Knauss, S., Ginesta Roque, L., Hühnchen, P., Heinzerling L., Böhmerle W., Endres, M. Neurologische Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren. Nervenarzt 90, 138–147 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00115-018-0571-8>

Beitrag im Einzelnen:

- Datenerhebung
  - selbstständige Literaturrecherche
  - Entwicklung einer optimalen Suchstrategie
- Datenauswertung
  - selbstständige Erstellung der Tabelle 1, der Abbildung 1 sowie des Anhangs „Abbildung: Selektionsprozess während der Literaturrecherche“, „Hintergrund der Checkpoint-Inhibitor-Therapie“ und der zusätzlichen Tabellen „Neurologische Nebenwirkungen nach Substanzklassen“ und „Neurologische Nebenwirkungen in den Zulassungsstudien“
- Publikation
  - Mitwirkung bei der Erstellung des Manuskripts
  - Mitwirkung bei der Überarbeitung des eingereichten Artikels anhand der Anmerkungen der Reviewer

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## **7. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 8. Publikationsliste

1. Knauss, S., Ginesta Roque, L., Hühnchen, P., Heinzerling L., Böhmerle W, Endres, M. Neurologische Nebenwirkungen von Checkpoint-Inhibitoren. *Nervenarzt* 90, 138–147 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00115-018-0571-8>

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meines Promotionsvorhabens begleitet und unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Wolfgang Böhmerle, und meinem Betreuer, Dr. med. Samuel Knauß, die mich nicht nur in die medizinische Forschung eingeführt und mir das Thema dieser Arbeit überlassen haben. Auf ihre geduldige und zuverlässige Unterstützung und ihre bereichernden Anregungen konnte ich in den letzten Jahren immer zählen, was ich sehr zu schätzen weiß.

Prof. Dr. med. Mathias Endres danke ich dafür, als Teil seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit bekommen zu haben, im Feld der Neurologie forschen zu dürfen.

Für die freundliche Einarbeitung in die Labormethoden und ihre technische Unterstützung möchte ich weiterhin Petra Loge meinen Dank aussprechen.

Außerdem bin ich Dr. med. Christian Schinke und Dr. med. Petra Hühnchen für ihre Unterstützung bei der klinischen Untersuchung der Studienpatienten und -patientinnen sowie für ihre fachliche und wissenschaftliche Expertise, mit der sie mir zur Seite standen, sehr dankbar.

Ich möchte auch Dr. med. Kimberley Farmer für das Einbinden in das Hauttumorzentrum und für ihre engagierte Hilfestellung bei der Rekrutierung der Studienpatienten und -patientinnen danken. Ihren persönlichen Einsatz habe ich besonders wertgeschätzt.

Mein großer Dank gilt auch meinen Eltern, Nicolina und Mario, sowie meinen Brüdern, Luis und Daniel, für ihren fortwährenden Rückhalt in allen Lebenssituationen und dafür, dass sie mich stets in meinen Zielen bestärkt haben. Auch Ivett und Delaine möchte ich an dieser Stelle danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden, insbesondere bei Markus und Sophie, Roxanna, Estelle, Asne und Patti sowie Michał und Sonja bedanken, die mich während dieser Zeit nicht nur begleitet und motiviert haben, sondern in zahlreichen Momenten für mich da waren und mit ihrem Beistand entscheidend zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen haben.

## 10. Bescheinigung der akkreditierten Statistikerin



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzke

Name, Vorname: Ginesta Roque, Lorena  
Emailadresse: lorena.ginesta-roque@charite.de  
Matrikelnummer: 221254  
PromotionsbetreuerIn: PD Dr Wolfgang Böhmerle  
Promotionsinstitution/ Klinik: Klinik für Neurologie

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berl  
Tel. +49 (0)30 450 562171  
frank.konietzke@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



### Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Lorena Ginesta Roque innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 13.8.2020
- Termin 2: 31.8.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Zentral für diese Arbeit ist die Verwendung deskriptiver Statistik zur Beschreibung der Daten, sowie ausführliche Falldiskussionen.
- Die Beschreibung kann in Form von Tabellen anhand von Lage- und Streuungsparameter bei metrischen Daten erfolgen, als absolute und relative Häufigkeiten bei kategorialen Variablen. Diese Auswertungen können potenziell nach anderen Variablen oder den Visiten im longitudinalen Teil der Arbeit stratifiziert werden.
- Darüber hinaus sind grafische Darstellungen relevanter Variablen zu empfehlen – zur Beschreibung von Verteilungen zB durch Histogramme, Boxplots oder Balkendiagramme.
- Die angewandten statistischen Methoden sollten im Methodikteil klar benannt werden.
- Die Methoden sowie die den einzelnen Berechnungen zugrundeliegende Stichprobe sollten im Ergebnisteil klar ersichtlich sein, z. B. in Tabellen und Grafiken.
- Im longitudinalen Teil der Arbeit ist empfehlenswert nicht nur zusammenfassende Trends durch Statistiken wie zB Median und Mittelwert pro Zeitpunkt / Visite zu erfassen, sondern auch individuelle Trends für einzelne Porband:innen.

Diese Bescheinigung garantiert weder die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren noch die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 31.8.2022

Name des Beraters/ der Beraterin:



Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN-BERLIN  
Institut für Biometrie und  
Klinische Epidemiologie  
Campus Charité Mitte  
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin  
Site: Reinhardtstr. 58