

**Humorale und zelluläre Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bei  
hämatonkologischen Patient\*innen mit myeloischer oder lymphatischer  
Neoplasie und bei Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-  
Therapie im Vergleich zu Proband\*innen ohne Tumorerkrankung**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von *Sabrina Jotschke*

Betreuer\*innen: *Prof. Dr. med. Haifa Kathrin Al-Ali, Halle (Saale)*  
*Prof. Dr. med. Patrick Michl, Halle (Saale)*

*Gutachter\*innen:* *apl. Prof. Dr.med. Gernot Keyßer, Halle (Saale)*  
*Prof. Dr.med. Florian Heidel, Hannover*

Datum der  
Verteidigung: 25.09.2024

## Referat

Wenig ist bisher bekannt zur Dynamik der SARS-CoV-2-spike-Protein-Antikörper und zur zellulären Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen. Ziel dieser multizentrischen, prospektiven Längsschnittstudie der Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (DRKS00027372) war die Beurteilung von Patient\*innen mit myeloischen (M, n=131) und lymphatischen (L, n=104) Neoplasien, sowie soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie (PD-L1i, n=17) hinsichtlich der Dynamik ihrer humoralen Immunantwort, sowie der Generierung einer zellulären Immunität auf eine COVID-19-Impfung im Vergleich zu einer gesunden Referenzkohorte. Methodik: Eingeschlossen wurden 398 Individuen im Verhältnis 2 Patient\*innen (n=262) zu 1 Kontrolle (K, n=136). Blutproben wurden vor Impfung, 35 (+/-7) Tage (d35) und 120 (+/-14) Tage (d120) nach Impfung entnommen. Zu allen Zeitpunkten erfolgte eine Bestimmung der Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer mittels ELISA-Verfahren. Die zelluläre Immunität wurde an d120 ermittelt, indem Covid-19-spezifische, triple-positive (IL2<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CovCD4<sup>+</sup>/CovCD8<sup>+</sup>) via Durchflusszytometrie-Verfahren bestimmt wurden. Die Labore waren verblindet bezüglich Patient\*innen und Kontrollen. Ergebnisse: K zeigten bessere d35 Serokonversionsraten (98%) als die Patient\*innen (68%) (p<0.001). Die d120 Serokonversionsraten verbesserten sich über alle Patientenkohorten hinweg (PD-L1i 81% auf 100%, M 82% auf 97% und L 48% auf 66%). CovCD4<sup>+</sup> und CovCD8<sup>+</sup> waren vergleichbar in L (71%/31%) und K (74%/32%), aber deutlich geringer vertreten in M (53%, p = 0.003 /24%, p = 0.03). Die humoralen und zellulären Immunantworten d120 waren nicht korreliert. Ein erheblicher Anteil der lymphatischen Patient\*innen ohne nachweisbare Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer wies trotzdem zelluläre Immunantworten auf. Zusammenfassung: Die meisten Patient\*innen entwickeln eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung. Dabei ist es essenziell, immer beide Komponenten der Immunreaktion zu untersuchen, da trotz fehlender Antikörper eine Schutzwirkung durch T-Zell-Antworten bestehen kann. Diese Ergebnisse haben Bedeutung für die Ableitung von spezifischen Impfeempfehlungen bezüglich SARS-CoV-2-Auffrischungsimpfungen bei hämatoonkologischen Patient\*innen und Patient\*innen unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie.

Jotschke, Sabrina: Humorale und zelluläre Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen mit myeloischer oder lymphatischer Neoplasie und bei Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie im Vergleich zu Proband\*innen ohne Tumorerkrankung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss, 70 Seiten, 2024.

# Inhaltsverzeichnis

Titelblatt

Referat

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung und Zielstellung	
1.1	Die Corona-Pandemie im zeitlichen Verlauf und Bedeutung für hämatoonkologische Patient*innen .....	1
1.2	Die COVID-19-Impfkampagne in Deutschland .....	4
1.3	Ablauf der Immunreaktion bei einer SARS-CoV-2-Infektion und Rolle der Antikörper und T-Zellen in der Immunabwehr .....	6
1.4	Immunreaktion bei Patient*innen mit hämatoonkologischer Erkrankung .....	13
1.5	Vorstellung der ImV-HOng-Studie (DRKS00027372) .....	17
2	Diskussion	
2.1	Humorale Immunantwort unter COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient*innen .....	21
2.2	Zelluläre Immunantwort unter COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient*innen .....	23
2.3	Limitationen der Studie .....	27
2.4	Bedeutung und Zusammenfassung .....	29
3	Literaturverzeichnis .....	30
4	Thesen .....	37
	Publikationsteil .....	38
	Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung mit Unterschrift .....	69
	Danksagung .....	70

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACE 2	=	Angiotensin-converting enzyme 2
Ad26.COV2.S	=	Impfstoff Janssen® der Firma Janssen Cilag International
A(H1N1)	=	Influenza A-Virus (Hämagglutinin 1 Neuraminidase 1), “Schweinegrippe”
AL	=	Akute Leukämie
ALL	=	akute lymphatische Leukämie
B.1.1.529	=	SARS-CoV-2-Variante Omikron
B.1.617.2	=	SARS-CoV-2-Variante Delta
BNT162b2	=	mRNA-Impfstoff Comirnaty® von BioNTech/Pfizer
BTKi	=	Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor(en)
ChAdOx1-S	=	AZD1222 / COVID-19 Vaccine AstraZeneca/Vaxzevria®
CLL	=	chronisch lymphatische Leukämie
CovCD4 <sup>+</sup>	=	COVID-19-spezifische, triple-positive (IL2 <sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> ) CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (COVID-19- spezifische T-Helferzellen)
CovCD8 <sup>+</sup>	=	COVID-19-spezifische, triple-positive (IL2 <sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup> ) CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (COVID-19- spezifische zytotoxische T-Zellen)
COVID-19	=	Coronavirus-disease 2019
d35	=	Blutprobe 35(+/-7) Tage nach 1. Impfung
d120	=	Blutprobe 120(+/-14) Tage nach 1. Impfung
DGHO	=	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
GvHD	=	Graft-versus-host disease
HL	=	Hodgkin-Lymphom
ICI	=	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
ImV-HOng	=	Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bei hämatonkologischen Patient*innen
IgG	=	Immunglobulin G
IL	=	Interleukin
INF	=	Interferon
JAK-STAT	=	Januskinase - Signal Transducers and Activators of Transcription
MDS	=	Myelodysplastisches Syndrom
MERS	=	Middle East Respiratory Syndrome
MM	=	Multiples Myelom
MPN	=	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA-1273	=	mRNA-Impfstoff ®Spikevax der Firma Moderna Biotech
Nabs	=	neutralisierende Antikörper
NF- $\kappa$ B	=	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHL	=	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	=	Natürliche Killerzelle
NVX-CoV2373	=	Novaxovid® der Firma Novovax
PD-L1	=	programmed cell death ligand 1
PD-L1i	=	programmed cell death ligand 1- Inhibitor
SARS-CoV-2	=	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
STIKO	=	Ständige Impfkommission des Robert Koch-Institutes

TCR	=	T-Zell-Rezeptor
TH <sub>1</sub> /TH <sub>2</sub> -Zellen	=	T-Helferzellen Typ I/Typ II
TLR	=	Toll-Like-Rezeptor
TNF	=	Tumor-Nekrose-Faktor
WHO	=	World Health Organization
VZgE	=	Varicella-Zoster Virus glycoprotein E

# **1. Einleitung und Zielstellung**

## **1.1 Die Corona-Pandemie im zeitlichen Verlauf und Bedeutung für hämatoonkologische Patient\*innen**

Seit der Erklärung der pandemischen Lage durch die World Health Organization (WHO) am 11. März 2020<sup>1</sup> wurden weltweit etwa 465 Mio. COVID-19-Fälle bis März 2022 registriert, darunter 18 Mio. allein in Deutschland, zudem über 6 Mio. Todesfälle im Zusammenhang mit dem Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 (SARS-CoV-2).<sup>2</sup> Somit gilt die COVID-19-Pandemie als bisher größtes und bedrohlichstes Infektionsgeschehen des 21. Jahrhunderts, weit vor der Influenza A(H1N1) -Virus-Pandemie in den Jahren 2009-2010, welche weniger als ein Zehntel an Todesopfern forderte.<sup>3</sup>

Auch nach über 2 Jahren ist die Corona-Pandemie ein allgegenwärtiges Thema. Die Angst der Bevölkerung vor einer Ansteckung mit dem neuartigen SARS-CoV-2 ist nach wie vor groß. Während zu Beginn der Pandemie vor allem schwere Krankheitsverläufe mit Intensivbehandlung oder sogar Todesfolge gefürchtet waren, hielten sich mit Einführung der Schutzimpfungen und dem Auftreten neuer Virus-Varianten wie Omikron (B.1.1.529) seit November 2021 vor allem Bedenken hinsichtlich vielfach berichteter Langzeitfolgen nach Genesung.<sup>4</sup> Kommt es zur Symptompersistenz über 4 Wochen nach Krankheitsbeginn, spricht man von „Long COVID“, nach über 12 vom „Post-COVID-Syndrom“. Häufig berichtet werden Erschöpfung, eingeschränkte Belastbarkeit, Kurzatmigkeit und Einschränkungen der Konzentrations- und Merkfähigkeit.<sup>5</sup>

Besonders gefährdet hinsichtlich eines schweren Krankheitsverlaufes und/oder Langzeitfolgen sind Bevölkerungsgruppen mit chronischen Erkrankungen und ältere Menschen. Noch immer werden große Hoffnungen in die bereits verfügbaren und sich aktuell in der Entwicklung befindlichen COVID-19-Schutzimpfungen gesetzt. Bereits am 21.12.2020 erhielt der mRNA-Impfstoff BNT162b2 der Firma BioNtech/Pfizer als erster COVID-19-Impfstoff seine Zulassung in Europa, gefolgt von den Impfstoffen mRNA-1273 der Firma Moderna Biotech, ChAdOx1-S von AstraZeneca und Ad26.COV2.S der Firma Janssen Cilag International Anfang des Jahres 2021.<sup>6</sup>

Aufgrund der Dringlichkeit der Zulassung war es vorab nicht möglich, alle Bevölkerungsgruppen hinsichtlich der Wirksamkeit und Sicherheit der COVID-19-Impfstoffe in klinischen Studien zu testen. Doch ob bei allen Menschen eine adäquate

Immunantwort und damit ausreichende Schutzwirkung zu erwarten sein würde, konnte aufgrund fehlender Daten nicht sicher vorausgesagt werden.

Hämatookologische Patient\*innen und Tumorpatient\*innen unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie stellen kritische Subpopulationen dar. Für diese wurde ein früherer Impfstart im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ermöglicht, indem sie im Stufenplan der Ständigen Impfkommission (STIKO) vom Robert-Koch-Institut auf Stufe 3 unter der Kategorie „Personen mit hämatologischer Krebserkrankung und Krebspatient\*innen ohne Remission“ subsummiert und priorisiert wurden. Damit erfolgte eine Gleichstellung mit Personen zwischen 70 und 74 Jahren, Menschen nach Organtransplantation und Personen mit anderen chronischen Erkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung oder chronischer Nierenerkrankung, direkt nach Personen > 75 Jahren, Bewohner\*innen von Pflege- oder Seniorenheimen und medizinischem Personal auf den Stufen 1 und 2.<sup>7</sup> Eine ausreichende Datengrundlage fehlte jedoch zum damaligen Zeitpunkt, sodass diese Priorisierung ausschließlich auf Annahmen für ein erhöhtes Risiko bezüglich einer COVID-19-Erkrankung beruhte.

In einer systematischen Übersichtsarbeit von Vijenthira et al. aus dem Jahr 2020 wurden 3377 Patient\*innen mit hämatookologischer Diagnose weltweit hinsichtlich ihres Outcomes bei COVID-19-Infektion untersucht. Die über alle Einzelstudien gemittelte Mortalität ergab 34%, das Risiko für eine intensivmedizinische Behandlung 21% und für künstliche Beatmung 17%. Die Mortalität bezüglich der einzelnen hämatookologischen Entitäten, gemittelt über alle in die Analyse eingeschlossenen Publikationen, ergab 41% für akute Leukämien (AL), 34% für myeloproliferative Erkrankungen (MPN), 32% für Lymphome und 31% für chronisch lymphatische Leukämien (CLL).<sup>8</sup>

Bisherige Forschungsergebnisse bezüglich Impfungen bei hämatookologischen Patient\*innen sind heterogen. Viele Studien sind alt, in ihrer Methodik uneinheitlich oder weisen nur kleine Patientenkohorten auf.<sup>9,10,11,12</sup>

Impfleitlinien für Tumorpatienten reichen von „Empfehlungsgrad A - starke Empfehlung“, beispielsweise für die Influenza-Vakzinierung bei AL, Lymphomen, MPN oder soliden Tumoren, bis hin zu „Grad D - Empfehlung gegen den Einsatz“ für Lebendimpfstoffe gegen Masern, Mumps, Röteln, bei allen zuvor genannten Krankheitsentitäten unter aktiver Chemotherapie.<sup>12,13</sup> Des Weiteren gibt es therapiespezifische Impfeempfehlungen von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO). So sei insbesondere bei monoklonalen Anti-

CD20-Antikörpertherapien mit einer erheblichen Einschränkung der Immunantwort zu rechnen, sodass Impfungen innerhalb der ersten 6 Monate nach einer solchen Therapie generell nicht durchgeführt werden sollten.<sup>12,13</sup> Eine Datengrundlage bezüglich der erstmalig eingesetzten mRNA-Impfstoffe fehlte gänzlich. So entstand im Januar 2021 die Idee für das Projekt „Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen (ImV-HOng)“ des Krukenberg Krebszentrums Halle.

Das Ziel stellte eine umfassende Beurteilung der Immunantwort von hämatoonkologischen Patient\*innen auf humoraler und zellulärer Ebene dar, aber auch das Ermitteln prädiktiver klinischer und/oder laboratorischer Parameter zur Abschätzung der Immunantwort, sowie die Beurteilung der Dauer des Schutzes. Die ImV-HOng-Studie leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Ableitung spezifischer Impfempfehlungen für diese Bevölkerungsgruppe.



## **1.2 Die COVID-19-Impfkampagne in Deutschland**

Mehr als ein Jahr nach Zulassung der ersten Impfstoffe sind über 75% der deutschen Bevölkerung grundimmunisiert, fast 60% erhielten bereits eine oder zwei Auffrischungsimpfungen. Doch noch immer sind 22% der Bevölkerung nicht geimpft.<sup>14</sup>

In der Europäischen Union zugelassen sind bislang 5 Impfstoffe. Neben den bereits eingangs erwähnten und in unserer Studie betrachteten mRNA- und vektorbasierten Impfungen, ist seit dem 20.12.2021 NVX-CoV2373, ein adjuvantierter Proteinimpfstoff der Firma Novavax, für die Grundimmunisierung zugelassen und seit Februar 2022 in Deutschland verfügbar. Doch die erhoffte Nachfrage blieb aus, die Zahl der Neu- und Auffrischungsimpfungen stagniert seit Monaten. Ein denkbarer Grund könnte der Widerspruch zwischen hoher Impfquote und weiterhin hohen Infektionszahlen sein. Die bundesweite 7-Tage-Inzidenz für Deutschland lag Anfang des Jahres 2022 über Wochen auf Rekordniveau (1734,2 Stand 23. März 2022).<sup>15</sup> Die Zahl der Neu- und Auffrischungsimpfungen bleibt deutlich hinter der Zahl der Neuinfektionen zurück, besonders deutlich zu sehen im Zeitraum der 5. Infektionswelle, dominiert von der Omikron-Variante (B.1.1.529), von Januar bis Mai 2022.<sup>14,15</sup> Dass neue Virusvarianten entstehen, gegen die nur ein begrenzter Impfschutz besteht, ist längst bekannt. Zwar befinden sich aktuell 149 COVID-19-Impfstoffe in klinischer und 195 in präklinischer Entwicklung, doch ob ihre Anpassung an die neuen Varianten schnell und effizient genug erfolgen kann, bleibt fraglich.<sup>16</sup>

Seit Ende September 2021 empfiehlt die STIKO Personen mit Immundefizienz und seit Ende Oktober 2021 Personen im Alter  $\geq 70$  Jahren, Bewohner\*innen in Pflegeeinrichtungen und medizinischem Personal eine Auffrischungsimpfung nach abgeschlossener Grundimmunisierung. Ab November 2021 wurde diese Empfehlung auf alle Personen  $\geq 18$  Jahre ausgeweitet. Darüber hinaus wurde der Mindestabstand für eine Auffrischungsimpfung von 6 auf 3 Monate verkürzt.<sup>17</sup> Obwohl mit der Omikron-Variante (B.1.1.529) deutlich höhere Inzidenzen erreicht wurden als mit der vorangegangenen Delta-Variante (B.1.617.2), kam es zu einem kontinuierlichen Rückgang der Hospitalisierungsraten. Für Deutschland konnte eine mittlere Hospitalisierungsrate von nur noch 0,9% für B.1.1.529 ermittelt werden, dies entspricht einem Rückgang von 40-80% im Vergleich zu B.1.617.2.<sup>17</sup> B.1.1.529 zeichnet sich durch erhöhte Übertragbarkeit, auch unter Geimpften, aus. Im Vergleich zu B.1.617.2 ist B.1.1.529 einer dänischen Studie zufolge 2,6 - 3,6fach infektiöser.<sup>18</sup> Signifikanter Impfschutz nach

Grundimmunisierung sei bereits nach wenigen Wochen nicht mehr gegeben und bessere sich auch nach Auffrischungsimpfung nur moderat, aber nicht langfristig. Aktuelle Studien zeigen, dass der Impfschutz gegen eine symptomatische B.1.1.529 - Infektion 2 - 4 Wochen nach Auffrischungsimpfung wieder 65-75% erreicht, doch nach nur 15 Wochen bereits wieder auf 25-40% abfällt.<sup>19</sup> Im Falle einer Immundefizienz, wie bei unseren hämatologischen Patient\*innen, fallen diese Werte noch schlechter aus.<sup>20</sup>

Am 02.01.2022 begann deshalb die Kampagne zur 2. Auffrischungsimpfung, aktuell empfohlen für alle  $\geq 70$ -Jährigen, Bewohner\*innen von Pflegeeinrichtungen und Personen mit erhöhtem Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und Menschen mit Immundefizienz. Die zweite Auffrischungsimpfung wird nicht empfohlen im Falle einer durchgemachten SARS-CoV-2-Infektion nach erster Auffrischungsimpfung. Sie sollte nur mit mRNA-Impfstoffen durchgeführt werden.<sup>17</sup>

Ständige Änderungen der Impfeempfehlungen und die mittlerweile sehr heterogene Datenlage erschweren es, den Überblick zu behalten und selbstbestimmt eine Entscheidung für oder gegen eine (weitere) COVID-19-Impfung zu treffen.

Das Vertrauen der Bevölkerung in die Impfkampagne wurde zudem durch kontroverse Diskussionen unter Expert\*innen und Änderungen in den Zulassungsbeschränkungen weiter gemindert. Ein bekanntes Beispiel ist der vektorbasierte Impfstoff ChAdOx1-S, der zu Anfang in allen Altersgruppen uneingeschränkt eingesetzt wurde, bis gehäuft in zeitlichem Zusammenhang mit der Impfung seltene Hirnvenenthrombosen auftraten, teils mit Todesfolge. Seit dem 01. April 2021 war ChAdOx1-S deshalb nur noch für  $\geq 60$ -Jährige zugelassen und seit dem 01. Dezember 2021 kam der Impfstoff in Deutschland gar nicht mehr zum Einsatz.<sup>21</sup> Weiterhin wurde eine Häufung von Peri- und Myokarditiden bei jüngeren Menschen, die eine Impfung mit mRNA-1273 der Firma Moderna erhalten hatten, beobachtet, sodass die Zulassung von mRNA-1273 seit dem 18. November 2021 von der STIKO auf Personen ab 30 Jahren beschränkt wurde.<sup>22</sup>

Anhand dieser Beispiele wird die enorme Bedeutung klinischer Anwendungsstudien deutlich, wie sie auch unsere „ImV-HOng“-Studie darstellt. Nur durch diese können seltene und sehr seltene unerwünschte Wirkungen aufgedeckt, spezielle Impfeempfehlungen, angepasst an die verschiedenen Bevölkerungsgruppen, ausgesprochen und damit die Sicherheit der Impfungen gewährleistet werden.

### **1.3 Ablauf der Immunreaktion bei einer SARS-CoV-2-Infektion und Rolle der Antikörper und T-Zellen in der Immunabwehr**

Der Verlauf einer SARS-CoV-2-Infektion ist individuell, von latenten Verläufen bis hin zu schwerer Pneumonie mit Sepsis und Multiorganversagen. Welche Komponenten des Immunsystems die Weichen für den Krankheitsverlauf stellen, wurde intensiv untersucht, sodass die Immunreaktion auf das neuartige Coronavirus mittlerweile gut bekannt ist.

#### **Unspezifische Immunreaktion**

Die Aufnahme des Virus erfolgt über den Atemtrakt. Im Lungengewebe angelangt, bindet es an den Angiotensin-Converting-Enzyme-2 (ACE 2) - Rezeptor, der sich in besonders hoher Dichte auf den Epithelzellen der Alveolen und auf Alveolarmakrophagen befindet. Die Dichte der ACE 2-Rezeptoren und die Expression dieses Rezeptors in anderen Organen scheinen eine entscheidende Rolle für den Krankheitsverlauf zu spielen. Außer in der Lunge gibt es ACE 2-Rezeptoren auch in der Niere, im Darm und in den Koronararterien.

Nach dem Eintritt in die alveolären Epithelzellen kommt es über Bindung an Major Histocompatibility Complex I - Moleküle (MHC-I) zur Präsentation von Virusbestandteilen auf deren Oberfläche. Über Toll-like-Rezeptoren (TLR) werden infizierte Zellen vom Immunsystem erkannt. Eine Rolle spielen dabei insbesondere dendritische Zellen, Neutrophile und Makrophagen. Über die Bindung an TLRs, insbesondere an TLR-7<sup>23,24</sup>, kommt es zur Auslösung intrazellulärer Kaskaden in den entsprechenden Immunzellen und infolgedessen über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zur Transkription, Translation und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1b und TNF- $\alpha$ .<sup>24,25,26</sup> Diese initiieren die Rekrutierung von Zellen des spezifischen Immunsystems, wie B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen.<sup>27,28</sup> Zytokine spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Verbindung zwischen unspezifischem und dem spezifischen Immunsystem (siehe Abbildung 1, S.7 : „Verbindung zwischen spezifischem und unspezifischem Immunsystem über Zytokine“).

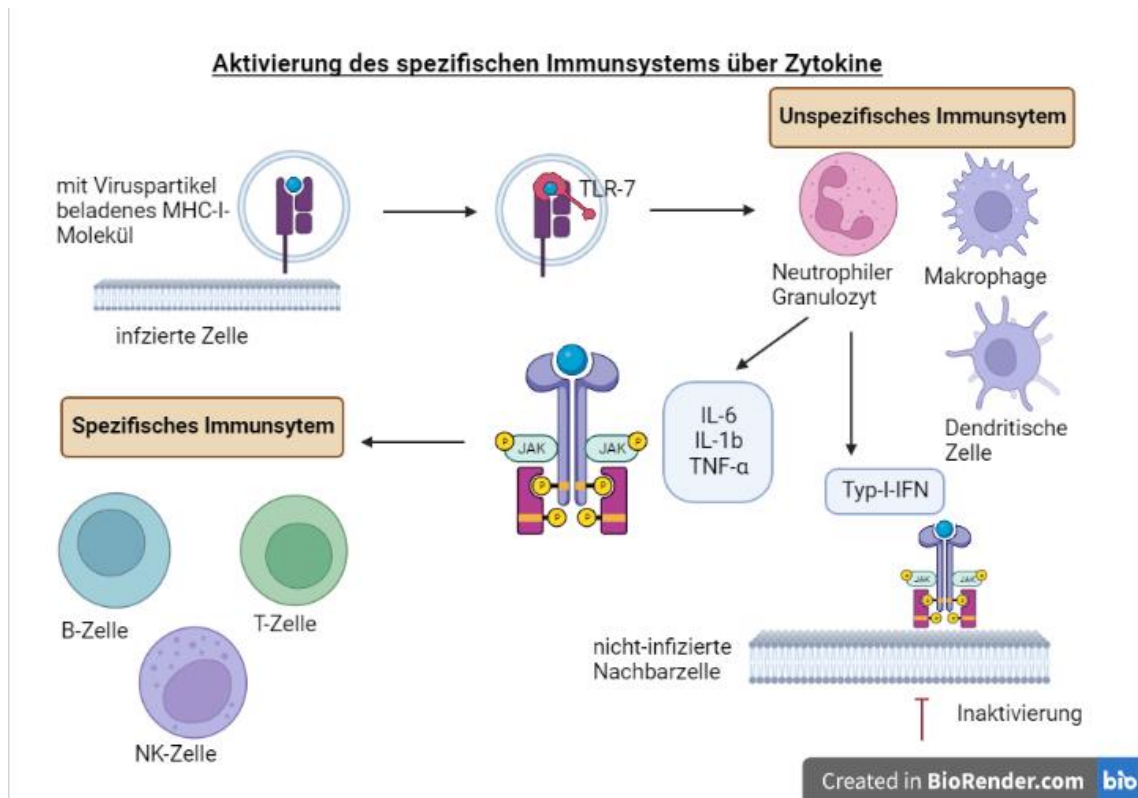


Abbildung 1: Verbindung zwischen spezifischem und unspezifischem Immunsystem über Zytokine  
 Erstellt von Sabrina Jotschke am 10.08.2022 mit dem frei zugänglichen Online-  
 Programm BioRender (<https://biorender.com>).

Doch neben proinflammatorischen Zytokinen, die in hoher Konzentration tendenziell zu einem ungünstigen Krankheitsverlauf führen, spielen in dieser ersten Phase der Infektion auch antiinflammatorische Zytokine, wie die Typ I-Interferone (Typ-I-IFN), eine entscheidende Rolle. Hauptaufgabe der Interferone ist es, in einer lokalen Reaktion benachbarte Zellen vor einer Infektion zu schützen. Dazu binden die Interferone an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der noch nicht befallenen, umliegenden Zellen und führen über den JAK-STAT-Signalweg zur Inaktivierung dieser. Durch Hemmung von Transkription und Translation können aufgenommene Viruspartikel sich nicht replizieren, wodurch die weitere Ausbreitung des Virus eingedämmt werden kann.<sup>24,29,30,31</sup> Es gibt Hinweise darauf, dass ein Defekt im Bereich von Typ-I-IFN zu einer unkontrollierten Vermehrung des SARS-CoV-2 und somit zum schweren Krankheitsverlauf führen kann.<sup>24,25,27,28,29,32,33</sup>

Zum anderen können Interferone, wie INF- $\gamma$  (Typ II-INF), neben ihrer lokalen Funktion auch systemisch wirken und dabei zur Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit der Folge von exzessiven Lungenschäden führen.<sup>23,25</sup>

Eine hohe Konzentration bestimmter proinflammatorischer Zytokine scheint mit einer besonders ungünstigen Prognose verknüpft zu sein, eindeutige Hinweise dafür existieren für IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , und IFN- $\gamma$ .<sup>23,24,25,26,27,28,29</sup> IL-6 stellte sich dabei als stärkster Prädiktor für einen ungünstigen, multisystemischen Verlauf heraus.<sup>23,27,28,29,32,34,35,36</sup> In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Patient\*innen mit hoher Viruslast oft hohe Level der o.g. Zytokine aufweisen.<sup>27</sup> Dem entgegen stehen antiinflammatorische Botenstoffe, welche die weitere Zytokin-Freisetzung hemmen. Neben den bereits erwähnten Typ I-IFN zählen dazu IL-7, IL-10 und IL-4.<sup>27,29,32</sup> Die unkontrollierte und übermäßige Freisetzung proinflammatorischer Botenstoffe, auch als „Zytokinsturm“ bezeichnet, führt zu einem immunologischen Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Bestandteilen des Immunsystems und ist somit stark assoziiert mit schweren Krankheitsverläufen.<sup>27,29,31,37</sup> Dieser Pathomechanismus ist bereits von Infektionen mit dem Middle East Respiratory Syndrome-CoV (MERS) und SARS-CoV bekannt.<sup>33</sup>

### Spezifische Immunreaktion

Insbesondere die über CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vermittelte Immunantwort spielt im weiteren Verlauf eine entscheidende Rolle für das Infektionsgeschehen. Es handelt sich um eine überwiegend über T-Helferzellen Typ I (TH<sub>1</sub>) - Zellen vermittelte Immunreaktion mit vermehrter Freisetzung von IFN- $\gamma$  und IL-2, während das von TH<sub>2</sub>-Zellen freigesetzte IL-4 im Verhältnis vermindert ist (siehe Abbildung 2, S. 9: „Zelluläre Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion“).<sup>24,28,33,34,35,38,39,40,41</sup>

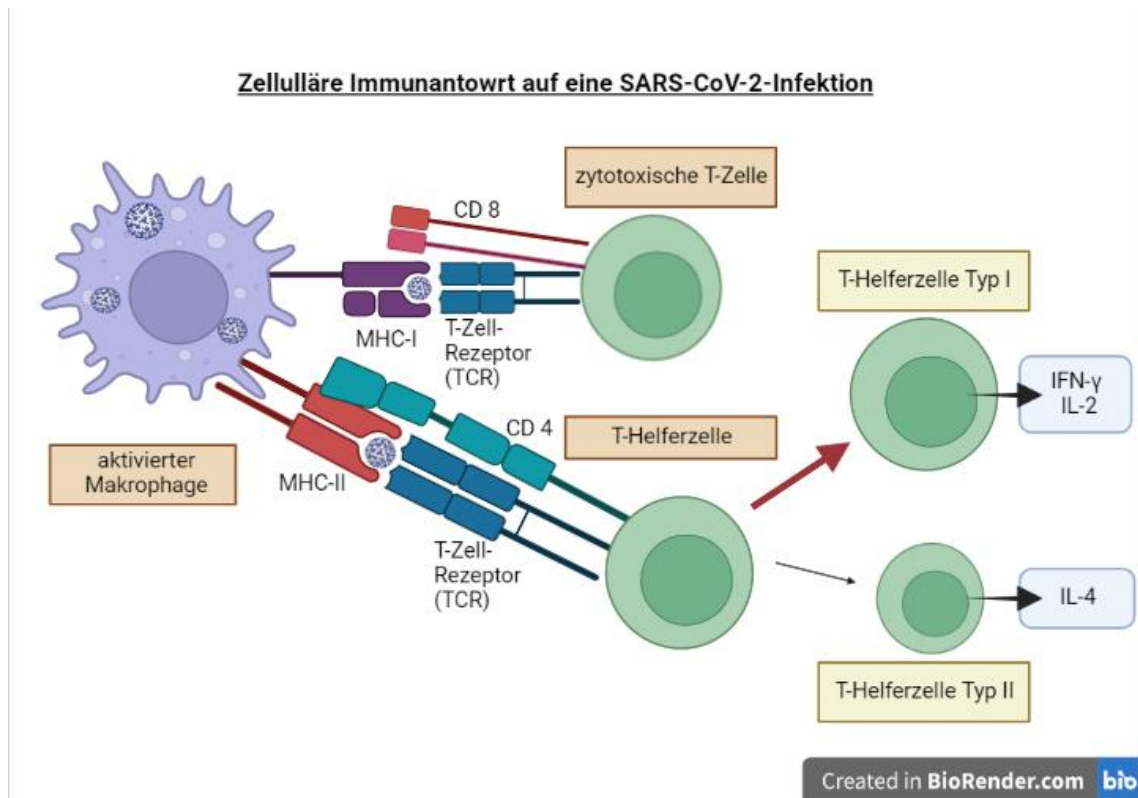


Abbildung 2: Zelluläre Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion  
Erstellt von Sabrina Jotschke am 10.08.2022 mit dem frei zugänglichen Online-  
Programm BioRender (<https://biorender.com>).

Toor et al. berichtet von verminderten T-Zell-Zahlen bei COVID-19-Patient\*innen mit schweren Verläufen.<sup>28</sup> Zudem sind die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Verhältnis zu den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei COVID-19-Patient\*innen mit schweren Verläufen häufig vermindert.<sup>28,36,42</sup>

Dabei zeigen sich jedoch große Unterschiede in den T-Zell-Antworten der Patient\*innen, sodass die Rolle der T-Zell-Immunantwort weiterhin nicht vollständig geklärt ist.<sup>40,42</sup> Einerseits ist sie essentiell für den Genesungsprozess und den Schutz vor schweren Verläufen, andererseits scheinen suboptimale, überaktive und veränderte T-Zell-Reaktionen einen wesentlichen Beitrag zur Exazerbation der Infektion zu leisten.<sup>40</sup> Mathew et al. definiert 3 Immuntypen, die mit schweren Krankheitsverläufen und Hospitalisierung assoziiert sind, wobei Typ 1 durch robuste CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten bei gleichzeitig überaktiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gekennzeichnet sei, Typ 2 zeige eine Schwäche in der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Aktivierung und Typ 3 zeige Einschränkungen sowohl in der humoralen, als auch in der zellulären Immunantwort. Diese immunologischen Konstellationen scheinen sich also ungünstig auszuwirken.<sup>43</sup>

Aufgabe der TH<sub>1</sub>-Zellen ist die weitere Koordination der Immunreaktion über die freigesetzten Zytokine. Die Stimulation von B-Zellen zur Produktion von IgG-Antikörpern, auch bezeichnet als Isotypenswitch der B-Zellen, wird nur teilweise von TH<sub>1</sub>-, überwiegend jedoch von TH<sub>2</sub>-Zellen induziert (siehe Abbildung 3, S. 10: „Humorale Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion“). Die im Folgenden gebildeten Anti-SARS-CoV-2-IgG-Antikörper dienen der Neutralisation extrazellulär vorkommender Viruspartikel und damit einer Verminderung der Virämie und der weiteren systemischen Erregerausbreitung.<sup>30</sup> Eine wichtige Rolle spielt dabei das B-Zell-Rezeptor-Repertoire: Je monoklonar dieses aufgebaut ist, desto schwerer gestaltet sich der Erkrankungsverlauf.<sup>42</sup>

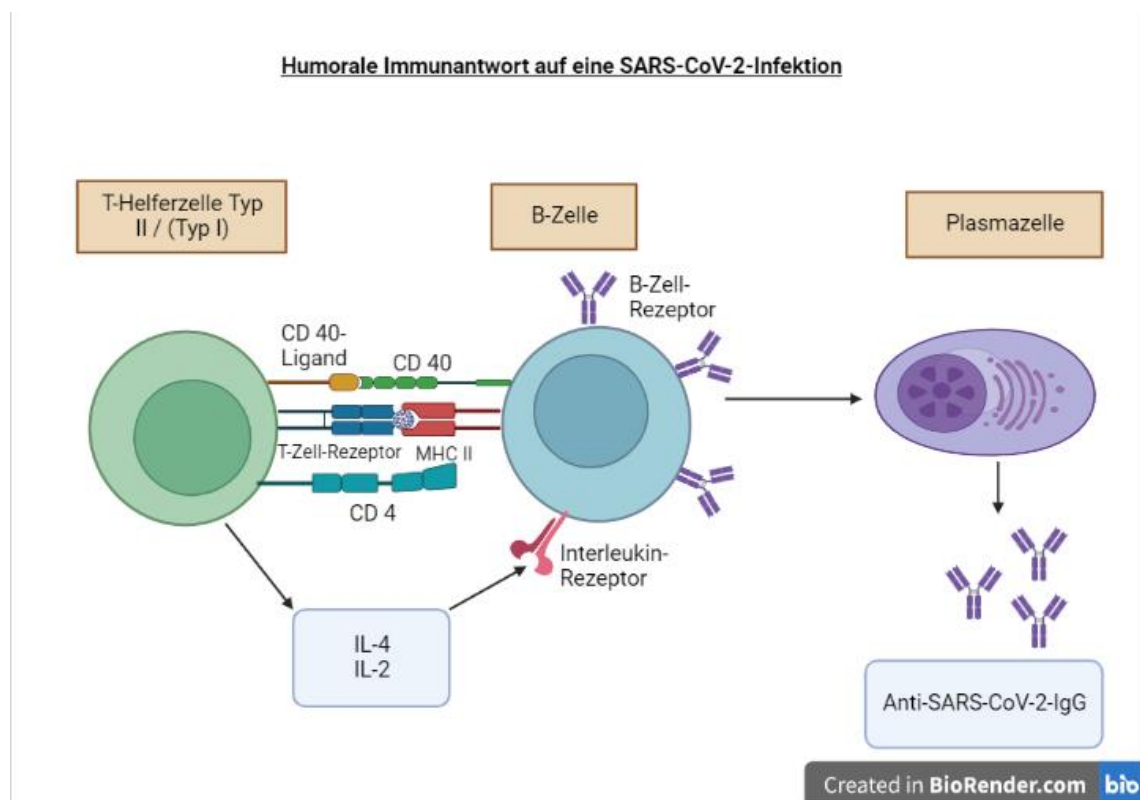


Abbildung 3: Humorale Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion  
Erstellt von Sabrina Jotschke am 10.08.2022 mit dem frei zugänglichen Online-  
Programm BioRender (<https://biorender.com>).

Unklar ist bislang die Schutzdauer, welche durch die humorale Immunität vermittelt werden kann. Auch mehrere Monate nach einer SARS-CoV-2-Infektion bilden sich im Falle einer Reinfektion zumeist nur leichte Symptome und geringe Viruslasten bei Betroffenen aus. Eine Antikörper-unabhängige Immunität, am ehesten vermittelt durch antigenspezifische T-Zellen, scheint dabei naheliegend.<sup>43,44,45</sup> Frühe Daten von COVID-

19-genesenen Patient\*innen deuten auf eine T-Zell-vermittelte Immunantwort bei nahezu 100% der untersuchten Teilnehmer hin.<sup>35,40</sup> Escobedo et al. zufolge vermittele die T-Zell-Antwort sogar den größeren und langanhaltenderen Schutz gegen COVID-19, verglichen mit den Antikörpern.<sup>24</sup> Tay et al. berichtet von Coronavirus-spezifischen T-Gedächtniszellen, die bei Patient\*innen nach SARS-CoV-Infektion über 2 Jahre nach Genesung nachgewiesen werden konnten, zudem wird die Gefahr eines verstärkten Infektionsgeschehens mit Organschäden durch nicht-neutralisierende Antikörper beschrieben.<sup>39</sup> Von einer Gefahr durch Antikörper spricht auch Shah et al.: Initial schwache humorale Immunantworten hätten in der Vergangenheit im Falle von SARS-CoV- und MERS-CoV-Infektionen zu besserer Viruselimination geführt, während starke Antikörperantworten eher mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert gewesen seien.<sup>31</sup> Eine weitere Studie aus China beschäftigte sich mit klinischen und immunologischen Parametern bei asymptomatischen SARS-CoV-2-Infektionen und untersuchte dafür die Proben von 37 symptomatischen und 37 asymptomatischen COVID-19-Patient\*innen. Das Resultat bezüglich der humoralen Immunantwort zeigte, dass Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer in der Gruppe symptomatischer Patient\*innen signifikant höher waren.<sup>46</sup> Dies verdeutlicht die teilweise überschätzte Rolle der Antikörper in der Immunabwehr von SARS-CoV-2.

Die Rolle der T-Zell-vermittelten Immunantwort untersuchte Tang et al. in einem 6-Jahres-follow-up SARS-CoV-genesener Patient\*innen aus dem Jahr 2011. Hier hatten 21 von 23 Patient\*innen keine nachweisbaren anti-SARS-CoV-Antikörper und kein Patient hatte spezifische B-Gedächtniszellen, während in 14 von 23 (61%) der untersuchten Patient\*innen spezifische T-Gedächtniszellen nachweisbar waren.<sup>47</sup> Während die Antikörpertiter nach überstandener Infektion kontinuierlich fallen, können virus-spezifische T-Gedächtniszellen demzufolge über Jahre persistieren.<sup>45</sup>

Prognostisch bedeutsam für den Erkrankungsverlauf ist auch das Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten. Ein Zytokinsturm kann begünstigt werden durch eine hohe Zahl an Neutrophilen bei gleichzeitig vorliegender Lymphopenie.<sup>26,27,28,34,35,36,39,40,42</sup> Dieses Phänomen ist von verschiedenen respiratorischen Virusinfekten bereits bekannt, so kommen Lymphopenien auch bei Infektionen mit Influenza A H3N2, dem humanen Rhinovirus oder dem Respiratory Syncytial Virus vor, allerdings regenerieren sich die Lymphozyten hier zumeist innerhalb weniger Tage. Die COVID-19-assoziierte Lymphopenie hingegen persistiert über einen deutlich längeren Zeitraum.<sup>40,43</sup> Neu ist zudem, dass der Mangel an Lymphozyten selektiv die T-Zell-Linien



zu betreffen scheint, dabei wurde insbesondere ein Mangel an multifunktionalen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in verschiedenen Untersuchungen festgestellt.<sup>24,27,28,29,37,40,42</sup> Um dies zu quantifizieren, kann auch das sog. Neutrophilen-T-Lymphozyten-Ratio (NTR) bestimmt werden, welches nach Kuri-Cervantes et al. bei schwer erkrankten COVID-19-Patient\*innen um ein Vielfaches höher ausfiel, als bei Patient\*innen mit milden Verläufen.<sup>42</sup>

Interessanterweise ist eine negative Korrelation zwischen TNF- $\alpha$ - und IL-6-Levels und T-Zell-Zahlen in der Literatur beschrieben.<sup>28,34</sup> Dies legt eine Beeinflussung der T-Zell-Zahlen durch die genannten Zytokine nahe.<sup>34</sup> Nach Wang et al. würden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellzahlen zwischen dem 4. und 6. Erkrankungstag ihren Tiefpunkt erreichen, während die Zytokine in dieser Zeit auf dem höchsten Level seien.<sup>29</sup>

Für den Funktionsverlust von T-Zellen gibt es aber auch noch weitere Theorien. So wird auch die vermehrte Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie PD-1, auf der Oberfläche von T-Zellen diskutiert, ebenfalls vermittelt über die Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$ .<sup>28,31,34,45</sup> Dies wäre eine mögliche Erklärung für die guten Ergebnisse in den Immunantworten der Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie, die wir in unserer ImV-HOng-Studie ermitteln konnten, denn bei dieser Therapieform wird der genannte T-Zell-supprimierende Mechanismus ausgeschaltet.

#### **1.4 Immunreaktion bei Patient\*innen mit hämatoonkologischer Erkrankung**

Sowohl die hämatoonkologische Erkrankung und damit die betroffene(n) Zelllinie(n), als auch die Art und Dauer der aktiven systemischen onkologischen Therapie, nehmen maßgeblich Einfluss auf das Immunsystem. Auch das oftmals hohe Alter der Patient\*innen beeinflusst die Fähigkeit zur Generierung einer effizienten Immunantwort auf Impfungen.

Chemotherapien, Radiotherapien oder Infektionen verursachen Stress für die hämatopoetischen Stammzellen, die sich infolgedessen in ihrer Anzahl vermindern und ihre Fähigkeit zur adäquaten Regeneration verlieren. Bei den Zellen der unspezifischen Immunabwehr (v.a. Neutrophile, NK-Zellen, Monozyten) kommt es relativ schnell zur Regeneration nach akuten Stressereignissen, während insbesondere die T-Zellen als Bestandteil des spezifischen Immunsystems viel mehr Zeit benötigen, um quantitativ und qualitativ wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Diese gestörte T-Zell-Regeneration steht maßgeblich in Zusammenhang mit opportunistischen Infektionen.<sup>30,48</sup> Wie bereits im Abschnitt 1.3 beschrieben, führt eine Lymphopenie, verursacht durch proinflammatorische Zytokine, und insbesondere die Verminderung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, zu schweren Verläufen von SARS-CoV-2-Infektionen.<sup>24,27,28,29,37,48</sup>

Die Regeneration des B-Zell-Kompartimentes wird negativ beeinflusst durch immunsuppressive Therapien, Graft-versus-host disease (GvHD) und B-Zell-depletierende Therapien, dazu gehören monoklonale Anti-CD20-Antikörper, wie Rituximab. Nach allogener Stammzelltransplantation kann es bis zu 2 Jahre dauern, bis sich die B-Zellen vollständig erholt haben. Für die Produktion von Antikörpern ist zudem immer ein Zusammenwirken mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erforderlich. Sind diese in ihrer Zahl vermindert oder in ihrer Funktion eingeschränkt, kommt es ebenfalls zur Einschränkung der humoralen Immunantwort. Analog zu den T-Zellen ist auch bei den B-Zellen eine Verminderung in der zellulären Reserve mit zunehmendem Alter zu verzeichnen.<sup>30,48</sup>

Zusammenfassend ist bei hämatoonkologischen Diagnosen insbesondere die spezifische Immunabwehr mit den B- und T-Zell-Linien betroffen. Die Verminderung peripherer, insbesondere CD4-postiver T-Zellen, ist im Allgemeinen der Hauptgrund für die Immundefizienz von Krebspatient\*innen.<sup>48</sup>

Infolge der o.g. das Immunsystem betreffenden Pathomechanismen sind respiratorische Virusinfekte häufige Gründe für die erhöhte Morbidität und Mortalität

hämatonkologischer Patient\*innen. In einer Übersichtsarbeit zu respiratorischen Virusinfekten bei Stammzelltransplantierten und hämatonkologischen Patient\*innen wurden hohes Alter, Lymphopenie, zytoreduktive Therapien oder GvHD als Risikofaktoren für Infekte der unteren Atemwege (Pneumonien) genannt, welche mit hoher Mortalität assoziiert sind. Virale respiratorische Infekte sind sehr häufig. Mit großer Bandbreite angegeben sind die jeweils virusspezifischen Risiken für eine Progression von einem harmlosen Infekt der oberen zu einem komplizierten Infekt der unteren Atemwege und die jeweilige Mortalität. Für das Influenzavirus beispielsweise wurde eine Mortalität von bis zu 28%, für das Adenovirus sogar bis zu 73% angegeben, was deutlich über der Mortalität im Falle einer Ansteckung mit dem entsprechenden Virus durch Immunkompetente liegt.<sup>49</sup>

Wenige Studien beleuchten die impfinduzierte Immunantwort hämatonkologischer Patient\*innen. Es ergeben sich große Schwierigkeiten bei der Interpretation der publizierten Daten durch Verwendung verschiedener Untersuchungsmethoden und Endpunkte, sowie unterschiedlicher Definitionen bezüglich positiver Immunantworten.

In einer systematischen Übersichtsarbeit von La Torre et al. zu Influenza- und Pneumokokkenimpfungen bei hämatonkologischen Patient\*innen wird von einer deutlich reduzierten Mortalität im Falle einer Influenza-Infektion bei geimpften vs. nicht geimpften Patient\*innen (0% vs. 27%) berichtet, wobei die hierfür zitierte Studie eine Kohorte von lediglich 47 hämatonkologischen und 18 Patient\*innen mit soliden Tumoren umfasste.<sup>50</sup> Eine weitere in dieser Übersichtsarbeit aufgeführte Studie von Lluçà et al. zur Pneumokokkenimpfung bei splenektomierten Patient\*innen ermittelte Ansprechraten von 70%, unabhängig vom Grund der Splenektomie (hämatonkologische Diagnose vs. nicht-maligne hämatologische Erkrankung).<sup>51</sup> Eine weitere hier zitierte, ältere Studie von Braconier et al. zur Pneumokokken-Impfung konnte lediglich bei Hodgkin-Patient\*innen eine eingeschränkte Immunantwort feststellen, nicht aber bei anderen hämatonkologischen Diagnosen, während Robertson et al. eine eingeschränkte humorale Immunantwort für Patient\*innen mit Multiplem Myelom (MM) nachwies.<sup>52,53</sup> Zusammenfassend wurde jedoch eine Empfehlung für beide Impfungen und für alle hämatonkologischen Diagnosen bzw. Therapien ausgesprochen.<sup>9</sup>

Eine weitere Studie zur Influenza-Impfung beschreibt eine deutlich eingeschränkte Serokonversion bezüglich aller im trivalenten Impfstoff verwendeten Virusvarianten bei hämatonkologischen Patient\*innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Trotzdem

senke die Influenza-Impfung die Mortalität laut dieser Studie erheblich. Entscheidend sei dabei vor allem der Zeitpunkt der Impfung, wobei dieser mindestens 2 Wochen vor Beginn der Chemotherapie liegen sollte.<sup>54</sup>

Ljungman et al. untersuchte in einer kleinen Kohorte 70 hämatoonkologische Patient\*innen mit Lymphom, Myelodysplastischem Syndrom (MDS), AL, MM oder MPN, dahingehend, ob eine zweite Dosis Influenza-Vakzin zu einer Verbesserung der humoralen Immunantwort führe, was im Fazit klar negiert wurde. Hierbei zu beachten sind die kleine, sehr heterogene Studienpopulation und die Definition einer positiven Impfreaktion, für die Ljungman einen Anstieg des Titers um mindestens das 4fache voraussetzte.<sup>11</sup> Trotzdem konnte dieses Ergebnis auch in anderen Studien und für andere Impfungen, beispielsweise für die Pneumokokken-Impfung, bestätigt werden.<sup>9,10</sup> Dennoch empfiehlt die DGHO in ihren Leitlinien zur Impfung bei Tumorpatient\*innen die 2. Influenza-Impfung für akute lymphatische Leukämie (ALL)-, Lymphom-, MM- und MPN-Patient\*innen, verweist dabei aber auf die schwache Evidenz dieser Empfehlung.<sup>12</sup>

Vijenthira et al. untersuchte in einer systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse die Immunantwort auf verschiedene Impfungen bei insgesamt 905 Patient\*innen unter Anti-CD20-Therapie. Patient\*innen unter aktiver Therapie (vor  $\leq 3$  Monate beendet) zeigten stark verminderte Serokonversionsraten für alle untersuchten Impfungen (Influenza, Diphtherie, Pertussis, Tetanus, Haemophilus influenzae B, Hepatitis B und A, Polio und Pneumokokken) mit Serokonversionsraten zwischen 0 und 25%. Patient\*innen mit lymphoproliferativer Erkrankung ohne Anti-CD20-Therapie zeigten dagegen deutlich höhere Serokonversionsraten, teilweise bis zu 80%. Eindeutige Aussagen zur zellulären Immunantwort konnten hingegen nicht getroffen werden.<sup>55</sup>

CLL- und Patient\*innen mit Lymphoplasmazytischem Lymphom (M. Waldenström) unter Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor (BTKi)-Therapie wurden in einer Studie nach Zent et al. auf ihre Immunantwort nach zweifacher Impfung mit rekombinantem Varizella-Zoster-Glykoprotein-E (VZgE)-Impfstoff hin untersucht. Auch unter dieser Therapie kam es zu Einschränkungen der humoralen Immunantwort: Nur 24 von 32 Patient\*innen erreichten positive Titer. Die Hälfte der 8 seronegativen Patient\*innen hatte trotzdem eine nachweisbare zelluläre Immunantwort mit VZgE-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, was erneut die Rolle der T-Zellen in der Immunreaktion verdeutlicht. Ein weiteres Resultat

der genannten Studie war die signifikante Assoziation zwischen Dauer der BTKi-Therapie und niedrigen VZ-spezifischen IgG-Titern.<sup>56</sup>

Ein anderes Fazit wurde in einer Studie nach Pleyer et al. gezogen, in der die Immunantwort auf rekombinante Hepatitis B- und Varizella Zoster-Impfungen von CLL-Patient\*innen ohne Therapie mit der von CLL-Patient\*innen unter BTKi verglichen wurde. Eine deutlich eingeschränkte Serokonversion bei Patient\*innen unter BTKi konnte hier nur für die Hepatitis-B-Impfung gezeigt werden. Hier wurde nur ein Patient seropositiv, während in der Kontrollgruppe ohne Behandlung immerhin 9 Patient\*innen (28,1%) positive Titer erreichten. Für die Varizella-Zoster-Impfung konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, ganz im Gegensatz zu den Resultaten der zuvor genannten Studie.<sup>57</sup>

Ganz anders verhält es sich bei den Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie. In einer Studie von Bersanelli et al. zeigten diese ausgezeichnete Serokonversionsraten auf die Influenza-Impfung, die nicht nur besser waren als die anderer Krebspatient\*innen, sondern teilweise auch besser als die von gesunden Kontrollen. Zurückzuführen ist dies auf die Aktivierung von unter normalen Bedingungen über Programmed cell death ligand (PD-L1) gehemmten T-Zellen. Umgekehrt beobachtete man aber auch das paradoxe immunologische Phänomen, dass trotz besserer Immunantworten auf die Impfungen mehr Influenza-Infektionen unter den geimpften Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie (ICI) -Patient\*innen auftraten, wohl verursacht durch verminderte T-Zell-Regulation, vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Hyperinflammation.<sup>58</sup>

Zusammenfassend ist bei hämatoonkologischen Patient\*innen und Patient\*innen unter soliden Tumoren mit Einschränkungen der Immunantwort zu rechnen. Trotzdem oder gerade deswegen sind Impfungen für diese Menschen von enormer Bedeutung, um zumindest schwere oder tödliche Krankheitsverläufe zu reduzieren, wenngleich dies nicht bei allen Patient\*innen gelingt. Mögliche Strategien zur Verbesserung der Immunantwort sind Auffrischungsimpfungen, die Verwendung höher dosierter Impfdosen oder der Zusatz von Adjuvantien, wozu die Datenlage jedoch teilweise widersprüchlich ist.<sup>9,11,12,54,55</sup> Einzelne Therapien müssen besonders in den Fokus genommen werden, dazu zählen die B-Zell-depletierenden Therapien, allogene Stammzelltransplantation und ICI. Ob und wie diese Aussagen sich in unserer Studie widerspiegeln, soll im Folgenden beleuchtet werden.

## **1.5 Vorstellung der ImV-HOng-Studie (DRKS00027372)**

### **Studiendesign**

ImV-HOng ist eine prospektive, multizentrische Studie unter dem Dach der Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (OSHO). Neben der Studienzentrale, dem Krukenberg Krebszentrum Halle, waren 6 weitere Zentren aus Sachsen und Sachsen-Anhalt vertreten, so das Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg, die Gemeinschaftspraxis Dr. med. Gabriele Prange-Krex und Dr.med. Johannes Mohm aus Dresden, die Internistisch-onkologische Praxis Dr. med. Bettina Peuser aus Leipzig, das MVZ mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Dr. med. Maik Schwarz) aus Schöneck, die hämatologisch-onkologische Gemeinschaftspraxis Dr. med. Claudia Spohn und Dr. med. Regina Moeller aus Halle (Saale) und die Gemeinschaftspraxis für Hämatologie, Onkologie und Gastroenterologie (Dr. med. Timo Behlendorf) aus Halle (Saale).

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Länder Sachsen-Anhalt und Sachsen, sowie des Universitätsklinikums Halle begutachtet und bewilligt. Zudem erfolgte eine Registrierung im Paul-Ehrlich-Institut (NIS 584) und im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS00027372). Finanzielle Unterstützung erhielt das Projekt von der Deutschen Leukämie- und Lymphomstiftung.

### **Endpunkte**

Primärer Endpunkt der Studie stellte die Ermittlung der humoralen Immunantwort bei Patient\*innen mit hämatoonkologischer Erkrankung am Tag 35 (+/- 7) nach erster COVID-19-Impfung im Vergleich zu einer Referenzkohorte, bestehend aus Proband\*innen ohne Tumorerkrankung, dar.

Zudem wurden zahlreiche sekundäre Endpunkte betrachtet. IgG-Antikörper-Titer gegen das SARS-CoV-2-spike-Protein wurden zusätzlich vor Impfung und am Tag 120 (+/-14 Tage) nach 1. Impfung bestimmt, um zum einen eine latente SARS-CoV-2-Infektion vor Impfung als Einflussfaktor auf die humorale Immunantwort zu ermitteln, und zum anderen um die Persistenz der SARS-CoV-2-spezifischen IgGs über eine Dauer von 4 Monaten zu untersuchen. Zusätzlich ließen wir COVID-19-spezifische T-Zellen (CovCD4<sup>+</sup> und CovCD8<sup>+</sup>) als Ausdruck der zellulären Immunantwort zum Tag 120 (+/14) nach 1. Impfung bestimmen, um eine umfassendere Beurteilung der Immunreaktion vornehmen und gleichzeitig mögliche Korrelationen zwischen humoraler

und zellulärer Ebene ermitteln zu können. Darüber hinaus nahmen wir subgruppenspezifische Analysen der Immunantwort vor, unterteilt nach Krankheitsentität und Therapie.

### **Ein- und Ausschlusskriterien**

Zwischen März und Dezember 2021 wurden 398 Studienteilnehmer eingeschlossen, darunter 262 Patient\*innen (n=135 mit myeloischer, n=108 mit lymphatischer und n=19 Patient\*innen unter PD-L1-Inhibitor-Therapie). Zu den myeloischen Erkrankungen wurden die akute myeloische Leukämie, MDS und MPN gezählt. In die Gruppe der lymphatischen Gruppe zählten Lymphome (Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) oder Hodgkin-Lymphom (HL)), CLL und das MM. Zudem wurden 136 Proband\*innen ohne Tumorerkrankung eingeschlossen, welche die Kontrollgruppe darstellten. Zu weiteren Einschluss- und Ausschlusskriterien siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien für Patienten und Probanden

	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>
Einschlusskriterien	<p>Alter <math>\geq</math> 18 Jahre</p> <p>Eine der folgenden Diagnosen zutreffend:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Myeloische Erkrankung</li> <li>- Lymphatische Erkrankung</li> <li>- Solide Tumoren unter PD-L1-Inhibition</li> </ul>	<p>Alter <math>\geq</math> 18 Jahre</p> <p>Keine aktive Krebserkrankung in den letzten 5 Jahren</p>
Ausschlusskriterien	<p>Kontraindikationen gegen eine SARS-CoV-2-Impfung</p> <p>Fehlende Einwilligung</p> <p>Eine der o.g. Diagnosen mit Remissionsdauer <math>\geq</math> 5 Jahre</p>	<p>Kontraindikationen gegen eine SARS-CoV-2-Impfung</p> <p>Fehlende Einwilligung</p> <p>Krebserkrankung in den letzten 5 Jahren</p>

## **Methodik**

Gemäß der Deklaration von Helsinki gaben alle Teilnehmenden schriftlich ihr Einverständnis. In standardisierten Fragebögen wurden Alter, Geschlecht, bekannte SARS-CoV-2-Infektion in der Vergangenheit, Begleiterkrankungen und Begleitmedikation eines jeden Teilnehmers, sowie Daten zu den COVID-19-Impfungen erfasst. Krankheitsspezifische Daten der Patient\*innen wurden aus den jeweiligen Krankenakten entnommen.

Von jedem Teilnehmer wurde zu 3 Zeitpunkten (vor Impfung, d35 und d120 nach der 1. Impfung) jeweils 10ml Blut entnommen. Zu allen genannten Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der humoralen Immunantwort. Die zelluläre Immunreaktion wurde einmalig zum d120 bestimmt.

Zur Bestimmung der humoralen Immunantwort wurden die IgG-Antikörper-Titer gegen das SARS-CoV2-spike-Protein mittels Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 Assay der Firma Roche im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle ermittelt. Dazu erfolgte die Messung der Receptor-binding domain (RBD) der IgG Antikörpertiter mittels S1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Zur Beurteilung der zellulären Immunantwort erfolgte die Bestimmung der triple-positiven ( $\text{TNF}\alpha^+$ ,  $\text{IFN}\gamma^+$ ,  $\text{IL-2}^+$ ) COVID-19-spezifischen T-Zellen ( $\text{CovCD4}^+$  und  $\text{CovCD8}^+$ ) aus der Blutprobe zum Zeitpunkt d120 (+/-14) nach 1. Impfung via Durchflusszytometrie im Zentrallabor der Universitätsmedizin Rostock.

Daneben wurde der Immunstatus der Patient\*innen, sofern er maximal 3 Monate vor Erstimpfung bestimmt worden war, in die Betrachtung aufgenommen. Daraus ermittelt wurden u.a. die absoluten und relativen Zahlen der B-Zellen, sowie der  $\text{CD4}^+$ -T-Helferzellen und der  $\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen.

Zur detaillierten Betrachtung des Ablaufes der ImV-HOng-Studie sei auf Abbildung 4, S. 20: „Fließschema zum Ablauf der ImV-HOng-Studie“, verwiesen.



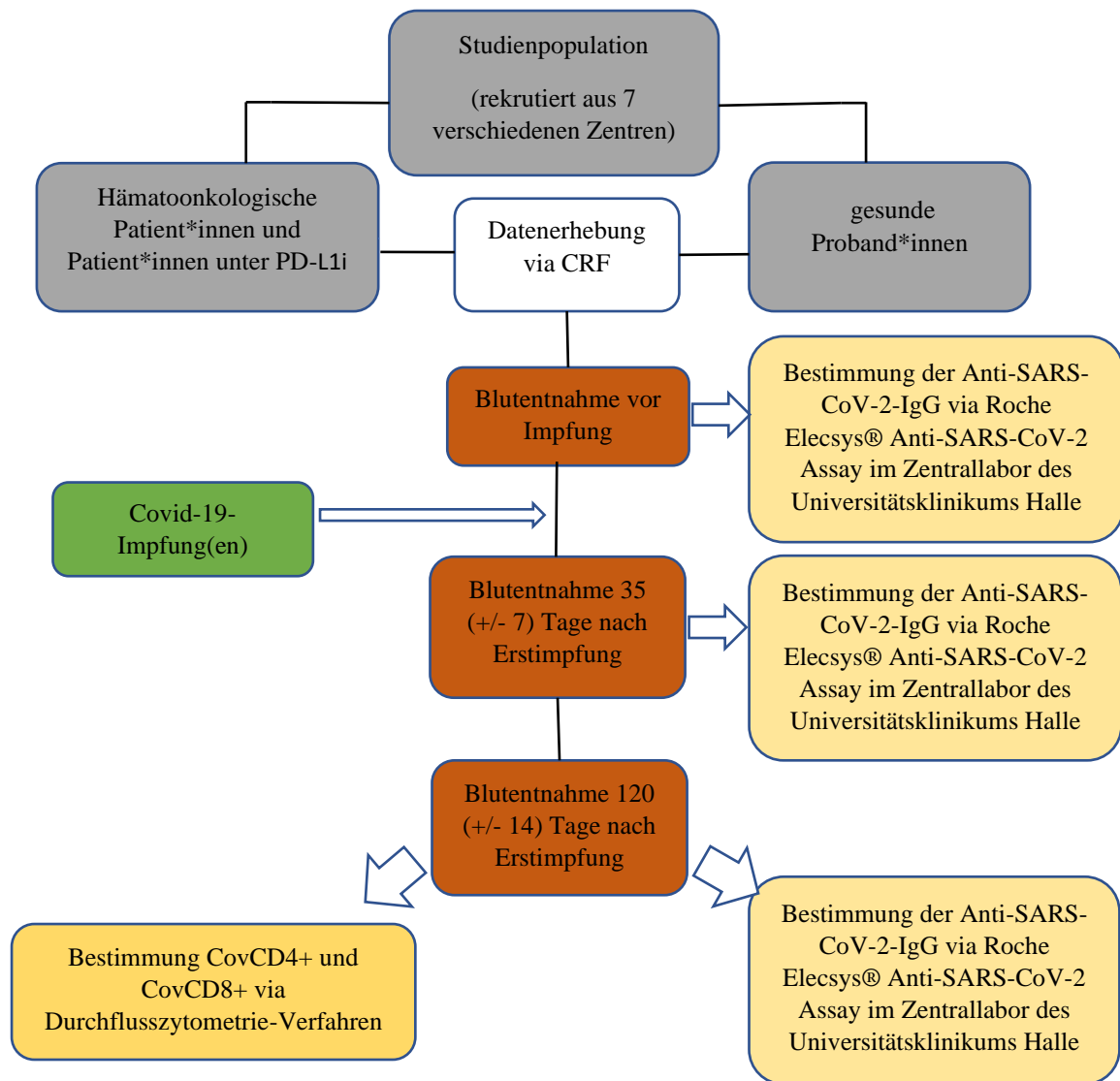


Abbildung 4: Fließschema zum Ablauf der ImV-HOng-Studie

Erstellt von Sabrina Jotschke am 16.08.2022 mit PowerPoint.

### **Patientencharakteristika**

Insgesamt eingeschlossen wurden 398 Studienteilnehmer, davon erhielten nur 385 tatsächlich eine Impfung und konnten somit in die Auswertung einbezogen werden (Patienten n=252 und Kontrollen n=133). Die Patient\*innen hatten ein höheres medianes Alter als die Kontrollen (62 vs. 54 Jahre).

Die größte Patientengruppe war die der myeloisch Erkrankten (n=131), gefolgt von der Gruppe lymphatisch Erkrankter (n=108). Die kleinste Subgruppe wurde durch die Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie repräsentiert (n=17). Zur Verteilung der Krankheitsentitäten, der spezifischen onkologischen Therapien innerhalb der Patientengruppen, stattgehabten COVID-19-Infektionen vor Impfung und impfkorrelierten Faktoren siehe „Table 2: Baseline characteristics of vaccinated study population“ nach Jotschke et al. (Publikationsteil, Publikation 1).

## **2. Diskussion**

### **2.1 Humorale Immunantwort unter COVID-19-Impfung bei hämatologischen Patient\*innen**

Die Ergebnisse der ImV-HOng-Studie zeigten über die Beobachtungszeit konstante oder sogar verbesserte Serokonversionsraten und mediane Anti-spike-IgG-Titer in allen untersuchten Kohorten. Erwartungsgemäß konnten für die Kontrollgruppe höhere Serokonversionsraten an d35 im Vergleich zur Patientengruppe ermittelt werden (98% vs. 68%,  $p < 0.001$ ). Allerdings kam es über alle Patientenkohorten hinweg zu einer deutlichen Steigerung der Serokonversionsraten an d120 (für Patient\*innen unter PD-L1-Therapie von 81% auf 100%, myeloische Patient\*innen von 82% auf 97% und lymphatische Patient\*innen von 48% auf 66%). Die myeloischen und Patient\*innen unter PD-L1-Therapie erzielten damit an d120 vergleichbar gute Serokonversionsraten wie die Kontrollgruppe. Obwohl sie die Kohorte mit dem schlechtesten Ergebnis bezüglich der humoralen Immunantwort darstellten, zeigten auch die lymphatisch Erkrankten überraschenderweise eine deutliche Verbesserung von d35 zu d120, sodass auch für diese Kohorte zeitlich stabile und sogar steigende humorale Immunität nachgewiesen werden konnte. Die schlechteren Resultate dieser Kohorte sind dabei vor allem auf die lymphatischen Patient\*innen unter B-Zell-depletierenden Therapien zurückzuführen, die an d35 eine Serokonversionsrate von nur 13% aufwiesen und damit das Gesamtergebnis der Kohorte maßgeblich negativ beeinflussten. Im Gegensatz zum üblicherweise beobachteten Anstieg der IgG-Titer von d35 zu d120, erzielte zudem kein/e einzige/r Patient\*in unter B-Zell-depletierender Therapie positive Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer an d120. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom Impfintervall und dem verwendeten Impfstoff, sodass impfkorrelierte Faktoren keinen Einfluss auf die humorale Immunantworten zu haben schienen.

Weltweit wurde die humorale Immunantwort auf die COVID-19-Impfstoffe bei hämatologischen Patient\*innen in verschiedenen Studien untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse sollen im Folgenden vergleichend zu unseren Ergebnissen der ImV-HOng-Studie betrachtet werden.

Die humorale Immunantwort auf die COVID-19-Impfstoffe bei Krebspatient\*innen im Allgemeinen wurde einer Studie von Addeo et al. untersucht. Hierbei wurden die Anti-SARS-CoV-2-Antikörpertiter bei 131 Krebspatient\*innen nach Erstimpfung und ein zweites Mal 22 bis 24 Tage nach Zweitimpfung gemessen. Neben soliden Tumoren

befanden sich 25 Patient\*innen mit hämatoonkologischer Erkrankung unter den Teilnehmern. Während die mittlere Serokonversionsrate aller Patient\*innen bei 94% lag, war sie mit nur 77% bei den hämatoonkologisch Erkrankten signifikant niedriger, was die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen der Immunantwort von hämatoonkologischen Patient\*innen verdeutlicht.<sup>59</sup>

Die auch in unserer ImV-HOng-Studie ermittelte Einschränkung der humoralen Immunantwort bei hämatoonkologischen Patient\*innen wurde unter anderem in einer Studie nach Diefenbach et al. mit 53 NHL-, HL- und CLL-Patient\*innen nachgewiesen. Am stärksten eingeschränkt schien auch hier die Immunantwort bei Patient\*innen unter Anti-CD20-Antikörpertherapie zu sein. Wie in der ImV-HOng-Studie erzielten in dieser Studie nur 13% der Patient\*innen neutralisierende Antikörper. Zu bemängeln ist die fehlende gesunde Referenzkohorte und die kleine Stichprobenzahl.<sup>60</sup>

Herishanu et al. untersuchte 167 CLL-Patient\*innen im Vergleich zu 52 gesunden Kontrollsubjekten hinsichtlich ihrer humoralen Immunreaktion 2 bis 3 Wochen nach zweiter Impfdosis. Auch bei dieser Untersuchung zeigten sich signifikant geringere Serokonversionsraten als bei den gesunden Kontrollen und besonders geringe Ansprechraten bei Patient\*innen unter Anti-CD20-Antikörper-Therapien, was sich erneut mit unseren Beobachtungen deckt.<sup>61</sup>

Untersuchungen nach Parry et al. mit 299 CLL-Patient\*innen und 93 gesunden Kontrollen führten zu ähnlichen Ergebnissen, wobei hier, wie in der ImV-HOng-Studie, neben dem BNT162b2-Impfstoff auch Impfungen mit ChAdOx1 berücksichtigt wurden.<sup>62</sup>

Ebenfalls deutlich erniedrigte IgG-Titer bei Patient\*innen im Vergleich zu Kontrollen wurden in einer Studie von Maneikis et al. gefunden, wobei hier eine große Kohorte von 857 hämatoonkologischen Patient\*innen, darunter MDS-, CLL, MM-, NHL-, MPN- und HL-Erkrankte, untersucht wurde, indem Anti-S1-IgG-Titer am Tag der Zweitimpfung mit BNT162b2 und 7 - 21 Tage danach im Vergleich zu Titern 68 gesunder Kontrollen bestimmt wurden. Es zeigte sich zudem eine deutlich heterogene humorale Immunantwort unter den hämatoonkologisch Erkrankten aufgrund der Vielfalt an Krankheitsentitäten. Zu dieser wichtigen Erkenntnis waren wir auch in der ImV-HOng-Studie gelangt.<sup>63</sup>

## **2.2 Zelluläre Immunantwort unter COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen**

Bezüglich der zellulären Immunantwort konnten in unserer ImV-HOng-Studie weitgehend unabhängig von der Serokonversion gebildete COVID-19-spezifische  $IL2^+INF\gamma^+TNF\alpha^+$ - $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen (Cov $CD4^+$  und Cov $CD8^+$ ) in allen untersuchten Kohorten gefunden werden. Hervorzuheben ist dabei die Kohorte der lymphatischen Patient\*innen, die bei der humoralen Immunantwort zwar die schlechtesten Ergebnisse erzielt hatten, sich bezüglich der zellulären Immunantwort jedoch vergleichbar gut wie die Kontrollgruppe präsentierten. 71% der lymphatischen Patient\*innen erzielten Cov $CD4^+$  und 31% Cov $CD8^+$ , im Vergleich zu 74% Cov $CD4^+$  und 42% Cov $CD8^+$  bei den Kontrollen. Erwähnenswert ist zudem, dass ein beträchtlicher Teil der lymphatisch Erkrankten ohne nachweisbare Anti-SARS-CoV-2-Antikörper an d120 trotzdem zelluläre Immunantworten aufwies. Auffallend ist, dass sich die  $CD4^+$ -T-Zellen über alle Kohorten hinweg zahlenmäßig überlegen gegenüber den  $CD8^+$ -T-Zellen zeigten. Dies kann als Indiz für die wichtige Rolle der COVID-19-spezifischen T-Helferzellen in der Immunabwehr gegen SARS-CoV-2 gewertet werden.

Die Entwicklung einer zellulären Immunität auf eine COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen wurde neben der ImV-HOng-Studie in einer bisher überschaubaren Anzahl von weiteren Studien untersucht. Die Ergebnisse dieser Projekte sollen im Folgenden vergleichend zu unseren beleuchtet werden.

Nach Kwok et al. weist eine Reihe von COVID-19-genesenen Patient\*innen keine neutralisierenden Anti-SARS-CoV-2-Antikörper auf, bei der Mehrzahl sind jedoch  $CD4^+$ - und/oder  $CD8^+$ -T-Gedächtniszellen nachweisbar. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle der zellulär vermittelten Immunität. Die COVID-19-Impfungen sollten demzufolge nicht ausschließlich auf Grundlage des Antikörpertiters, sondern immer unter Berücksichtigung der T-Zell-Antwort hinsichtlich ihrer Effektivität beurteilt werden. Hämatoonkologischen Patient\*innen wird dabei eine besondere Rolle zugesprochen.<sup>64</sup>

14 hämatoonkologische Patient\*innen mit NHL, CLL, Morbus Waldenström und ALL, welche nach COVID-19-Impfung seronegativ geblieben waren, wurden in einer Studie nach Albichr et al. hinsichtlich ihrer zellulären Immunität untersucht. 9 dieser 14 Patient\*innen hatten nachweisbare zelluläre Immunantworten, sodass hier die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass es keine Korrelation zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort gibt und ein beträchtlicher Anteil seronegativer Patient\*innen

trotzdem eine Immunität gegen COVID-19 auf zellulärer Ebene entwickeln kann. Alle 14 Patient\*innen waren unter Therapie mit dem BTKi Ibrutinib und/oder unter Anti-CD20-Antikörpertherapie, z.B. mit Rituximab. Obwohl die Antikörperantworten signifikant geringer waren als bei den gesunden Kontrollen, so zeigten sich die zellulären Immunantworten in ihrer Intensität etwa vergleichbar. Trotz der kleinen Kohorte decken sich die Erkenntnisse dieser Studie gut mit den von uns gemachten Beobachtungen.<sup>65</sup>

Malard et al. berichtet über eine Studie mit 239 hämatoonkologischen Patient\*innen, darunter 136 lymphatisch und 59 myeloisch Erkrankte, in der nach BNT162b2-Impfung neben der humoralen auch die T-Zell-Antwort am Tag 42 nach Zweitimpfung untersucht wurde. Mit den Ergebnissen der ImV-HOng-Studie übereinstimmend ist die ermittelte Steigerung der T-Zell-Aktivitäten nach Impfung, die auch bei einem Teil der Patient\*innen ohne schützenden IgG-Titer nachgewiesen wurde. Abweichend ist dagegen das hier formulierte Resultat, dass nur in 66% aller Patient\*innen humorale und/oder zelluläre Immunantworten nachgewiesen werden konnten. Zudem wird über eine eindeutige Korrelation zwischen Anti-S-IgG-Titer an Tag 42 und der T-Zell-Antwort berichtet, die wir nicht finden konnten. Eine mögliche Erklärung für die schlechteren Resultate in der humoralen Immunantwort dieser Studie liegt im hier definierten Cut-off-Wert von  $\geq 3100$  U/ml für einen ausreichend hohen IgG-Titer, während in der ImV-HOng-Studie ein Cut-off-Wert für positive IgG-Titer von  $> 0.8$  U/ml Anwendung fand. Gründe für die Unterschiede in den Ergebnissen zur zellulären Immunantwort könnten in den unterschiedlichen Analysezeitpunkten (d42 nach Zweitimpfung vs. d120 nach Erstimpfung) liegen.<sup>66</sup>

270 hämatoonkologische Patient\*innen wurden in einer Studie nach Jiménez et al. einen Monat nach zweiter mRNA-1273-Impfung hinsichtlich ihrer humoralen und zellulären Immunantwort untersucht, dabei zeigten 76,3% eine humorale und 79% der Patient\*innen eine zelluläre Immunantwort. Eine deutlich beeinträchtigte Serokonversionsrate zeigte sich wieder bei Lymphom-Patient\*innen unter Anti-CD20-Therapie. Die zelluläre Immunreaktion schien durch diese Therapieform jedoch unbeeinflusst zu bleiben, denn bei 71% dieser Patient\*innen war trotzdem eine zelluläre Immunantwort nachweisbar. Somit zeigte sich für Patient\*innen unter Anti-CD20-Therapie die größte Dissoziation zwischen humoraler und zellulärer Immunität. Dies entspricht den Erkenntnissen bezüglich Lymphom-Patient\*innen unter Anti-CD20-Therapie, die wir auch in der ImV-HOng-Studie mit unseren Untersuchungen erzielt haben.<sup>67</sup>

Eine Kohorte ausschließlich bestehend aus Lymphom-Patient\*innen unter Anti-CD20-Antikörpertherapie wurde in einer Studie nach Liebers et al. untersucht. Bezüglich der Serokonversionsrate wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie in der Kohorte der lymphatisch erkrankten Patient\*innen der ImV-HOng-Studie an d35 (41% vs. 48%). Der Nachweis von COVID-19-spezifischen T-Zellen lag etwas unter dem Wert der ImV-HOng-Studie für lymphatisch Erkrankte (58% vs. 71%), allerdings unterschieden sich auch die Zeitpunkte der Bestimmung (d17 nach Zweitimpfung vs. d120 nach Erstimpfung). Zudem wurde über positive T-Zell-Antworten in Patient\*innen ohne Serokonversion berichtet, hier in etwa 50% der Fälle. Die T-Zell-Antwort wurde, im Gegensatz zu humoralen Immunantwort, als unabhängig von Chemotherapie oder der Behandlung mit Anti-CD20-Antikörpern beschrieben, was sich mit den Erkenntnissen aus der zuvor beschriebenen Studie nach Jiménez et al. und auch mit den Erkenntnissen unserer ImV-HOng-Studie deckt.<sup>68</sup>

Stark von den in unserer ImV-HOng-Studie ermittelten Ergebnisse abweichende Resultate wurden in einer Untersuchung nach Harrington et al. ermittelt. Hier wurde kleine Kohorte von 16 CML-Patient\*innen 21 Tage nach Erstimpfung mit BNT162b2 auf ihre humorale und zelluläre Antwort hin begutachtet. 14/16 Patient\*innen (87,5%) entwickelten Anti-Spike-IgGs und 14/15 (93,3%) zeigten T-Zell-Antworten. Triple-positive ( $\text{TNF-}\alpha^+$ ,  $\text{IL-2}^+$ ,  $\text{IFN-}\gamma^+$ ) COVID-19-spezifische  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen wurden in 80%,  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen in 60% der Patient\*innen gefunden. Diese herausragenden Ergebnisse beruhen wohl auf der kleinen Kohorte und dem jungen Alter der ausgewählten Patient\*innen (Durchschnitt: 45 Jahre), was die Realität mit häufig eher alten und multimorbiden Patient\*innen nicht gut abbildet.<sup>69</sup>

Die Rolle der zytotoxischen COVID-19-spezifischen  $\text{CD8}^+$ -Zellen in hämatoonkologischen Patient\*innen wurde unter anderem von Bange et al. untersucht. Hier stellte man fest, dass hämatoonkologisch erkrankte Personen zwar im Allgemeinen eine geringere SARS-CoV-2-spezifische Antikörperantwort aufweisen, allerdings trotzdem in 77% dieser Patient\*innen COVID-19-spezifische T-Zellen gefunden werden konnten, sogar unter Anti-CD20-Therapie. Dies deckt sich erneut gut mit den von uns gemachten Beobachtungen.<sup>70</sup>

Zusammenfassend stimmen die in der ImV-HOng-Studie ermittelten Ergebnisse vielfach mit den bisher in der Literatur beschriebenen überein, insbesondere bezüglich des Einflusses der Krankheitsentitäten auf die Serokonversion und die COVID-19-

spezifischen T-Zell-Antworten. Die von uns getroffene Annahme, dass Impfungen auch bei fehlender humoraler Antwort einen gewissen Schutz über T-Zell-Antwort bieten könnten, lässt sich mit den Ergebnissen verschiedener Studien stützen. Aufgrund der zu kleinen Kohorten konnten die verschiedenen Therapiegruppen der ImV-HOng-Studie zwar nur explorativ analysiert werden, doch auch die dabei erzielten Erkenntnisse decken sich gut mit den bisher in der Literatur publizierten Daten. Größere Abweichungen sind in den meisten Fällen durch abweichende Zusammensetzungen der Kohorten, unterschiedliche Stichprobengrößen, das Verwenden unterschiedlicher Cut-off-Werte für humorale und/oder zelluläre Immunantworten oder unterschiedliche Analysezeitpunkte in Bezug auf die COVID-19-Impfstoffe erklärbar.

### **2.3 Limitationen der Studie**

Obwohl als Goldstandard für die Anti-SARS-CoV-2-IgG-Messung beschrieben, führten wir keine spezifische Messung der neutralisierenden Antikörper (NAbs) durch, sondern bezogen uns auf den von der Firma Roche empfohlenen und wissenschaftlich fundierten Grenzwert von 15 U/ml für die Ausbildung von NAbs, um Vorhersagen bezüglich dieser abzuleiten zu können.<sup>60</sup>

Des Weiteren kam es nach Studienstart im März 2021 zu einer politisch angeordneten Änderung der Impfintervalle von 21 auf bis zu 42 Tage. Dies hatte Einfluss auf die gemessenen Anti-SARS-CoV-2-IgG-Titer an Tag 35. Nach Rücksprache mit dem Statistiker wurde deshalb das Impfintervall als separate Variable in die Auswertung aufgenommen und ein Regressionsmodell erstellt. Über das Aufteilen der Studienteilnehmer in 2 nahezu gleich große Gruppen (Impfintervall > 35 Tage und ≤ 35 Tage) ließ sich die entstandene Beeinflussung der Ergebnisse herausrechnen.

Das mediane Alter der Patientengruppe war signifikant höher als das der Kontrollgruppe (62 vs. 54 Jahre,  $p < 0.001$ ). Dies führte zwar einerseits zur Ungleichheit zwischen den beiden Gruppen und kann als Kritikpunkt an der Vergleichbarkeit beider Gruppen bezüglich ihrer Immunantwort gesehen werden. Andererseits ist das höhere mediane Alter der Patient\*innen im Vergleich zur gesunden Kohorte aber repräsentativ für die Verhältnisse in der Gesamtbevölkerung, da hämatoonkologische Diagnosen zumeist in einem höheren Alter gestellt werden. Die Variable „Alter“ ist entsprechend in die Analysen aufgenommen und als möglicher Einflussfaktor berücksichtigt worden.

Ein weiteres Problem stellte die Vielfalt an tumorentitätsspezifischen Therapien dar. Die Kohorten für die jeweils spezifischen Therapie waren zu klein, um hier deskriptiv analysieren zu können, stattdessen erfolgte ein exploratives Vorgehen. Zu betonen ist, dass die Untersuchung des Einflusses verschiedener Therapien auf die Immunantwort lediglich einen sekundären Endpunkt unserer Studie darstellte und nicht unser Primärziel war. Um fundiertere Aussagen bezüglich der Immunantwort unter einzelnen Therapien bei hämatoonkologischen Patient\*innen treffen zu können, sind also weiterführende Studien obligat.



Diese Studie untersuchte lediglich die Immunreaktion auf eine SARS-CoV-2-Impfung, woraus nicht direkt auf eine Schutzwirkung geschlossen werden kann. Noch immer fehlen Antikörper- und Grenzwerte für T-Zell-Aktivität, die den Schutz vor einer Infektion und/oder einem schweren Krankheitsverlauf zuverlässig vorhersagen.<sup>71</sup> Um auch eine Aussage bezüglich der anhaltenden Schutzwirkung durch die COVID-19-Impfstoffe treffen zu können, ist ab Herbst 2022 eine weitere Bestimmung des humoralen und zellulären Immunstatus 12 (+/- 6) Monate nach Erstimpfung bei den bereits eingeschlossenen Patient\*innen des Universitätsklinikums Halle (monozentrisch) in Planung. Erfasst werden sollen hierbei auch die eventuell in der Zwischenzeit erfolgten Auffrischungsimpfungen und durchgemachten SARS-CoV-2-Infektionen. Ein entsprechendes Amendment des ImV-HOng-Studienprotokolls wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Juli 2022 bewilligt.

## **2.4 Bedeutung und Zusammenfassung**

Die ImV-HOng-Studie ist eine prospektive, multizentrische Studie und zählt mit einer Stichprobengröße von 398, darunter 262 Patient\*innen, bis dato zu einer der größten auf ihrem Themengebiet. Darüber hinaus handelt es sich um eine Longitudinalstudie, welche die Beurteilung der Immunreaktion nicht nur zu einem konkreten Zeitpunkt, sondern auch im zeitlichen Verlauf, ermöglicht. Zudem erfolgte eine umfassende Beurteilung der Immunreaktion, die nicht nur die humorale Achse und damit die B-Zell-Linie mit der Antikörperproduktion in den Fokus nahm, sondern über die Bestimmung von CovCD4<sup>+</sup> und CovCD8<sup>+</sup> auch die zelluläre Immunität. Alle bis zum Dezember 2021 auf dem deutschen Markt verfügbaren Impfstoffe wurden in unseren Analysen berücksichtigt, ebenso verschiedenste Krankheitsentitäten und Therapieformen aus dem hämatoonkologischen Bereich.

Die zahlreichen, bereits zum Thema publizierten und hier teilweise zitierten Studien weisen deutliche Limitationen auf, die jeweils genannt sind. So wurde oft nur mit kleinen Patientenkohorten gearbeitet. Viele Studien zu Impfungen bei Krebspatient\*innen im Allgemeinen sind alt und methodisch uneinheitlich. Die Datenlage ist heterogen und die Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zueinander.

Die ImV-HOng-Studie leistet einen wichtigen Beitrag zur Thematik „COVID-19-Impfung bei hämatoonkologischen Patient\*innen“. Es fanden sich vielfach Übereinstimmungen zwischen den bereits in der Literatur beschriebenen und unseren in der ImV-HOng-Studie erzielten Ergebnissen, zudem konnten auch einige neue Erkenntnisse, insbesondere bezüglich der tumorentitätsspezifischen Immunantworten, gewonnen werden.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse zwar für eine leicht eingeschränkte Immunreaktion hämatoonkologisch erkrankter Patient\*innen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung, besonders, was die humorale Immunantwort betrifft. Überraschenderweise entwickelten aber fast alle Patient\*innen, über alle Alters-, Diagnose- und Therapiegruppen hinweg, bis zum d120 humorale und/oder zelluläre Immunantworten. Was dies für die Schutzwirkung und -dauer bezüglich einer SARS-CoV-2-Infektion bedeutet, muss in fortlaufenden Studien untersucht werden. Erkenntnisse dazu wird auch die Fortsetzung unserer ImV-HOng-Studie mit der Betrachtung der Immunantwort und durchgemachten Infektionen 12 (+/- 6) Monate nach Erstimpfung leisten.

### **3. Literaturverzeichnis**

- 1 World health organization (WHO), Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19 -March 2020. [cited: 2022-03-21].  
[https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19 ---11-march-2020](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020)
- 2 World health organization (WHO), Coronavirus (COVID-19) dashboard, COVID-19 explorer. [cited: 2022-03-21].  
<https://covid19.who.int/?gclid%2014%20Cj0KCQjwIN32%20BRCCARIsADZ-J4tRsPwhNM6JMBUAuPD3>
- 3 World health organization (WHO), Health topics, communicable diseases, influenza, pandemic influenza, past pandemics. [cited: 2022-03-21].  
<https://www.euro.who.int/en/health-topics /communicable-diseases/influenza/pandemic-influenza/past-pandemics>
- 4 World health organization (WHO), tracking SARS-CoV-2 variants. [cited: 2022-03-21]. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- 5 Robert-Koch-Institut, Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19. [cited: 2022-03-22].  
[https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Steckbrief.html;jsessionid=C1A1A2B12EC4A3BF2AE68DE2F86440D6.internet081?nn=13490888#doc13776792bodyText9](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html;jsessionid=C1A1A2B12EC4A3BF2AE68DE2F86440D6.internet081?nn=13490888#doc13776792bodyText9)
- 6 Paul-Ehrlich-Institut (Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel), Coronavirus und COVID-19, COVID-19-Impfstoffe. [cited: 2022-03-22].  
[https://www.pei.de/DE/newsroom/dossier/coronavirus/coronavirus-inhalt.html;jsessionid=171D28AE43273790A0C918B21362DC0D.intranet212?nn=169730&cms\\_pos=2](https://www.pei.de/DE/newsroom/dossier/coronavirus/coronavirus-inhalt.html;jsessionid=171D28AE43273790A0C918B21362DC0D.intranet212?nn=169730&cms_pos=2)
- 7 Robert-Koch-Institut, Stufenplan der STIKO zur Priorisierung der COVID-19-Impfung, Stand Februar 2021. [cited: 2022-03-23].  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/COVID-19/Stufenplan.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/COVID-19/Stufenplan.pdf?__blob=publicationFile)
- 8 Vijenthira A, Gong IY, Fox TA, Booth S, Cook G, Fattizzo B, et al. Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. *Blood*. 2020. 136(25):2881-2892. doi: 10.1182/blood.2020008824.
- 9 La Torre G, Mannocci A , Colamesta V, D'Egidio V, Sestili C, Spadea A. Influenza and Pneumococcal Vaccination in Hematological Malignancies: a Systematic Review of Efficacy, Effectiveness, and Safety. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016. 8(1):e2016044. doi: 10.4084/MJHID.2016.044.
- 10 Bosaeed M, Deepali K. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons. *Hum Vaccin Immunother*. 2018. 3;14(6):1311-1322. doi: 10.1080/21645515.2018.1445446

- 11 Ljungman P, Nahi H, Linde A. Vaccination of patients with haematological malignancies with one or two doses of influenza vaccine: a randomised study. *Br J Haematol.* 2005. 130(1):96-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05582.x.
- 12 Rieger CT, Liss B, Mellinshoff S, Buchheidt D, Cornely OA, Egerer G, et al. Anti-infective vaccination strategies in patients with hematologic malignancies or solid tumors—Guideline of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Oncol.* 2018. 29(6):1354-1365. doi:10.1093/annonc/mdy117.
- 13 Rieger C, Liss B, Mellinshoff S, Buchheidt D, Cornely OA, Egerer G, et al. Onkopedia Leitlinien › Impfungen bei Tumorpatienten. August 2019. [cited: 2022-03-23].  
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/impfungen-bei-tumorpatienten/@@guideline/html/index.html>
- 14 Impfdashboard, Stand 10.Mai 2022, [cited: 2022-05-10].  
<https://impfdashboard.de>
- 15 Robert Koch-Institut: COVID-19-Dashboard, [cited: 2022-03-23].  
<https://experience.arcgis.com/experience/478220a4c454480e823b17327b2bf1d4>
- 16 World health organization (WHO), COVID-19 vaccine tracker and landscape. [cited: 2022-03-23]. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- 17 Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 7/2022. Beschluss der STIKO zur 18. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung. [cited: 2022-03-23]. [www.rki.de](http://www.rki.de) › Infekt › EpidBull › Archiv › Ausgaben. Erscheinungsdatum 17.02.2022. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/Ausgaben/07\\_22.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/Ausgaben/07_22.html)
- 18 Lyngse FP, Mortensen LH, Denwood MJ, Christiansen LE, Møller CH, Skov RL, et al. SARS-CoV-2 Omicron VOC Transmission in Danish Households; Preprint vom 27.12.2021. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.27.21268278v1> [cited: 11.05.2022]. medRxiv. 2021:2021.12.27.21268278. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.12.27.21268278>
- 19 UK Health Security Agency. COVID-19 vaccine surveillance report; Week 4, 27. January 2020. [cited: 2022-05-11].  
[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/1050721/Vaccine-surveillance-report-week-4.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1050721/Vaccine-surveillance-report-week-4.pdf)
- 20 Tseng HF, Ackerson BK, Luo Y, Sy LS, Talarico CA, Tian Y, et al. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 omicron and delta variants. *Nature Medicine.* 2022. doi: 10.1038/s41591-022-01753-y
- 21 Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA). [www.infektionsschutz.de](http://www.infektionsschutz.de) › coronavirus › Fragen und Antworten › Alles zu den Impfstoffen › Vaxzevria von AstraZeneca. Stand 21.12.2021. [cited: 2022-03-22]. [www.infektionsschutz.de/coronavirus/fragen-und-antworten/alles-zu-den-impfstoffen/vaxzevria-von-astrazeneca/#tab-5199-0](http://www.infektionsschutz.de/coronavirus/fragen-und-antworten/alles-zu-den-impfstoffen/vaxzevria-von-astrazeneca/#tab-5199-0)

- 22 Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA).  
www.infektionsschutz.de › coronavirus › Fragen und Antworten › Alles zu den  
Impfstoffen › mRNA-Impfstoffe. Stand 20.12.2021. [cited: 2022-03-22].  
www.infektionsschutz.de/coronavirus/fragen-und-antworten/alles-zu-den-  
impfstoffen/mrna-impfstoffe/#tab-5147-0
- 23 Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, Assas BM. Cytokine storm and COVID-19: A  
chronicle of pro-inflammatory cytokines. *Open Biol.* 2020. 10(9):200160. doi:  
10.1098/rsob.200160
- 24 Escobedo RA, Singh DK, Kaushal D. Understanding COVID-19: From  
dysregulated immunity to vaccination status quo. *Front Immunol.* 2021.  
11;12:765349. doi: 10.3389/fimmu.2021.765349
- 25 Jamilloux Y, Henry T, Belot A, Viel S, Fauter M, El Jammal T, et al. Should we  
stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-  
cytokine interventions. *Autoimmun Rev.* 2020. 19(7):102567. doi:  
10.1016/j.autrev.2020.102567
- 26 Ragab D, Eldin HS, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 cytokine  
storm; What we know so far. *Front Immunol.* 2020. 11:1446. doi:  
10.3389/fimmu.2020.01446.
- 27 Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Muhammad J, Khan A, Sule AA, Tirupathi R, et al.  
Role of Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients: A Review on Molecular  
Mechanisms, Immune Functions, Immunopathology and Immunomodulatory  
Drugs to Counter Cytokine Storm. *Vaccines (Basel).* 2021. 9(5):436. doi:  
10.3390/vaccines9050436.
- 28 Toor SM, Saleh R, Nair VS, Taha RZ, Elkord E. T-cell-responses and therapies  
against SARS-CoV-2infection. *Immunology.* 2021. 162(1):30-43. doi:  
10.1111/imm.13262.
- 29 Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes  
in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19  
patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc  
Biol.* 2020. 08(1):17-41. doi: 10.1002/JLB.3COVR0520-272R.
- 30 Rink L, Kruse A, Haase H. *Immunologie für Einsteiger.* Spektrum  
Akademischer Verlag. 2012. ISBN: 978-3-8274-2439-6
- 31 Shah VK, Firmal P, Alam A, Ganguly D, Chattopadhyay S. Overview of  
immune response during SARS-CoV-2 infection: lessons from the past. *Front  
Immunol.* 2020. 11:1949. doi.org/10.3389/fimmu.2020.01949.
- 32 Chien JY, Hsueh PR, Cheng WC, Yu CJ, Yang PC. Temporal changes in  
cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute  
respiratory syndrome. *Respirology* 2006. 11(6):715-22. doi: 10.1111/j.1440-  
1843.2006.00942.x.
- 33 Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’  
in COVID-19. *J infect.* 2020. 80(6):607–613. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037.

- 34 Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020. 11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827
- 35 Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype of SARS-CoV-2-specific T-cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Science Immunol*. 2020. 5(48):eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
- 36 Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*. 2020. 160(3):261–268. doi: 10.1111/imm.13223.
- 37 Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, Notari S, Grassi G, Tartaglia E, et al. An inflammatory profile correlates with decreased frequency of cytotoxic cells in coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020. 71(16):2272-2275. doi: 10.1093/cid/ciaa577.
- 38 Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Fard SN, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021. 27(2):286.e7-286.e13. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.051.
- 39 Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020. 20(6):363–374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
- 40 Chen Z, Wherry EJ. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020. 20(9):529-536. doi: 10.1038/s41577-020-0402-6.
- 41 Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 2020. 181(7):1489-1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- 42 Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020. 5(49) :eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114.
- 43 Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* 2020. 369(6508):eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511.
- 44 Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020. 587(7833):270-274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9.
- 45 Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 2020. 183(1):158-168.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017.

- 46 Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Med: Nat*, 2020. 26(8):1200-1204. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.
- 47 Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral B cell memory responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A six years follow-up study. *J Immunol*. 2011. 186:7264–8. doi: 10.4049/jimmunol.0903490
- 48 Velardi E, Tsai JJ, van den Brink MRM. T cell regeneration after immunological injury. *Nat Rev Immunol*. 2021. 21(5):277-291. doi: 10.1038/s41577-020-00457-z.
- 49 Fontana L, Strasfeld L. Respiratory Virus Infections of the Stem Cell Transplant Recipient and the Hematologic Malignancy Patient. *Infect Dis Clin North Am*. 2019. 33(2):523-544. doi: 10.1016/j.idc.2019.02.004.
- 50 Dignani MC, Costantini P, Salgueira C, Jordán R, Guerrini G, Valledor A, et al. Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) virus infection in cancer and hematopoietic stem cell transplant recipients; a multicenter observational study. Version 2. *F1000Res*. 2014. 3:221. doi: 10.12688/f1000research.5251.1
- 51 Llupià A, Vilella A, Costas L, Díez C, Torres F, Yagiie J, et al. Can the response to 23-valent pneumococcal vaccine in splenectomised patients be predicted? *Vaccine*. 2012. 30(13):2382-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.073.
- 52 Braconier JH, Pedersen FK, Odeberg H, Rosén C. Opsonic and antibody responses to pneumococcal polysaccharide types 6A, 19F and 23F after vaccination of immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis*. 1984. 16(2):161-7. doi: 10.3109/00365548409087136.
- 53 Robertson JD, Nagesh K, Jowitt SN, Dougal M, Anderson H, Mutton K, et al. Immunogenicity of vaccination against influenza, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type B in patients with multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2000. 82(7):1261-5. doi: 10.1054/bjoc.1999.1088.
- 54 Bosaeed M, Deepali K. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons. *Hum Vaccin Immunother*. 2018. 3;14(6):1311-1322. doi: 10.1080/21645515.2018.1445446
- 55 Vijenthira A, Gong I, Betschel SD, Cheung M, Hicks LK. Vaccine response following anti-CD20 therapy: a systematic review and meta-analysis of 905 patients. *Blood Adv*. 2021. 5(12):2624-2643. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004629.
- 56 Zent CS, Brady MT, Delage C, Strawderman M, Laniewski N, Contant PN, et al. Short term results of vaccination with adjuvanted recombinant varicella zoster glycoprotein E during initial BTK inhibitor therapy for CLL or lymphoplasmacytic lymphoma. *Leukemia*. 2021. 35(6): 1788-1791. doi: 10.1038/s41375-020-01074-4.

- 57 Pleyer C, Ali MA, Cohen JI, Tian X, Soto S, Ahn IE, et al. Effect of Bruton tyrosine kinase inhibitor on efficacy of adjuvanted recombinant hepatitis B and zoster vaccines. *Blood*. 2021. 137(2):185-189. doi: 10.1182/blood.2020008758.
- 58 Bersanelli M, Scala S, Affanni P, Veronesi L, Colucci ME, Banna GL, et al. Immunological insights on influenza infection and vaccination during immune checkpoint blockade in cancer patients. *Immunotherapy*. 2020. 12(2):105–110. doi: 10.2217/imt-2019-0200.
- 59 Addeo A, Shah PK, Bordry N, Hudson RD, Albracht B, Di Marco M, et al. Immunogenicity of SARS-CoV-2 messenger RNA Vaccines in Patients with Cancer. *Cancer Cell*. 2021. 39(8):1091-1098.e2. doi:10.1016/j.ccell.2021.06.009
- 60 Diefenbach C, Caro J, Koide A, Grossbard M, Goldberg JD, Raphael B, et al. Impaired Humoral Immunity to SARS-CoV-2 Vaccination in Non-Hodgkin Lymphoma and CLL Patients. *medRxiv* 2021. 2021.06.02.21257804 DOI: 10.1101/2021.06.02.21257804.
- 61 Herishanu Y, Avivi I, Aharon A, Shefer G, Levi S, Bronstein Y, et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021. 137(23):3165-3173. doi: 10.1182/blood.2021011568.
- 62 Parry H, McIlroy G, Bruton R, Ali M, Stephens C, Damery S, et al. Antibody responses after first and second Covid-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Cancer J*. 2021. 11(7):136. doi: 10.1038/s41408-021-00528-x.
- 63 Maneikis K, Šablauskas K, Ringelevičiūtė U, Vaitekėnaitė V, Čekauskienė R, Kryžauskaitė L, et al. Immunogenicity of the BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccine and early clinical outcomes in patients with haematological malignancies in Lithuania: a national prospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2021.8(8):e583-e592. doi: 10.1016/S2352-3026(21)00169-1.
- 64 Kwok M, Fritsch E, Wu CJ. Cancer and COVID-19: On the Quest for Effective Vaccines. *Blood Cancer Discov*. 2020. 2(1):13-18. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-20-0205.
- 65 Saad Albichr I, De Greef J, Van Den Neste E, Poiré X, Havelange V, Vekemans MC, et al. Cellular response to COVID-19 vaccines in hematologic malignancies patients: a new hope for non-responders? *Leuk Lymphoma*. 2022. 63(3):743-746. doi: 10.1080/10428194.2021.1998485.
- 66 Malard F, Gaugler B, Gozlan J, Bouquet L, Fofana D, Siblany L, et al. Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Cancer J*. 2021. 11(8):142. doi: 10.1038/s41408-021-00534-z.
- 67 Jiménez M, Roldán E, Fernández-Naval C, Villacampa G, Martínez-Gallo M, Medina-Gil D, et al. Cellular and humoral immunogenicity of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Adv*. 2022; 6(3):774-784. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006101.



- 68 Liebers N, Speer C, Benning L, Bruch PM, Kraemer I, Meissner J, et al. Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20 treated lymphoma patients. *Blood*. 2022. 139(1):142-147. doi: 10.1182/blood.2021013445.
- 69 Harrington P, Doores KJ, Radia D, O'Reilly A, Lam HPJ, Seow J, et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) induces neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2021. 194(6):999-1006. doi:10.1111/bjh.17568.
- 70 Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med*. 2021. 27(7):1280-1289. doi: 10.1038/s41591-021-01386-7.
- 71 Robert Koch-Institut. Hinweise zur Testung von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2. Antikörpernachweise und immunologischer Schutz. [www.rki.de](http://www.rki.de) › Infekt › Coronavirus SARS-CoV-2 › Hinweise zur Testung von Patientinnen und Patienten auf SARS-CoV-2. Stand 07.03.2022. [cited: 2022-03-23]. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Vorl\\_Testung\\_nCoV.html;jsessionid=156870721EC647E52E9F9F2B55F880F6.internet051?n=13490888#doc13490982bodyText32](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html;jsessionid=156870721EC647E52E9F9F2B55F880F6.internet051?n=13490888#doc13490982bodyText32)

#### **4. Thesen**

Bei hämatonkologischen Patient\*innen ist mit einer humoralen und/oder zellulären Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung bis 120 Tage nach Erstimpfung zu rechnen, wobei die humorale Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung nicht mit der zellulären Immunantwort korreliert ist.

Myeloisch Erkrankte, Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie und gesunde Referenzen weisen vergleichbare Ani-Spike- IgG-Serokonversionsraten 120 Tage nach erster COVID-19-Impfung auf.

Patient\*innen mit lymphatischer Erkrankung weisen eine geringere Ani-Spike- IgG-Serokonversionsrate und niedrigere mediane Ani-Spike -IgG-Titer auf als Patient\*innen mit myeloischer Erkrankung oder Patient\*innen mit soliden Tumoren unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie.

Der Anteil lymphatischer Patient\*innen mit nachweisbarer zellulärer Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung ist vergleichbar mit dem Anteil innerhalb der gesunden Referenzkohorte und damit größer als der Anteil myeloisch erkrankter Patient\*innen mit nachweisbarer zellulärer Immunantwort.

In Bezug auf die zelluläre Immunantwort sind die COVID-19-spezifischen CD4<sup>+</sup>- T-Zellen (CovCD4<sup>+</sup>) in allen untersuchten Kohorten dominant gegenüber den CD8<sup>+</sup>- T-Zellen (CovCD8<sup>+</sup>).

Alter, Geschlecht, B- und T-Zell-Zahlen vor Impfung, verwendeter Impfstoff und das Impfintervall haben keinen Einfluss auf die humorale und/oder zelluläre Immunantwort auf eine COVID-19-Impfung.

Unter den onkologischen Therapien haben B-Zell-depletierende Medikamente und die Behandlung mit Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitoren den stärksten negativen Einfluss auf die humorale Immunantwort.

Die zeitliche Dynamik der Anti-SARS-CoV2-IgG-Antikörper wird multifaktoriell beeinflusst und ist nicht allein durch Grunderkrankung oder Therapie vorhersagbar.

## Publikationsteil

### Publikation 1

#### Literaturangabe

Jotschke S, Schulze S, Jaekel N, Ludwig-Kraus B, Engelmann R, Kraus FB, Zahn C, Nedlitz N, Prange-Krex G, Mohm J, Peuser B, Schwarz M, Spohn C, Behlendorf T, Binder M, Junghanss C, Böttcher S, Al-Ali HK. Longitudinal Humoral and Cellular Immune Responses Following SARS-CoV-2 Vaccination in Patients with Myeloid and Lymphoid Neoplasms Compared to a Reference Cohort: Results of a Prospective Trial of the East German Study Group for Hematology and Oncology (OSHO). *Cancers (Basel)*. 2022. 14(6):1544. doi: 10.3390/cancers14061544.

#### Lizenz

Erschienen am 17. März 2022 im Journal „Cancers“.

Es handelt sich um eine Open-access-Publikation. Dadurch sind umfassende Rechte zur Weiterverbreitung und Nachnutzung garantiert. Eine separate Abdruckgenehmigung des Verlages ist für die Verwendung in dieser kumulativen Dissertation nicht erforderlich.

#### Beiträge der Autor\*innen und Eigenanteil der Doktorandin an der Publikation:

Planung inkl. Erstellung des Studienprotokolls, Anträge an die Ethik-Kommissionen, Vertragsabschlüsse mit den Studienzentren, Finanzierungsplan u.a.

- Al-Ali HK, Schulze S, Jaekel N, Zahn C, Nedlitz N, Binder M, **Jotschke S (5%)**

Rekrutierung von Patienten und Probanden inkl. Aufklärung und Materialentnahme

- Schulze S, Jaekel N, Zahn C, Prange-Krex G, Mohm J, Peuser B, Schwarz M, Spohn C, Behlendorf T, Al-Ali HK

Logistik (Transport, Verwaltung und Koordination der Proben)

- Zahn C, Schulze S, Nedlitz N

Labor (Differentialblutbild, Immunstatus, klinische Chemie, Anti-Spike-Antikörperbestimmung, T-Zell-Bestimmung)

- Ludwig-Kraus B, Kraus FB, Engelmann R, Böttcher S

Datenerhebung

- Schulze S, Jaekel N, Zahn C, **Jotschke S (70%)**

Datenauswertung und Statistik, inkl. Erstellung von Abbildungen, Grafiken und Tabellen

- Schulze S, Jaekel N, Al-Ali HK, Engelmann R, **Jotschke S (5%)**

Literaturrecherche und Erstellung des Literaturverzeichnisses

- Al-Ali HK, **Jotschke S (50%)**

Verfassen des Papers

- Al-Ali HK, Schulze S, Engelmann R, Böttcher S, **Jotschke S (25%)**

Zulassungsgesuch beim Journal und Einreichung des Manuskriptes, Korrekturen im Rahmen eines Peer-Review-Verfahrens

- Schulze S, Jaekel N, Engelmann R, Böttcher S, Junghanss C, Al-Ali HK

## **Publikation 2**

### **Literaturangabe**

Engelmann R, Jaekel N, Jotschke S, Ludwig-Kraus B, Kraus FB, Kumari N, Schulze S, Hecker M, Zahn C, Al-Ali HK, Junghanss C, Böttcher S. Vector-based SARS-CoV-2 vaccination is associated with improved T-cell responses in hematological neoplasia. *Blood Adv.* 2023. 7(14):3403-3415. doi: 10.1182/bloodadvances.2022009054.

### **Lizenz**

Erschienen am 25.07.2023 im Journal „Blood“.








Es handelt sich um eine Open-access-Publikation. Dadurch sind umfassende Rechte zur Weiterverbreitung und Nachnutzung garantiert. Eine separate Abdruckgenehmigung des Verlages ist für die Verwendung in dieser kumulativen Dissertation nicht erforderlich.

### **Anteil der Doktorandin an der Publikation:**

Die Grundlage für diese Publikation bilden, ebenso wie für Publikation 1, die Daten aus der ImV-HOng-Studie. Zur detaillierten Aufschlüsselung siehe Seite 39: „Beiträge der Autor\*innen und Eigenanteil der Doktorandin an der Publikation“.

## Article

# Longitudinal Humoral and Cellular Immune Responses Following SARS-CoV-2 Vaccination in Patients with Myeloid and Lymphoid Neoplasms Compared to a Reference Cohort: Results of a Prospective Trial of the East German Study Group for Hematology and Oncology (OSHO)

Sabrina Jotschke <sup>1,†</sup>, Susann Schulze <sup>1,†</sup> , Nadja Jaekel <sup>2</sup> , Beatrice Ludwig-Kraus <sup>3</sup> , Robby Engelmann <sup>4</sup> , Frank Bernhard Kraus <sup>3</sup> , Christina Zahn <sup>2</sup>, Nicole Nedlitz <sup>1</sup>, Gabriele Prange-Krex <sup>5</sup>, Johannes Mohm <sup>5</sup>, Bettina Peuser <sup>6</sup>, Maik Schwarz <sup>7</sup>, Claudia Spohn <sup>8</sup>, Timo Behlendorf <sup>9</sup>, Mascha Binder <sup>2</sup>, Christian Junghans <sup>4</sup>, Sebastian Böttcher <sup>4</sup>  and Haifa Kathrin Al-Ali <sup>1,2,\*</sup> 



**Citation:** Jotschke, S.; Schulze, S.; Jaekel, N.; Ludwig-Kraus, B.; Engelmann, R.; Kraus, F.B.; Zahn, C.; Nedlitz, N.; Prange-Krex, G.; Mohm, J.; et al. Longitudinal Humoral and Cellular Immune Responses Following SARS-CoV-2 Vaccination in Patients with Myeloid and Lymphoid Neoplasms Compared to a Reference Cohort: Results of a Prospective Trial of the East German Study Group for Hematology and Oncology (OSHO). *Cancers* **2022**, *14*, 1544. <https://doi.org/10.3390/cancers14061544>

Academic Editor: Alvin J. X. Lee

Received: 3 February 2022

Accepted: 14 March 2022

Published: 17 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Krukenberg Cancer Center Halle, University Hospital Halle (Saale), 06120 Halle (Saale), Germany; sabrina.jotschke@uk-halle.de (S.J.); susann.schulze2@uk-halle.de (S.S.); nicole.nedlitz@uk-halle.de (N.N.)
  - <sup>2</sup> University Clinic and Outpatient Clinic for Internal Medicine IV, University Hospital Halle (Saale), 06120 Halle (Saale), Germany; nadja.jaekel@uk-halle.de (N.J.); christina.zahn@uk-halle.de (C.Z.); mascha.binder@uk-halle.de (M.B.)
  - <sup>3</sup> Central Laboratory, University Hospital Halle (Saale), 06120 Halle (Saale), Germany; beatrice.ludwig-kraus@uk-halle.de (B.L.-K.); bernhard.kraus@uk-halle.de (F.B.K.)
  - <sup>4</sup> Clinic III—Hematology, Oncology, and Palliative Care, Rostock University Medical Center, 18057 Rostock, Germany; robbi.engelmann@med.uni-rostock.de (R.E.); christian.junghans@med.uni-rostock.de (C.J.); sebastian.boettcher@med.uni-rostock.de (S.B.)
  - <sup>5</sup> Gemeinschaftspraxis Mohm/Prange-Krex, 01307 Dresden, Germany; prange@onkopraxis-dresden.de (G.P.-K.); mohm@onkopraxis-dresden.de (J.M.)
  - <sup>6</sup> Internistisch-Onkologische Ärztegemeinschaft, 04179 Leipzig, Germany; praxis.peuser@t-online.de
  - <sup>7</sup> Paracelsus Medizinisches Versorgungszentrum, Schwerpunktpraxis für Hämatologie und Onkologie, 08261 Schoeneck, Germany; maik.schwarz@pkd.de
  - <sup>8</sup> Hämatologisch-Onkologische Gemeinschaftspraxis, 06110 Halle (Saale), Germany; praxis-spohn@web.de
  - <sup>9</sup> Gemeinschaftspraxis für Hämatologie, Onkologie und Gastroenterologie, 06110 Halle (Saale), Germany; tbehendorf@onkologie-halle.de
- \* Correspondence: haifa.al-ali@uk-halle.de; Tel.: +49-345-5657-7712  
† These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** The kinetics of SARS-CoV-2 spike-protein antibodies and the cellular immune landscape following vaccination in patients with hematologic neoplasms are poorly understood. The aim of our prospective and longitudinal study, which included 398 adults, was to compare day 35 and day 120 anti-spike-IgG antibody and day 120 SARS-CoV-2-specific T-cell responses in patients with hematologic malignancies to a reference cohort. Although day 35 seroconversion in controls (98%) was higher compared to patients with myeloid (82%) and lymphoid (48%) neoplasms, substantial increases in day 120 seroconversion were seen in both the myeloid (97%) and lymphoid (66%) cohorts. Remarkably, spike-specific CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-cells in the lymphoid (71%/31%) and control (74%/42%) cohorts were comparable. We provide strong evidence of vaccine-elicited immunogenicity in most patients with hematologic malignancies. Both kinetics of seroconversion and cellular responses are crucial to determine which patients with hematologic malignancies will generate immunity. The findings have implications on public health policy regarding recommendations for SARS-CoV-2 booster doses.

**Abstract:** Purpose: To assess humoral responses longitudinally and cellular immunogenicity following SARS-CoV-2-vaccination in patients with hematologic and oncologic malignancies receiving checkpoint-inhibitors. Methods: This prospective multicenter trial of the East-German-Study-Group-for-Hematology-and-Oncology, enrolled 398 adults in a two (patients;  $n = 262$ ) to one (controls;  $n = 136$ ) ratio. Pre-vaccination, day 35 (d35), and day 120 (d120) blood samples were analyzed for

anti-spike antibodies and d120 IL-2<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-cells. Laboratories were blinded for patients and controls. Results: Patients belonged to the myeloid ( $n = 131$ ), lymphoid ( $n = 104$ ), and checkpoint-inhibitor ( $n = 17$ ) cohorts. While d35 seroconversion was higher in controls (98%) compared to patients (68%) ( $p < 0.001$ ), d120 seroconversion improved across all patient cohorts [checkpoint-inhibitors (81% to 100%), myeloid (82% to 97%), lymphoid (48% to 66%)]. CD4<sup>+</sup>- and CovCD8<sup>+</sup>-cells in the lymphoid (71%/31%) and control (74%/42%) cohorts were comparable but fewer in the myeloid cohort (53%,  $p = 0.003$  /24%,  $p = 0.03$ ). In patients with hematologic malignancies, no correlation between d120 humoral and cellular responses was found. A sizeable fraction of lymphoid patients demonstrated T-cell responses without detectable spike-specific-IgGs. Conclusions: Evidence of vaccine-elicited humoral and/or cellular immunogenicity in most patients is provided. Both humoral and cellular responses are crucial to determine which patients will generate/maintain immunity. The findings have implications on public health policy regarding recommendations for SARS-CoV-2 booster doses.

**Keywords:** SARS-CoV-2 vaccination; myeloid neoplasms; lymphoid neoplasms; seroconversion; anti-spike-IgG; T-cells; CD4<sup>+</sup>-cells; CD8<sup>+</sup>-cells

## 1. Introduction

Published data indicate that mortality from SARS-CoV-2 infections in patients with cancer is mainly associated with general risk factors such as older age and comorbidities [1,2]. Patients with hematologic malignancies have a particular high risk of COVID-19 related death with ~40% mortality rate [3,4]. COVID-19 vaccines have been developed and deployed with remarkable speed [5–8]. However, patients with malignancy were excluded from pivotal vaccination trials. Recent data indicate that active cancer therapy receiving patients with solid tumors develop adequate antibody responses to vaccination (although the magnitude of these responses is diminished relative to control cohorts) [9,10]. Depending on the type and activity of the disease, there is accumulating evidence that humoral immunity up to 42 days after the second dose of SARS-CoV-2 vaccines is impaired in patients with hematologic malignancies, especially if they were treated with B-cell depleting therapies such as anti-CD20 antibodies [11–26]. These data raised concerns about the efficacy of vaccines in generating humoral immunity in patients with hematologic malignancies, particularly in those with lymphoid neoplasms. However, little is known to the durability of vaccine-elicited antibody responses in patients with hematologic neoplasms. Although neutralizing antibodies are important in vaccine-induced protection as evidenced by the correlations of antibody responses and clinical outcome of COVID-19 infections [27–29], growing evidence points towards an equally important role for T-cells [30–33]. Circulating SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells were identified in ~70% and 100% of COVID-19 convalescent patients, respectively [34]. These T-cell responses were shown to be associated with improved survival after infections even in patients with hematologic neoplasms [35,36]. Similarly, early polyfunctional spike protein-specific T-cell responses were described after COVID-19 vaccination [37–40]. Indeed, stable and functional CD8<sup>+</sup>-T-cell responses could be mobilized one week after prime vaccination with BNT162b2 when circulating CD4<sup>+</sup>-T-cells and neutralizing antibodies were still weakly detectable [40]. mRNA-based vaccination generated robust CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-T-cell responses could be generated, despite poor antibody responses, in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 antibody therapy after mRNA-based vaccination [41]. Liebers, et al. detected spike protein-specific T-cells 17 days after the second dose of vaccine using an IFN $\gamma$  ELISPOT in 29/50 (58%) lymphoma patients who had received anti-CD20 treatments [24]. Using an intracellular cytokine assay for IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL2, Harrington, et al. reported polyfunctional CD8<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>-T-cells of 35% and 75%, respectively, in 21 patients with *BCR-ABL1*-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) after a median of 21 days after a single dose of BNT162b2 vaccine [15].

Despite the relatively small sample sizes, the lack of a predefined sample collection, and the lack of large reference cohorts, these initial results suggest that patients with hematologic malignancies with insufficient humoral responses might still benefit from vaccinations through cellular responses, considering that effective T-cell responses are essential for SARS-CoV-2 clearance [42]. Indeed, a significant portion of antigen-specific T-cell responses may be missed if only IFN $\gamma$ -related readouts are used and IL-2 is not taken into consideration [43]. Further, little is known about the longevity of vaccine-elicited cellular immunogenicity in large cohorts of patients with hematologic neoplasms.

In order to investigate the kinetics of IgG responses and relationship to specific T-cell responses, days 35 and 120 vaccine-induced humoral and day 120 cellular responses in patients with hematologic and oncologic malignancies receiving checkpoint inhibitors (PD-L1-inhibitors) were compared to a reference cohort.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

ImV-HOng (OSHO#98) is a longitudinal, prospective, multicenter, non-interventional study which compared day 35 (d35) and day 120 (d120) vaccine-elicited spike protein-specific humoral and d120 T-cell responses between patients and controls. The trial was conducted from 17 March 2021 to 6 December 2021 across seven centers of the East-German-Study-Group-for-Hematology-and-Oncology (OSHO). The trial was approved by the Ethical Review Boards and registered at the Paul-Ehrlich Institute (NIS-584) and Deutsches Register Klinischer Studien (DRKS00027372). The study received a grant from the German Leukemia and Lymphoma Foundation.

### 2.2. Study Cohorts

The study population comprised adult individuals willing to receive a SARS-CoV-2 vaccination. Participants were enrolled per random sampling after written informed consent into two cohorts at a 1 (controls) to 2 (patients) ratio. The control group included individuals without active cancer in the last five years. In addition to patients with myeloid and lymphoid neoplasms, patients with solid tumors receiving PD-L1 inhibition were also eligible for enrollment in the patient cohort in order to assess the impact of PD-L1 inhibition on immune response after vaccination. The inclusion and exclusion criteria are shown in Table 1.

**Table 1.** Inclusion and exclusion criteria.

	Patients	Controls
Inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Age <math>\geq</math> 18 years</li> <li>• Presence of one of the following diagnoses:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- myeloid neoplasm</li> <li>- lymphoid neoplasm</li> <li>- solidtumor under PD-L1 * inhibition</li> </ul> </li> <li>• Willing to receive a SARS-CoV-2 vaccination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Age <math>\geq</math> 18 years</li> <li>• No active malignancy in the last 5 years</li> <li>• Willing to receive a SARS-CoV-2 vaccination</li> </ul>
Exclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraindication to a SARS-CoV-2 vaccination</li> <li>• Limited legal capacity to consent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contraindication to a SARS-CoV-2 vaccination</li> <li>• Limited legal capacity to consent</li> </ul>

\* PD-L1, programmed death ligand 1.

### 2.3. Outcomes

The primary outcome was d35 SARS-CoV-2 spike-specific antibody concentrations in patients compared to controls following the first vaccination dose. The WHO launched the first International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (IgG), wherein the neat sample was assigned to contain 1000 binding antibody units (BAU)/mL [44,45], and BAU/mL were subsequently converted to U/mL ( $U/mL = 0.972 \times BAU/mL$ ). Key secondary outcomes were d120 spike-specific humoral and T-cell responses in patients compared to controls. Baseline patient-, disease-, vaccination-, and laboratory-characteristics and any potential associations with vaccine-elicited responses were explored.

### 2.4. Procedures

Blood samples were drawn up to three weeks prior to vaccination, on d35 ( $\pm 7$ ), and d120 ( $\pm 14$ ) after the first vaccination dose. The pseudonymized samples were serially analyzed for SARS-CoV-2 spike-specific-IgGs in the Central Laboratory of the University Hospital Halle (Saale). T-cell responses were analyzed at the Special Hematology Laboratory, Rostock University Medical Center. Laboratories were blinded for patient and control groups.

### 2.5. Laboratory Measurements

#### 2.5.1. Measurement of SARS-CoV-2 Spike Protein Antibodies

The quantitative determination of IgG antibodies to the SARS-CoV-2 spike protein was carried out using the Roche Elecsys<sup>®</sup> Anti-SARS-CoV-2 S assay (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Switzerland). The assay is based on a recombinant protein representing the receptor binding domain of the spike antigen in a double-antigen sandwich assay format, with a high specificity and sensitivity [46]. Antibody titers were measured on a Roche Cobas e 801 analyzer integrated in a fully automated Roche Cobas 8000 platform. A concentration of IgG SARS-CoV-2 spike protein antibodies of  $>0.8$  U/mL is considered positive.

#### 2.5.2. SARS-CoV-2 Spike-Specific T-Cell Response

Heparinized whole blood was either left unstimulated (negative control), stimulated with  $0.5 \mu\text{g/mL}$  Staphylococcus enterotoxin B (SEB, positive control) or stimulated using  $0.6 \text{ nmol}$  of (approximately  $1 \mu\text{g}$ ) wild-type spike protein of SARS-CoV2 peptides (SARS-CoV2 Prot\_S Complete, REF: 130-127-953, Miltenyi Biotec [MB], Bergisch Gladbach, Germany) per ml blood for 4 h at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of Breveldin A. After incubation, bulk lysis, surface and intracellular staining were performed according to EuroFlow guidelines [47].

The panel comprised the following antibodies IL-2:BV421 (clone: MQ1-17H12, Biolegend, San Diego, CA, USA), CD45RA:VioGreen (clone: REA1047), CCR7:FITC (clone: REA546), IFN $\gamma$ :PE (clone: 45-15), CD4:PE-Vio615 (clone: REA623), CD8:PE-Vio770 (clone: REA734), TNFa-APC (clone: REA656), and CD3:APC-Vio770 (clone: REA613) that were purchased from MB, unless stated otherwise. A median 2,660,024 nucleated cells per sample were acquired on Becton Dickinson (FACS Lyric) or MB (MACS Quant) flow cytometers. Primary data were analyzed in Infinicyt (v2.0.4b, Cytognos SL, Salamanca, Spain). Gating was in line with recommended standards for ICS assays [48,49].

Raw event numbers and frequencies per population were exported and analyzed using R (v4.1.1). Normalized percentages of SEB-activated and spike-specific T-cells were calculated by subtracting the respective frequencies of the negative control measured for the same sample and expressed as percentage of total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells of the sample [37,38]. A cohort of 14 not vaccinated and self-reportedly non-infected controls was used to calculate the limit of detection as follows: the z-score for each control sample was calculated per parameter. Samples with a z-score above two were considered as outlier for that parameter and removed (one outlier per parameter was detected). The limit of detection (LOD) was calculated as mean +2SD. All samples above the LOD [0.00459% for



CD4 + IL-2 + IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  + (CovCD4) and 0.00287% for CD8 + IL-2 + IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  + (CovCD8) T-cells] were considered positive.

### 2.6. Statistical Analysis

Sample size was calculated based on published data to the immune response after 30  $\mu$ g BNT162b2 (Comirnaty ©Biontech/Pfizer) vaccine [37]. Assuming a standard deviation of 0.9 for the logarithm of geometric mean concentrations, enrollment of 236 and 118 evaluable patients and controls respectively would provide 80% power (alpha error, 5%) to detect a significant difference in d35 seroconversions between patients and controls.

Continuous covariates were summarized as medians and interquartile ranges (IQRs) and categorical parameters as absolute and relative frequencies. Humoral responses (i.e., anti-Spike IgG concentrations > 0.8 U/mL) on d35 and d120 were compared between patients and controls by evaluating the mean difference in concentrations using t-tests and reporting the 95% confidence interval (CI). Cellular responses on d120 (i.e., CovCD4<sup>+</sup> and CovCD<sup>+</sup> above the LOD) were similarly compared and expressed. Vaccine-elicited seroconversion and cellular response rates in patient cohorts (i.e., type of diagnosis; cancer therapy vs. none) were evaluated in subgroup analyses. Regression models were used to test the association of baseline characteristics with vaccine-induced humoral and cellular responses. Baseline patient-related factors included age [continuous variable, 5- and 10-years frequency-matching], gender, baseline B- and T-cell counts, pre-vaccination anti-spike-IgGs, and cohort category. Vaccine-related variables were type of vaccine, number of injections, and interval between injections (continuous variable; interval  $\leq 35$  vs. >35 days).

Secondary endpoint analyses were explorative. Statistical tests were two-tailed and *p* values < 0.05 were considered significant. Analyses were performed using IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp.

## 3. Results

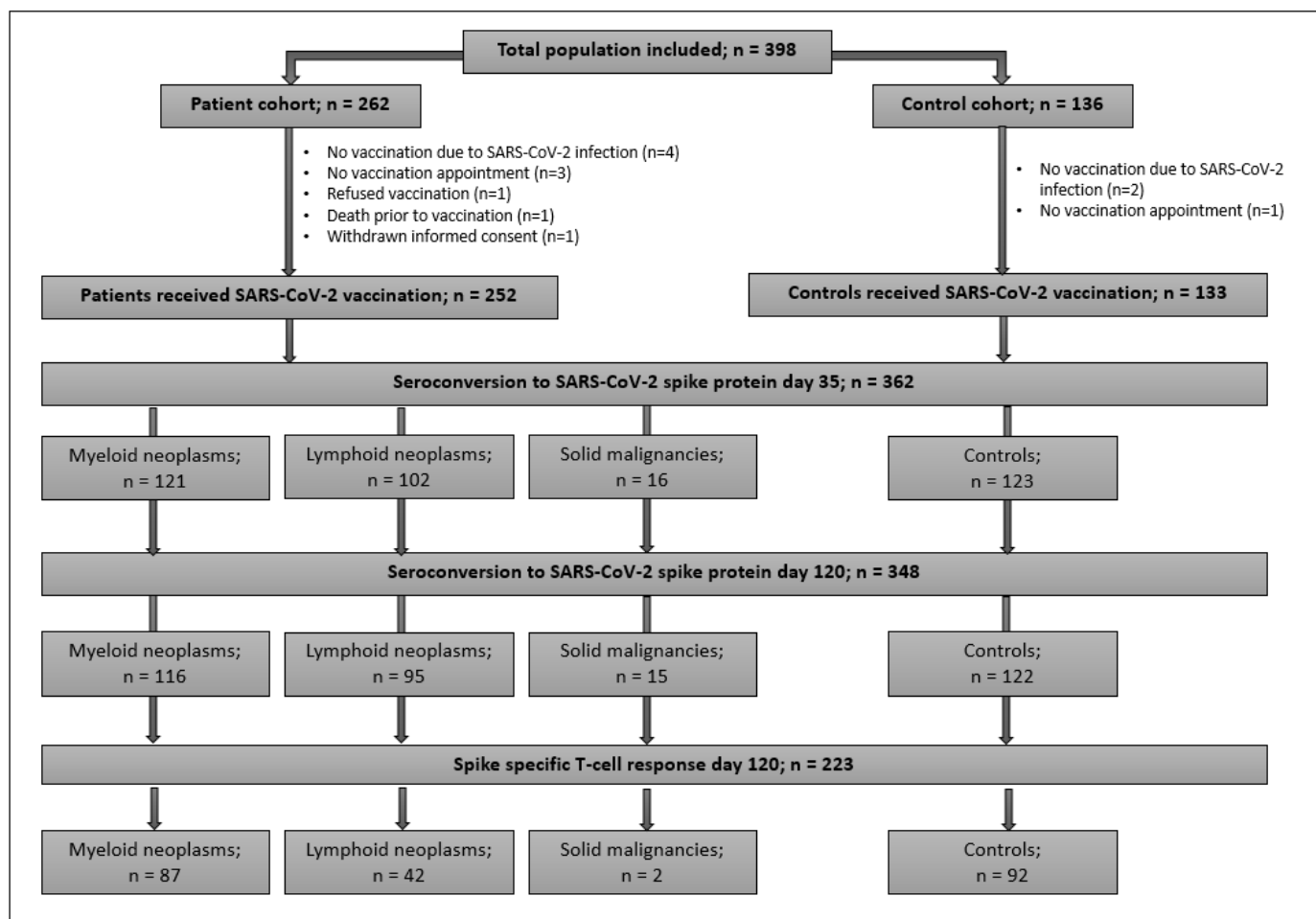
### 3.1. Patient Characteristics

A total of 398 adults were enrolled [controls, *n* = 136; patients, *n* = 262]. Patients had myeloid (*n* = 135) and lymphoid (*n* = 108) neoplasms, and cancer under checkpoint inhibition (*n* = 19). A CONSORT-Flowchart of participants is shown in Figure 1. This analysis comprises 385 participants who actually received the first vaccination [patients *n* = 252 (96.2%); controls *n* = 133 (97.8%)]. Table 2 illustrates the characteristics of vaccinated participants. Patients in the myeloid cohort were most frequently diagnosed with *BCR-ABL1*-positive (*n* = 29) and negative myeloproliferative neoplasms (*n* = 57). Compared to controls, patients were older (*p* < 0.001). Prior to vaccination, 186 (76.2%) patients were on active cancer therapy. An allogeneic hematopoietic-cell-transplantation (HCT) was documented in 32 participants. The majority of participants (82.6%) received mRNA-based vaccines. A second dose was given to 230 (91.3%) patients and 107 (80.5%) controls after a median of 40 days for patients and 33 days for controls (*p* = 0.2). Reasons for only one injection were vaccination with the vector-based COVID-19 Vaccine Janssen by ©Johnson&Johnson (*n* = 21), a history of a SARS-CoV2 infection prior to vaccination (*n* = 17), and others (*n* = 10). Due to health authority guidelines, ~50% of participants received the second dose 42 days after the first. A history of a SARS-CoV2 infection prior to vaccination with a median of 7 months and a median pre-vaccination anti-spike-IgG concentration of 122 U/mL (IQR 23.9-480) was documented in 20 (5.2%) subjects. No antibodies were detected in one patient and one control. Anti-spike-IgGs prior to vaccination were detected in 11 participants (9 patients and 2 controls) with no history of a previous infection.

**Table 2.** Baseline characteristics of vaccinated study population.

Parameter		Total Patient Cohort	Myeloid Neoplasms	Lymphoid Neoplasms	Solid Tumors	Controls
		<i>n</i> = 252	<i>n</i> = 131	<i>n</i> = 104	<i>n</i> = 17	<i>n</i> = 133
Age (y)	median (IQR)	62 (52–71)	61 (52–68)	66 (51–74)	61 (57–68)	54 (42–67)
≥60 years	<i>n</i> (%)	146 (57.9)	70 (53.4)	66 (63.5)	10 (58.8)	49 (36.8)
Gender, male	<i>n</i> (%)	139 (55.2)	69 (52.7)	60 (57.7)	10 (58.8)	54 (40.6)
<b>Diagnosis</b>						N/A
MPN	<i>n</i> (%)		91 (69.5)	N/A	N/A	
AML	<i>n</i> (%)		10 (7.5)	N/A	N/A	
MDS	<i>n</i> (%)		15 (11.5)	N/A	N/A	
Lymphoma	<i>n</i> (%)		N/A	40 (38.5)	N/A	
CLL	<i>n</i> (%)		N/A	32 (30.8)	N/A	
Multiple myeloma	<i>n</i> (%)		N/A	22 (21.2)	N/A	
Others	<i>n</i> (%)		15 (11.5)	10 (9.6)	17 (100)	
<b>Baseline lab values</b>						N/A
WBC < LLN of $3.7 \times 10^9/L$	<i>n</i> (%)	25/193 (13)	12/105 (11.4)	12/74 (16.2)	1/14 (7.1)	
Granulocytes < LLN of $1.8 \times 10^9/L$	<i>n</i> (%)	19/177 (10.7)	7/101 (6.9)	12/66 (18.2)	0	
Lymphocytes < LLN of $1.1 \times 10^9/L$	<i>n</i> (%)	56/180 (31.1)	30/102 (29.4)	21/68 (30.9)	5/10 (50)	
B-cells < LLN of 73/ $\mu$ L	<i>n</i> (%)	26/109 (23.9)	12/66 (18.2)	12/39 (30.8)	2/4 (50)	
T-cells < LLN of 856/ $\mu$ L	<i>n</i> (%)	41/109 (37.6)	23/66 (34.8)	15/39 (38.5)	3/4 (75)	
CD4 <sup>+</sup> T-cells < LLN of 491/ $\mu$ L	<i>n</i> (%)	49/108 (45.4)	25/66 (37.9)	21/38 (55.3)	3/4 (75)	
CD8 <sup>+</sup> T-cells < LLN of 162/ $\mu$ L	<i>n</i> (%)	21/108 (19.4)	15/66 (22.7)	4/38 (10.5)	2/4 (50)	
LDH > ULN of 4.2 $\mu$ kat/L	<i>n</i> (%)	53/175 (30.3)	35/98 (35.7)	12/64 (18.8)	6/13 (46.2)	
<b>Prior COVID-19 infection</b>	<i>n</i> (%)	11 (4.4)	5 (3.8)	6 (5.8)	0 (0)	9 (6.8)
<b>Type of vaccine *</b>						
mRNA-based	<i>n</i> (%)	215 (85.3)	108 (82.5)	91 (87.5)	16 (94.1)	103 (77.4)
Vector-based	<i>n</i> (%)	35 (13.9)	21 (16)	13 (12.5)	1 (5.9)	29 (21.8)
Missing	<i>n</i> (%)	2 (0.8)	2 (1.5)	0 (0)		1 (0.8)
<b>Interval between 1st and 2nd vaccination</b>		<i>n</i> = 230	<i>n</i> = 118	<i>n</i> = 95	<i>n</i> = 17	<i>n</i> = 107
Median Interval	d (IQR)	40 (22–42)	40 (22–42)	42 (21–42)	29 (21–42)	33 (21–42)
≤35 days	<i>n</i> (%)	110 (47.8)	55 (46.6)	45 (47.4)	10 (58.8)	58 (54.2)
>35 days	<i>n</i> (%)	120 (52.2)	63 (53.4)	50 (52.6)	7 (41.2)	49 (45.8)
<b>Active oncologic therapy</b>	<i>n</i> (%)	171 (67.9)	91 (69.5)	63 (60.6)	17 (100)	N/A
<b>Type of active oncologic therapy</b>						
TKI	<i>n</i> (%)		44 (48.3)	N/A	N/A	
INF	<i>n</i> (%)		9 (9.9)	N/A	N/A	
BTK-inhibitor	<i>n</i> (%)		N/A	15 (23.8)	N/A	
B-cell-depleting therapy	<i>n</i> (%)		N/A	15 (23.8)	N/A	
Chemotherapy	<i>n</i> (%)		18 (19.8)	6 (9.5)	N/A	
Checkpoint inhibitor	<i>n</i> (%)		N/A	1 (1.6)	17 (100)	
Others	<i>n</i> (%)		20 (22)	26 (41.3)	N/A	

\* mRNA-based vaccines: BNT162b2 Comirnaty ©Biontech/Pfizer or mRNA-1273 vaccine ©Moderna; vector-based vaccines: Vaxzevria ©AstraZeneca or COVID-19 Vaccine Janssen by ©Johnson&Johnson. Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BTK, bruton tyrosine kinase; CLL, chronic lymphatic leukemia; d, days; INF, interferone; IQR, interquartile range; LDH, lactatdehydrogenase; LLN, lower limit of normal; MDS, myelodysplastic syndrome; MPN, myeloproliferative neoplasm; N/A, not applicable; TKI, tyrosine kinase inhibitor; ULN, upper limit of normal; WBC, white blood cell count.



**Figure 1.** CONSORT flowchart of study population.

### 3.2. SARS-CoV-2 Spike-Specific Humoral Response

#### 3.2.1. Day 35 Spike-Specific Seroconversion

Though no difference in d35 anti-spike-IgG mean values between patients and controls (95% CI,  $-1438.5-559.8$ ) were detected, anti-spike-IgGs  $>0.8$  U/mL were measured in 121 (98%) controls and 162 (68%) patients ( $p < 0.001$ ). Seroconversion rates in both the myeloid (82%) and lymphoid cohorts (48%) were lower compared to controls ( $p < 0.001$ ) (Table 3; Figure 2). The same trends were seen when median titers were considered. Seroconversion occurred in 13 (81%) patients under checkpoint inhibitor therapy.

#### 3.2.2. Day 120 Spike-Specific Seroconversion

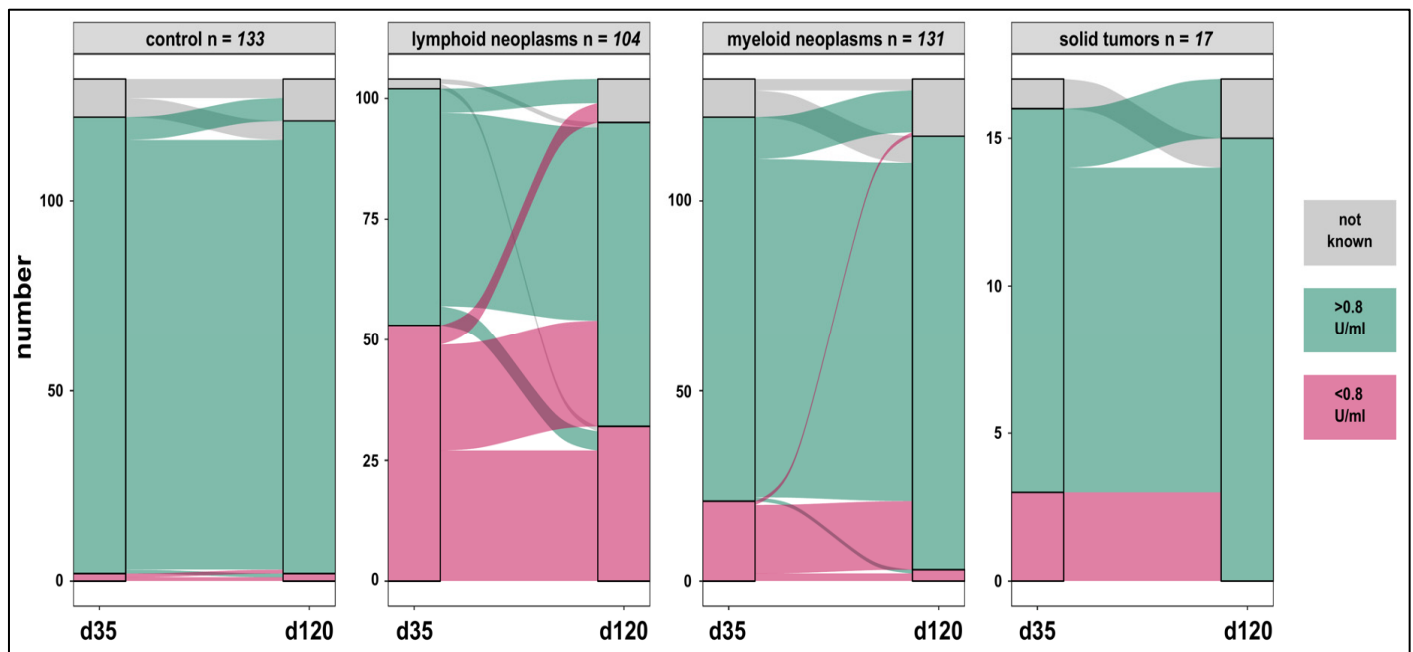
The difference in d120 mean IgG values between patients and controls was not significant (95% CI,  $-639.4-889.1$ ). However, mean values on d120 were significantly higher across all study participants compared to d35 with a mean difference of 477 U/mL (95% CI,  $92.4-861.6$ ). Seroconversion in controls was maintained (98%) and substantial increases in the myeloid (97%) and checkpoint inhibitor (100%) cohorts were seen. These response rates were higher compared to those seen in the lymphoid group (66%) ( $p < 0.001$ ). Similarly, median IgG levels were highest in controls (1212 U/mL) and lowest in the lymphoid cohort (88.3 U/mL) ( $p < 0.001$ ) (Table 3). Overall, 76% of controls and patients maintained humoral immunogenicity over time (Figure 2). An association between d35 and d120 anti-spike-IgGs in 333 paired samples [controls ( $n = 117$ ); patients ( $n = 216$ )] was found ( $R^2 = 0.34$ ;  $p < 0.001$ ). Seroconversion on d120, despite d35 IgGs  $< 0.8$  U/mL was documented in 18/20 (90%) and 22/49 (45%) patients with myeloid and lymphoid neoplasms respectively. Five of six subjects who lost d35 response belonged to the lymphoid group. Anti-spike-IgGs  $> 0.8$  U/mL

on d120 were detected in 30/33 (91%) subjects including 14 patients who received only one vaccine injection.

**Table 3.** Humoral and T-cell response to vaccination in controls and patient cohorts.

Parameter		Controls	Myeloid Neoplasms	Lymphoid Neoplasms	Solid Tumors
<b>Anti-spike IgG</b>					
day 35	n (%)	121 (98%)	100 * (82%)	49 *,# (48%)	13 (81%)
	Median (IQR) [U/mL]	166 (32–1558)	27.9 § (2.4–466)	0.59 §,& (0.39–30)	22.4 § (1.1–462)
	day 120	120 (98%)	113 (97%)	63 *,# (66%)	15 (100%)
day 120	Median (IQR) [U/mL]	1212 (506–2854)	874 § (149–2063)	88.3 §,& (0.39–535)	130 § (52–1153)
<b>SARS-CoV2 specific T cells</b>					
CovCD4+	n (%)	68 (74%)	46 * (53%)	30 # (71%)	—
	Median (IQR) [% of CD4+ T cells]	0.0091 (0.0044–0.0189)	0.0057 (0.0015–0.0178)	0.012 & (0.0039–0.029)	—
	day 120	39 (42%)	24 * (28%)	13 (31%)	—
day 120	Median (IQR) [% of CD8+ T cells]	0.0016 (0.0005–0.0064)	0.0031 § (0.0001–0.0035)	0.0011 (0.0001–0.0039)	—

Numbers (and %) of subjects with IgG concentrations >0.8 U/mL, CovCD4+, and CovCD8+ responses above the limit of detection (LOD) per parameter. Medians and interquartile ranges (IQR) by parameter and cohort. \*§: significantly different from control; #,&: significantly different from myeloid neoplasms.



**Figure 2.** Humoral anti-spike-specific responses in patients and controls on day 35 and day 120 after vaccination. Specific IgG responses were maintained at high rates in controls (98%) and increased in patients with oncologic malignancies on checkpoint inhibitors (81% to 100%), lymphoid (48% to 66%), and myeloid neoplasms (82% to 97%). A complete loss of the anti-spike IgG was rarely seen.

### 3.3. Day 120 SARS-CoV-2 Spike-Specific T-Cell Response

CovCD4 and/or CovCD8 were detected in 155/223 (69.5%) subjects [controls: 81.5%; patients 61% ( $p = 0.02$ )] with CovCD4 being more frequent than CovCD8 responses

( $p < 0.001$ ) (Table 3, Figure 3). The differences in mean values of CovCD4 (95% CI,  $-0.00$ – $0.02$ ) and CovCD8 (95% CI,  $-0.00$ – $0.02$ ) between patients and controls were not significant. CovCD4 cells were more frequently detected in the control (74%) and lymphoid (71%) cohorts compared to the myeloid cohort (53%,  $p = 0.003$  vs. controls), mirrored by a similar trend for CovCD8 cells (myeloid 28%, controls 42%,  $p = 0.03$ , Table 3). For controls, significant, but relatively weak pair-wise correlations were seen between d120 IgG responses, CovCD4, and CovCD8 cells (Figure 3). Such a correlation could not be detected in the myeloid or lymphoid cohorts. A sizeable fraction of patients in the lymphoid cohort demonstrated CovCD4 and/or CovCD8 responses without detectable spike-specific IgGs (Figure 3).

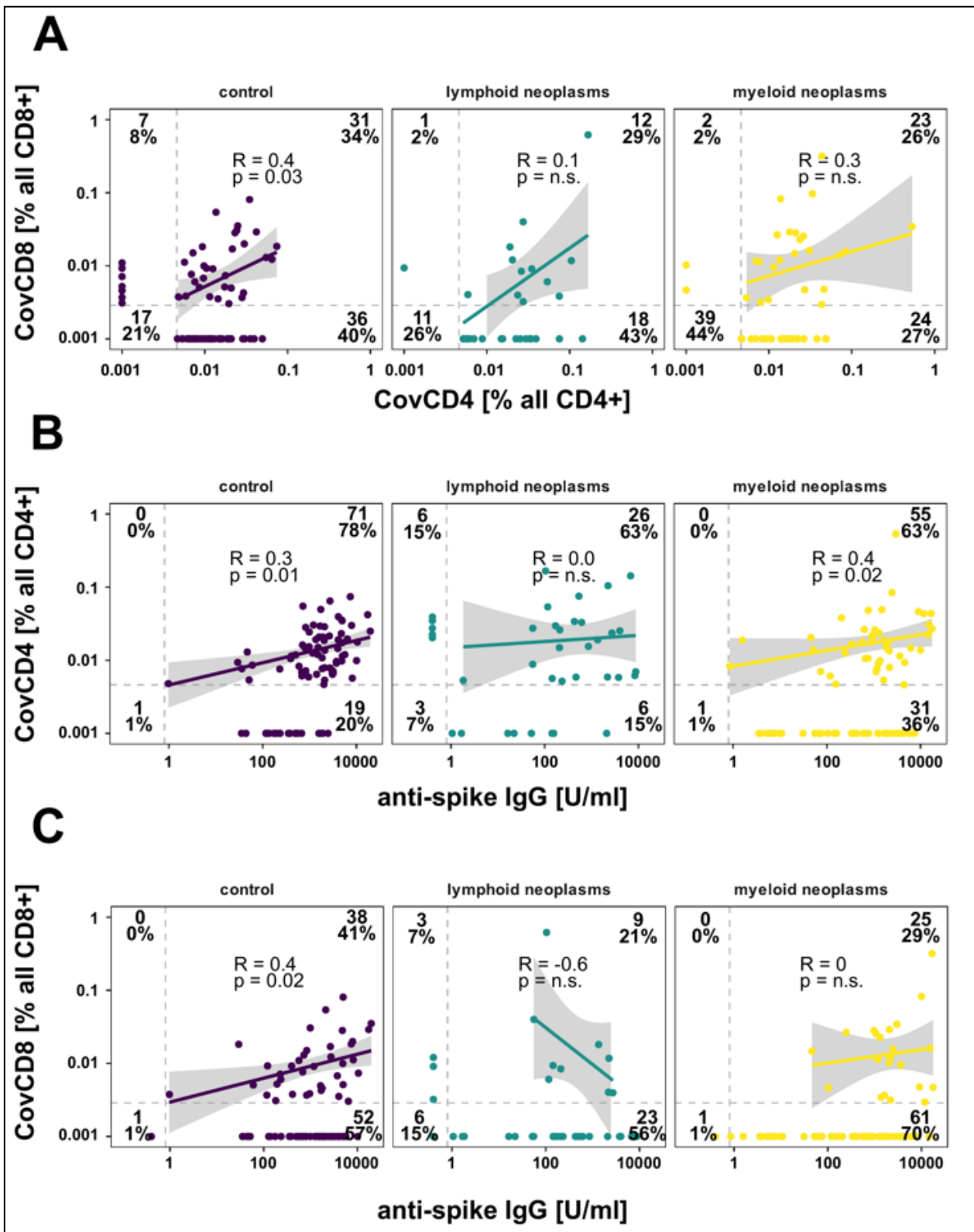
### 3.4. Predictors of Spike-Specific Immune Responses

Both patient- and vaccine-related factors were evaluated for a potential impact on humoral and cellular immune responses. Patient-related variables included age [continuous variable, 5- and 10-years frequency-matching], gender, baseline B- and T-cell counts, pre-vaccination anti-spike-IgGs, cohort category [controls vs. patients], and diagnosis [myeloid neoplasm vs. lymphoid neoplasm vs. solid tumor receiving PD-L1 inhibition]. Vaccine-related factors were the type of vaccine, number of injections (one versus two), and interval between injections [continuous variable; interval  $\leq 35$  vs.  $> 35$  days].

For the entire study cohort, with the exception of pre-vaccination anti-spike-IgGs ( $R^2 = 0.2$ ;  $p < 0.001$ ), no relationship was found between d35 and d120 humoral responses and patient-related variables, including older age and vaccine-related factors. In the myeloid group, only pre-vaccination anti-spike-IgGs were associated with higher d35 and d120 humoral responses. The interval between injections had no significant impact on vaccine-induced humoral or cellular responses. Although statistically not significant ( $p = 0.05$ ), an interval  $> 35$  days between injections tended to be associated with lower d35 but not d120 humoral responses in the lymphoid cohort only. In the myeloid and lymphoid cohorts, CovCD4 and CovCD8-cell responses were not associated with patient- or vaccine-related variables.

Due to the diversity of cancer therapies, the impact of treatment on vaccine-elicited responses was explored without regression models. For the myeloid cohort, d35 (83%) and d120 (97.4%) humoral as well as CovCD4 (53%) and CovCD8 (28%) responses were comparable in patients receiving tyrosine-kinase-inhibitors for *BCR-ABL1*-positive CML, JAK-inhibitors for myeloproliferative neoplasms, and other therapies to those on no treatment ( $p = 0.3$ ). For the lymphoid group, d35 seroconversion was lowest in the B-cell depleting therapy (13%) or bruton-tyrosine-kinase-inhibitor (BTKi) (21.4%) groups compared to other (58%) or no (62.5%) treatment groups ( $p < 0.001$ ). No patient on B-cell depleting therapy had detectable d120 anti-spike-IgGs compared to positive seroconversions in the BTKi [7/15; (47%)], other treatment [23/30; (77%)], and no therapy [33/38; (87%)] groups ( $p < 0.001$ ). CovCD4 [30/42 (71.4%)] and CovCD8 [13/42 (31%)] were detected across all treatment categories.

Humoral responses on d35 were documented in 21/30 (70%) subjects with a history of HCT. On d120, 8/9 subjects with negative d35 antibodies seroconverted including 3/4 patients with a HCT-to-vaccination interval  $< 12$  months. CovCD4 (62.5%) and CovCD8 (29%) were measured after HCT.



**Figure 3.** Correlation between spike-specific CD4 + IL-2 + IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  (CovCD4) and CD8 + IL-2 + IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$  (CovCD8) cell responses (A) and anti-spike IgG concentrations (B,C) on day 120 after vaccination. Results are shown for controls as well as for patients with lymphoid and myeloid neoplasms. Broken lines represent the limit of detection (LOD). Regression lines, Spearman correlation coefficients, and significance are calculated for double positive patients.

#### 4. Discussion

Despite the older age of patients compared to controls, sustainable and/or improvements in seroconversion rates and anti-spike-IgG concentrations over time were observed across all cohorts. As expected, d35 seroconversion was higher in controls (98%) compared to patients (68%) ( $p < 0.001$ ). However, d120 seroconversion improved across all patient cohorts [oncologic malignancies under PD-L1 inhibitor therapies (81% to 100%), myeloid neoplasms (82% to 97%), lymphoid neoplasms (48% to 66%)]. Indeed, patients with myeloid and oncologic malignancies under PD-L1 inhibitor therapies had comparable seroconversion rates to the control group. The few cases with pre-vaccination anti-spike-IgGs without a known history of COVID-19 infection might represent asymptomatic infections or cross-reactive antibodies generated during previous infections with other coronaviral strains [50].

Another key finding was the remarkable and largely seroconversion-independent d120 SARS-CoV-2-specific CD4<sup>+</sup>TNFa<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>TNFa<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-cells across all cohorts, particularly in the lymphoid group with the lowest seroconversion rate. Indeed, the cellular response in patients with lymphoid neoplasms with detectable CovCD4<sup>+</sup>- in 71% and CovCD8<sup>+</sup>-cells in 31% of cases was comparable to that measured in the control group (CovCD4<sup>+</sup>- 74% and CovCD8<sup>+</sup>-cells 42%). A sizeable fraction of lymphoid patients demonstrated T-cell responses without detectable spike-specific-IgGs. Overall, CD4<sup>+</sup> T-cell responses outnumbered CD8<sup>+</sup> responses in our study. This is in line with what has been observed in immunocompetent individuals [34,51].

To our knowledge, this work is the first to describe the kinetics of SARS-CoV-2 vaccine-induced humoral and cellular responses over time. The impaired early (d35) seroconversion in patients with hematologic malignancies is in line with previous publications [11–26]. However, the majority of patients demonstrate sustained and/or improved humoral and/or cellular responses if measured later (d120). These immune responses were seen irrespective of the type of vaccine or interval between injections. In a recent longitudinal study, antibodies against the SARS-CoV-2 spike antigen and specific memory cell responses were detected in 96% and 63% of health care workers four- and eight-months post infection [52,53].

In line with the literature, our data imply that the previously reported “early” T-cell responses [15,24,34–41] are likely to persist for several months in patients with hematologic malignancies after vaccination similar to what has been observed in immunocompetent individuals after COVID-19 infections [30–32,53].

Taken together, our results underscore the need for large-scale follow-up data to establish standardized post-vaccination time-windows for humoral and cellular response assessments to identify “true vaccination failures” in cancer patients.

However, the routine applicability of tests to measure humoral and cellular immune responses remains challenging. Although several assays for anti-SARS-CoV-2-IgG are commercially available, current assays generate discrepant results. In fact, we are still far from the identification of optimal thresholds for IgG-positivity as a surrogate for neutralization capacity and neutralizing antibodies (NAbs) which confer protection [29,54–57]. Further, correlations between NAbs and clinical efficacy against infections are weak and likely rely on the population tested [58,59].

The issue is even more complicated regarding cellular response assays. Generally, they are not readily available and mainly used for research purpose. There is often a preponderance of using IFN $\gamma$ -related readouts to assess T-cell responses [24,60]. However, data suggest that polyfunctional T-cells have higher protective efficacy after vaccination compared to IFN $\gamma$  monofunctional T-cells [61]. The true percentages of patients developing polyfunctional vaccine-induced CD4<sup>+</sup>TNFa<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>TNFa<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-cells might be incorrectly assessed if IL-2 is not considered [43].

Although cellular responses are promising indicators of immunity, our data do not suggest that those with a response compared to those without such a response are more likely to be protected. Yet, even if infections cannot be prevented, it is still possible that T-cell responses are sufficient to ensure mild courses of COVID-19 disease. Thus,

studies are necessary to evaluate the degree of cellular-induced clinical protection. Further, SARS-CoV-2 variants such as Omicron (B.1.1.529) with their antibody escape highlight the importance of addressing whether T-cell recognition is also affected.

One limitation is that we did not measure NABs with virus neutralization assays which are considered to be the gold standard. Yet, we used an anti-SARS-CoV-2 IgG assay with cutoffs for reasonable prediction of NAb [62]. After enrollment started, health authorities in some federal states in Germany changed the interval between injections from 21 to 42 days. The potential impact on d35 response evaluation was discussed with the statistician and accounted for by including the interval as a vaccine-related variable in the regression model. As ~50% of participants across all cohorts received the second injection 42 days later, comparison between groups was feasible. Finally, despite the relatively large number of participants, data of secondary outcomes remain explorative and need to be confirmed in larger trials.

In summary, our longitudinal study describes the nature of SARS-CoV-2 vaccine-induced humoral and cellular immune landscape in patients with hematologic on oncologic malignancies under PD-L1 inhibition.

## 5. Conclusions

We provide strong empirical evidence of early and late SARS-CoV-2 vaccine-elicited immunogenicity in patients with hematologic neoplasms and oncologic patients receiving checkpoint inhibitors. Even with blunted and heterogeneous antibody responses, T-cell priming seems to be largely intact. This study provides key information and fills knowledge gaps with respect to T-cell responses in vulnerable persons. Both the kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibodies over time and cellular responses are crucial to determine which patients will generate and maintain immunity after vaccination.

The findings have implications on clinical decision-making for designing vaccine strategies given the current timing and recommendations for SARS-CoV-2 booster doses. It will be important in the future to determine whether the residual humoral immunity and sustained T-cell responses, retain the ability to respond to emerging SARS-CoV-2 variants. Larger studies with clinical outcomes are needed.

**Author Contributions:** H.K.A.-A., S.J., S.S. and N.J. had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. S.J. and S.S. contributed equally as first authors. Conceptualization, H.K.A.-A., M.B., N.J. and S.S.; methodology, H.K.A.-A., M.B., S.B., B.L.-K., N.J. and S.S.; formal analysis, H.K.A.-A., S.B., R.E., N.J., S.J. and S.S.; investigation, H.K.A.-A., T.B., S.B., R.E., N.J., S.J., F.B.K., B.L.-K., J.M., B.P., G.P.-K., S.S., M.S. and C.S.; resources, H.K.A.-A., T.B., S.B., R.E., N.J., F.B.K., B.L.-K., J.M., B.P., G.P.-K., S.S., M.S. and C.S.; data curation, H.K.A.-A., S.B., R.E., N.J., S.J., F.B.K., B.L.-K., N.N., S.S. and C.Z.; writing—original draft preparation, H.K.A.-A., S.B., R.E., S.J., N.J., F.B.K., B.L.-K. and S.S.; writing—review and editing, all authors; visualization, H.K.A.-A., S.B., R.E. and N.J.; supervision, H.K.A.-A., S.B. and B.L.-K.; project administration, H.K.A.-A., S.B., R.E., S.J., C.J., F.B.K., B.L.-K., N.N., S.S. and C.Z.; funding acquisition, H.K.A.-A. and C.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the Medical Faculty of the Martin-Luther University Halle-Wittenberg and the University Medical School Rostock. This work was supported by a grant from the German Leukemia and Lymphoma Foundation (Stiftung Deutsche Leukämie- & Lymphom-Hilfe), grant number 32105069.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of the MARTIN-LUTHER-UNIVERSITY HALLE-WITTENBERG (protocol code 2021-026; date of approval: 17 March 2021), the Ethics Committee of the SÄCHSISCHE LANDESÄRZTEKAMMER (protocol code EK-BR-45/21-1; date of approval: 20 April 2021), and the Ethics Committee of the ÄRZTEKAMMER SACHSEN-ANHALT (protocol code 37/21; date of approval: 31 May 2021), for studies involving humans.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.



**Data Availability Statement:** The trial was registered at Deutsches Register Klinischer Studien (DRKS00027372) and the Paul-Ehrlich Institute (NIS-584).

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Andreas Wienke for sample size calculation and design of statistical methods and to the work of the clinical, laboratory, and administrative personnel without whom this study would not have been possible. The authors thank all study participants.

**Conflicts of Interest:** A-A.H.K.: Consulting: Novartis, BMS, Takeda, Pfizer, Abbvie; Honoraria: Novartis, BMS, Takeda, Pfizer, Abbvie; Research Funding: Novartis, BMS, Incyte; B.S.: Consulting: Roche, Honoraria Roche, AbbVie, Novartis, AstraZeneca, Amgen, Janssen, Research Funding: Janssen, Miltenyi Biotec, Roche, Genentech, AbbVie; J.C.: Honoraria Novartis, Amgen, Janssen, AbbVie Research Funding: Janssen, Miltenyi Biotec, Roche, Centogene; All other authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Lee, L.Y.W.; Cazier, J.-B.; Angelis, V.; Arnold, R.; Bisht, V.; Campton, N.A.; Chackathayil, J.; Cheng, V.W.T.; Curley, H.M.; Fittall, M.W.T.; et al. COVID-19 mortality in patients with cancer on chemotherapy or other anticancer treatments: A prospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1919–1926. [[CrossRef](#)]
- Kuderer, N.M.; Choueiri, T.K.; Shah, D.P.; Shyr, Y.; Rubinstein, S.M.; Rivera, D.R.; Shete, S.; Hsu, S.-H.; Desai, A.; de Lima Lope, G., Jr.; et al. Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): A cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1907–1918. [[CrossRef](#)]
- García-Suárez, J.; de la Cruz, J.; Cedillo, Á.; Llamas, P.; Duarte, R.; Jiménez-Yuste, V.; Hernández-Rivas, J.A.; Gil-Manso, R.; Kwon, M.; Sánchez-Godoy, P.; et al. Impact of hematologic malignancy and type of cancer therapy on COVID-19 severity and mortality: Lessons from a large population-based registry study. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xhaard, A.; Xhaard, C.; D’Aveni, M.; Salvator, H.; Chabi, M.-L.; Berceanu, A.; Coman, T.; Beguin, Y.; Chalandon, Y.; Poiré, X.; et al. Risk factors for a severe form of COVID-19 after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: A Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie cellulaire (SFGM-TC) multicentre cohort study. *Br. J. Haematol.* **2021**, *192*, e121–e124. [[CrossRef](#)]
- Voysey, M.; Clemens, S.A.C.; Madhi, S.A.; Weckx, L.Y.; Folegatti, P.M.; Aley, P.K.; Angus, B.; Baillie, V.L.; Barnabas, S.L.; Borat, Q.E.; et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: An interim analysis of four randomized controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* **2021**, *397*, 99–111. [[CrossRef](#)]
- Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [[CrossRef](#)]
- Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 403–416. [[CrossRef](#)]
- Sadoff, J.; Gray, G.; Vandebosch, A.; Cárdenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, P.A.; Truyers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 2187–2201. [[CrossRef](#)]
- Oosting, S.F.; van der Veldt, A.A.M.; GeurtsvanKessel, C.H.; Fehrmann, R.S.N.; van Binnendijk, R.S.; Dingemans, A.-M.C.; Smit, E.F.; Hiltermann, T.J.N.; den Hartog, G.; Jalving, M.; et al. mRNA-1273 COVID-19 vaccination in patients receiving chemotherapy, immunotherapy, or chemoimmunotherapy for solid tumours: A prospective, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 1681–1691. [[CrossRef](#)]
- Shroff, R.T.; Chalasani, P.; Wei, R.; Pennington, D.; Quirk, G.; Schoenle, M.V.; Peyton, K.L.; Uhrlaub, J.L.; Ripperger, T.J.; Jergović, M.; et al. Immune responses to two and three doses of the BNT162b2 mRNA vaccine in adults with solid tumors. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 2002–2011. [[CrossRef](#)]
- Diefenbach, C.; Caro, J.; Koide, A.; Grossbard, M.; Goldberg, J.D.; Raphael, B.; Hymes, K.; Moskovits, T.; Kreditor, M.; Kaminetzky, D.; et al. Impaired Humoral Immunity to SARS-CoV-2 Vaccination in Non-Hodgkin Lymphoma and CLL Patients. *medRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
- Herishanu, Y.; Avivi, I.; Aharon, A.; Shefer, G.; Levi, S.; Bronstein, Y.; Morales, M.; Ziv, T.; Arbel, Y.S.; Scarfò, L.; et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 3165–3173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Addeo, A.; Shah, P.K.; Bordry, N.; Hudson, R.D.; Albracht, B.; Di Marco, M.; Kaklamani, V.; Dietrich, P.-Y.; Taylor, B.S.; Simand, P.-F.; et al. Immunogenicity of SARS-CoV-2 messenger RNA Vaccines in Patients with Cancer. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 1091–1098.e2. [[CrossRef](#)]
- Pimpinelli, F.; Marchesi, F.; Piaggio, G.; Giannarelli, D.; Papa, E.; Falcucci, P.; Pontone, M.; Di Martino, S.; Laquintana, V.; La Malfa, A.; et al. Fifth-week immunogenicity and safety of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in patients with multiple myeloma and myeloproliferative malignancies on active treatment: Preliminary data from a single institution. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harrington, P.; de Lavallade, H.; Doores, K.J.; O’Reilly, A.; Seow, J.; Graham, C.; Lechmere, T.; Radia, D.; Dillon, R.; Shanmugaraj, Y.; et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2 induces high frequency of neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **2021**, *35*, 3573–3577. [[CrossRef](#)]

16. Harrington, P.; Doores, K.J.; Radia, D.; O'Reilly, A.; Lam, H.P.J.; Seow, J.; Graham, C.; Lechmere, T.; McLornan, D.; Dillon, R.; et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) induces neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2021**, *194*, 999–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Oekelen, O.V.; Gleason, C.R.; Agte, S.; Srivastava, K.; Beach, K.F.; Aleman, A.; Kappes, K.; Mouhieddine, T.H.; Wang, B.; Chari, A.; et al. Highly variable SARS-CoV-2 spike antibody responses to two doses of COVID-19 RNA vaccination in patients with multiple myeloma. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 1028–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Maneikis, K.; Šablauskas, K.; Ringelevičiūtė, U.; Vaitekėnaitė, V.; Čekauskienė, R.; Kryžauskaitė, L.; Naumovas, D.; Banys, V.; Pečeliūnas, V.; Beinortas, T.; et al. Immunogenicity of the BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccine and early clinical outcomes in patients with haematological malignancies in Lithuania: A national prospective cohort study. *Lancet Haematol.* **2021**, *8*, e583–e592. [[CrossRef](#)]
19. Malard, F.; Gaugler, B.; Gozlan, J.; Bouquet, L.; Fofana, D.; Siblany, L.; Eshagh, D.; Adotevi, O.; Laheurte, C.; Ricard, L.; et al. Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Cancer J.* **2021**, *11*, 142. [[CrossRef](#)]
20. Monin, L.; Laing, A.G.; Muñoz-Ruiz, M.; McKenzie, D.R.; del Molino del Barrio, I.; Alaguthurai, T.; Domingo-Vila, C.; Hayday, T.S.; Graham, C.; Seow, J.; et al. Safety and immunogenicity of one versus two doses of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with cancer: Interim analysis of a prospective observational study. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 765–778. [[CrossRef](#)]
21. Le Bourgeois, A.; Coste-Burel, M.; Guillaume, T.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Béné, M.C.; Chevallier, P. Safety and Antibody Response After 1 and 2 Doses of BNT162b2 mRNA Vaccine in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2126344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bird, S.; Panopoulou, A.; Shea, R.L.; Tsui, M.; Saso, R.; Sud, A.; West, S.; Smith, K.; Barwood, J.; Kaczmarek, E.; et al. Response to first vaccination against SARS-CoV-2 in patients with multiple myeloma. *Lancet Haematol.* **2021**, *8*, e389–e392. [[CrossRef](#)]
23. Ghione, P.; Gu, J.J.; Attwood, K.; Torka, P.; Goel, S.; Sundaram, S.; Mavis, C.; Johnson, M.; Thomas, R.; McWhite, K.; et al. Impaired humoral responses to COVID-19 vaccination in patients with lymphoma receiving B-cell-directed therapies. *Blood* **2021**, *138*, 811–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liebers, N.; Speer, C.; Benning, L.; Bruch, P.-M.; Kraemer, I.; Meissner, J.; Schnitzler, P.; Kräusslich, H.-G.; Dreger, P.; Mueller-Tidow, C.; et al. Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20 treated lymphoma patients. *Blood* **2021**, *139*, 142–147. [[CrossRef](#)]
25. Roeker, L.E.; Knorr, D.A.; Thompson, M.C.; Nivar, M.; Lebowitz, S.; Peters, N.; Deonaraine, L., Jr.; Momotaj, S.; Sharan, S.; Chanlatte, V.; et al. COVID-19 vaccine efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2021**, *35*, 2703–2705. [[CrossRef](#)]
26. Terpos, E.; Trougakos, I.P.; Gavriatopoulou, M.; Papassotiriou, I.; Sklirou, A.D.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Papanagnou, E.-D.; Fotiou, D.; Kastritis, E.; Dimopoulos, M.A. Low neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in elderly myeloma patients after the first BNT162b2 vaccine dose. *Blood* **2021**, *137*, 3674–3676. [[CrossRef](#)]
27. Lucas, C.; Klein, J.; Sundaram, M.E.; Liu, F.; Wong, P.; Silva, J.; Mao, T.; Oh, J.E.; Mohanty, S.; Huang, J.; et al. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1309. [[CrossRef](#)]
28. Dispinseri, S.; Secchi, M.; Pirillo, M.F.; Tolazzi, M.; Borghi, M.; Brigatti, C.; De Angelis, M.L.; Baratella, M.; Bazzigaluppi, E.; Venturi, G.; et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2670. [[CrossRef](#)]
29. Khoury, D.S.; Cromer, D.; Reynaldi, A.; Schlub, T.E.; Wheatley, A.K.; Juno, J.A.; Subbarao, K.; Kent, S.J.; Triccas, J.A.; Davenport, M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1205–1211. [[CrossRef](#)]
30. Dan, J.M.; Mateus, J.; Kato, Y.; Hastie, K.M.; Dawen Yu, E.; Faliti, C.E.; Grifoni, A.; Ramirez, S.I.; Haupt, S.; Frazier, A.; et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* **2021**, *371*, eabf4063. [[CrossRef](#)]
31. Sekine, T.; Perez-Potti, A.; Rivera-Ballesteros, O.; Stralin, K.; Gorin, J.-B.; Olsson, A.; Llewellyn-Lacey, S.; Kamal, H.; Bogdanovic, G.; Muschiolet, S.; et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* **2020**, *183*, 158–168.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rydyznski Moderbacher, C.; Ramirez, S.; Dan, J.M.; Grifoni, A.; Hastie, K.M.; Weiskopf, D.; Belanger, S.; Abbott, R.K.; Kim, C.; Choi, J.; et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* **2020**, *183*, 996–1012.e19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mathew, D.; Giles, J.R.; Baxter, A.E.; Oldridge, D.A.; Greenplate, A.R.; Wu, J.E.; Alanio, C.; Kuri-Cervantes, L.; Pampena, M.B.; D'Andrea, K.; et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* **2020**, *369*, eabc8511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Grifoni, A.; Weiskopf, D.; Ramirez, S.I.; Mateus, J.; Dan, J.M.; Rydyznski Moderbacher, C.; Rawlings, S.A.; Sutherland, A.; Premkumar, L.; Jadi, R.S.; et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* **2020**, *181*, 1489–1501.e1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bange, E.M.; Han, N.A.; Wileyto, P.; Kim, J.Y.; Gouma, S.; Robinson, J.; Greenplate, A.R.; Hwee, M.A.; Porterfield, F.; Owoyemi, O.; et al. CD8 + T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1280–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Sattler, A.; Angermair, S.; Stockmann, H.; Heim, K.M.; Khadzhyonov, D.; Treskatsch, S.; Halleck, F.; Kreis, M.E.; Kotsch, K. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 6477–6489. [CrossRef] [PubMed]
37. Sahin, U.; Muik, A.; Vogler, I.; Derhovanessian, E.; Kranz, L.M.; Vormehr, M.; Quandt, J.; Bidmon, N.; Ulges, A.; Baum, A.; et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* **2021**, *595*, 572–577. [CrossRef]
38. Schmidt, T.; Klemis, V.; Schub, D.; Mihm, J.; Hielscher, F.; Marx, S.; Abu-Omar, A.; Ziegler, L.; Guckelmuß, C.; Urschel, R.; et al. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1530–1535. [CrossRef]
39. Swanson, P.A.; Padilla, M.; Hoyland, W.; McGlinchey, K.; Fields, P.A.; Bibi, S.; Faust, S.N.; McDermott, A.B.; Lambe, T.; Pollard, A.J.; et al. AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific Th1 response with a diverse TCR repertoire. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabj7211. [CrossRef]
40. Oberhardt, V.; Luxenburger, H.; Kemming, J.; Schulien, I.; Ciminski, K.; Giese, S.; Csernalabics, B.; Lang-Meli, J.; Janowska, I.; Staniek, J.; et al. Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Nature* **2021**, *597*, 268–273. [CrossRef]
41. Apostolidis, S.A.; Kakara, M.; Painter, M.M.; Goel, R.R.; Mathew, D.; Lenzi, K.; Rezk, A.; Patterson, K.R.; Espinoza, D.A.; Kadri, J.C.; et al. Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1990–2001. [CrossRef] [PubMed]
42. Sette, A.; Crotty, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* **2021**, *184*, 861–880. [CrossRef] [PubMed]
43. Sahin, U.; Muik, A.; Derhovanessian, E.; Vogler, I.; Kranz, L.M.; Vormehr, M.; Baum, A.; Pascal, K.; Quandt, J.; Maurus, D.; et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* **2020**, *586*, 594–599. [CrossRef]
44. Knezevic, I.; Mattiuzzo, G.; Page, M.; Minor, P.; Griffiths, E.; Nuebling, M.; Moorthy, V. WHO International Standard for evaluation of the antibody response to COVID-19 vaccines: Call for urgent action by the scientific community. *Lancet Microbe* **2021**, *3*, e235–e240. [CrossRef]
45. WHO International Institute for Biological Standards and Control. First WHO International Standard Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin (Human). Version 2.0. NIBSC Code: 20/136. Counter = 1213. Available online: [https://www.nibsc.org/products/brm\\_product\\_catalogue/detail\\_page.aspx?catid=20/136](https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=20/136) (accessed on 17 December 2020).
46. Riester, E.; Findeisen, P.; Hegel, J.K.; Kabesch, M.; Ambrosch, A.; Rank, C.M.; Pessl, F.; Laengin, T.; Niederhauser, C. Performance evaluation of the Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S immunoassay. *J. Virol. Methods* **2021**, *297*, 114271. [CrossRef]
47. Kalina, T.; Flores-Montero, J.; van der Velden, V.H.J.; Martin-Ayuso, M.; Böttcher, S.; Ritgen, M.; Almeida, J.; Lhermitte, L.; Asnafi, V.; Mendonça, A.; et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* **2012**, *26*, 1986–2010. [CrossRef]
48. McNeil, L.K.; Price, L.; Britten, C.M.; Jaimes, M.; Maecker, H.; Odunsi, K.; Matsuzaki, J.; Staats, J.S.; Thorpe, J.; Yuan, J.; et al. A harmonized approach to intracellular cytokine staining gating: Results from an international multicenter proficiency panel conducted by the Cancer Immunotherapy Consortium (CIC/CRI). *Cytom. Part A* **2013**, *83*, 728–738. [CrossRef]
49. Price, L.S.; Adamow, M.; Attig, S.; Fecci, P.; Norberg, P.; Reap, E.; Janetzki, S.; McNeil, L.K. Gating Harmonization Guidelines for Intracellular Cytokine Staining Validated in Second International Multicenter Proficiency Panel Conducted by Cancer Immunotherapy Consortium (CIC/CRI). *Cytom. Part A* **2021**, *99*, 107–116. [CrossRef]
50. Bates, T.; Weinstein, J.; Farley, S.; Leier, H.; Messer, W.; Tafesse, F. Cross-reactivity of SARS-CoV structural protein antibodies against SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108737. [CrossRef]
51. Law, J.C.; Koh, W.H.; Budyłowski, P.; Lin, J.; Yue, F.; Abe, K.T.; Rathod, B.; Girard, M.; Li, Z.; Rini, J.M.; et al. Systematic Examination of Antigen-Specific Recall T Cell Responses to SARS-CoV-2 versus Influenza Virus Reveals a Distinct Inflammatory Profile. *J. Immunol.* **2021**, *206*, 37–50. [CrossRef]
52. Havervall, S.; Jernbom Falk, A.; Klingström, J.; Ng, H.; Greilert-Norin, N.; Gabriellson, L.; Salomonsson, A.-C.; Isaksson, E.; Rudberg, A.-S.; Hellström, C.; et al. SARS-CoV-2 induces a durable and antigen specific humoral immunity after asymptomatic to mild COVID-19 infection. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0262169. [CrossRef] [PubMed]
53. Havervall, S.; Ng, H.; Jernbom Falk, A.; Greilert-Norin, N.; Manberg, A.; Marking, U.; Laurén, I.; Gabriellson, L.; Salomonsson, A.-C.; Aguilera, K.; et al. Robust humoral and cellular immune responses and low risk for reinfection at least 8 months following asymptomatic to mild COVID-19. *J. Intern. Med.* **2021**, *291*, 72–80. [CrossRef] [PubMed]
54. Jung, K.; Shin, S.; Nam, M.; Hong, Y.J.; Roh, E.Y.; Park, K.U.; Song, E.Y. Performance evaluation of three automated quantitative immunoassays and their correlation with a surrogate virus neutralization test in coronavirus disease 19 patients and pre-pandemic controls. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, *35*, e23921. [CrossRef] [PubMed]
55. Hall, V.G.; Ferreira, V.H.; Ku, T.; Ierullo, M.; Majchrzak-Kita, B.; Chaparro, C.; Selzner, N.; Schiff, J.; McDonald, M.; Tomlinson, G.; et al. Randomized trial of a third dose of mRNA-1273 vaccine in transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1244–1246. [CrossRef]
56. Dimeglio, C.; Herin, F.; Martin-Blondel, G.; Miedougé, M.; Izopet, J. Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection. *J. Infect.* **2021**, *84*, 248–288. [CrossRef]
57. Feng, S.; Phillips, D.J.; White, T.; Sayal, H.; Aley, P.K.; Bibi, S.; Dold, C.; Fuskova, M.; Gilbert, S.C.; Hirsch, I.; et al. Oxford COVID Vaccine Trial Group. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 2032–2040. [CrossRef]

58. Patel, E.U.; Bloch, E.M.; Clarke, W.; Hsieh, Y.H.; Boon, D.; Eby, Y.; Fernandez, R.E.; Baker, O.R.; Keruly, M.; Kirby, C.S.; et al. Comparative performance of five commercially available serologic assays to detect antibodies to SARS-CoV-2 and identify individuals with high neutralizing titers. *J. Clin. Microbiol.* **2021**, *59*, e02257-20. [[CrossRef](#)]
59. Benning, L.; Tollner, M.; Hidmark, A.; Schaier, M.; Nussbag, C.; Kaelbe, F.; Reichel, P.; Buylaert, M.; Grenz, J.; Ponath, G.; et al. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 Prime-Boost Vaccination Induces Strong Humoral Responses among Health Care Workers. *Vaccines* **2021**, *9*, 857. [[CrossRef](#)]
60. Salomé, B.; Horowitz, A. Impaired CD4 T-cell Response to SARS-CoV-2: Rationale for PD-1 Blockade in Patients with Cancer and COVID-19? *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 1877–1878. [[CrossRef](#)]
61. Lin, L.; Finak, G.; Ushey, K.; Seshadri, C.; Hawn, T.R.; Frahm, N.; Scriba, T.J.; Mahomed, H.; Hanekom, W.; Bart, P.-A.; et al. COMPASS identifies T-cell subsets correlated with clinical outcomes. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 610–616. [[CrossRef](#)]
62. Rus, K.; Korva, M.; Knap, N.; Zupanc, T.; Poljak, M. Performance of the rapid high-throughput automated electrochemiluminescence immunoassay targeting total antibodies to the SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain in comparison to the neutralization assay. *J. Clin. Virol.* **2021**, *139*, 104820. [[CrossRef](#)]

# Vector-based SARS-CoV-2 vaccination is associated with improved T-cell responses in hematological neoplasia

Robby Engelmann,<sup>1</sup> Nadja Jaekel,<sup>2</sup> Sabrina Jotschke,<sup>3</sup> Beatrice Ludwig-Kraus,<sup>4</sup> Frank Bernhard Kraus,<sup>4</sup> Neha Kumari,<sup>1</sup> Susann Schulze,<sup>3</sup> Michael Hecker,<sup>5</sup> Christina Zahn,<sup>2</sup> Haifa Kathrin Al-Ali,<sup>3</sup> Christian Junghans,<sup>1</sup> and Sebastian Böttcher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic III–Hematology, Oncology, and Palliative Care, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany; <sup>2</sup>University Clinic and Outpatient Clinic for Internal Medicine IV, <sup>3</sup>Krukenberg Cancer Center Halle and <sup>4</sup>Central Laboratory, University Hospital Halle (Saale), Halle (Saale), Germany; and <sup>5</sup>Division of Neuroimmunology, Department of Neurology, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

## Key Points

- Vector-based SARS-CoV-2 vaccines are advantageous for the generation of T-cell responses in patients with hematological neoplasia.
- CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses cooccur in hematological neoplasms, whereas IgG titers are CD4<sup>+</sup> T cells associated in myeloid neoplasia only.

In order to elucidate mechanisms for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 vaccination success in hematological neoplasia, we, herein, provide a comprehensive characterization of the spike-specific T-cell and serological immunity induced in 130 patients in comparison with 91 healthy controls. We studied 121 distinct T-cell subpopulations and the vaccination schemes as putative response predictors. In patients with lymphoid malignancies an insufficient immunoglobulin G (IgG) response was accompanied by a healthy CD4<sup>+</sup> T-cell function. Compared with controls, a spike-specific CD4<sup>+</sup> response was detectable in fewer patients with myeloid neoplasia whereas the seroconversion rate was normal. Vaccination-induced CD4<sup>+</sup> responses were associated to CD8<sup>+</sup> and IgG responses. Vector-based AZD1222 vaccine induced more frequently detectable specific CD4<sup>+</sup> responses in study participants across all cohorts (96%; 27 of 28), whereas fully messenger RNA-based vaccination schemes resulted in measurable CD4<sup>+</sup> cells in only 102 of 168 participants (61%;  $P < .0001$ ). A similar benefit of vector-based vaccination was observed for the induction of spike-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Multivariable models confirmed vaccination schemes that incorporated at least 1 vector-based vaccination as key feature to mount both a spike-specific CD4<sup>+</sup> response (odds ratio, 10.67) and CD8<sup>+</sup> response (odds ratio, 6.56). Multivariable analyses identified a specific CD4<sup>+</sup> response but not the vector-based immunization as beneficial for a strong, specific IgG titer. Our study reveals factors associated with a T-cell response in patients with hematological neoplasia and might pave the way toward tailored vaccination schemes for vaccinees with these diseases. The study was registered at the German Clinical Trials Register as #DRKS00027372.

Submitted 29 September 2022; accepted 13 March 2023; prepublished online on *Blood Advances* First Edition 22 March 2023. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009054>.

All R scripts and accompanying raw data are available upon reasonable request to the corresponding author, Sebastian Böttcher ([sebastian.boettcher@med.uni-rostock.de](mailto:sebastian.boettcher@med.uni-rostock.de)).

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2023 by The American Society of Hematology. Licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

## Introduction

On 11 March 2020 the World Health Organization declared the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) outbreak a pandemic. Ever since, 2 major factors modified the individual risk of this disease and its general impact on health care systems: the advent of efficacious vaccines<sup>1-8</sup> and the occurrence of novel virus variants.<sup>9,10</sup> Both factors are interconnected by the ability of the host to mount a protective response against the circulating variants of the virus. Driven by the utmost importance of SARS-CoV-2, the characterization of infection<sup>11</sup> and vaccine immunity<sup>12-14</sup> recently attracted great interest. Animal models and correlative data suggest that antibodies might protect from reinfection with the same virus variant, whereas the quantity and activity of CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells determine the severity of the disease.<sup>9,11,15-24</sup> Compared with protection by neutralizing antibodies, T-cell-mediated protection is considered less susceptible to immune evasion by novel virus variants.<sup>9,16,19,25-27</sup> This has already been known for SARS-CoV-1<sup>28,29</sup> and is of particular importance for patients with hematological malignancies who are often unable to mount an antibody response.<sup>30-33</sup> Although, more information on serological responses and their kinetics has been published, detailed analyses of CD8<sup>+</sup> T-cell and CD4<sup>+</sup> T-cell responses are scarce.<sup>34</sup>

Patients with myeloid and lymphoid neoplasms are more likely to experience a severe course of COVID-19 disease.<sup>34-40</sup> Moreover, there are reports that vaccination might be less efficacious in these patient populations.<sup>31-33,36,41-55</sup> Similar to the general population, research among individuals with hematological malignancies has focused on kinetics and predictors of antibody responses, whereas less information on T-cell responses is available. We<sup>56</sup> and others<sup>57,58</sup> have recently described that patients with hematological malignancies can mount T-cell responses after vaccination while lacking a simultaneous antibody response. This finding casts doubts on the assumption that seroconversion alone sufficiently mirrors the success of a vaccination. It also corroborates the hypothesis that mechanisms of protection might differ between patients with hematological malignancies and the general population.

The messenger RNA (mRNA) vaccines tozinameran (BNT162b2, Pfizer-BioNTech) and elasmomeran (mRNA-1273, Moderna) as well as the adenoviral vector vaccine AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca)<sup>2,6,7</sup> are most widely used in Western Europe and North America. Combinations of mRNA- and vector-based vaccines (heterologous schemes) reportedly more efficiently induce T-cell responses<sup>59-64</sup> in healthy vaccinees than either principle.

In the future, vaccination strategies may be tailored based on the needs of particular patient groups. A better understanding of the adaptive immune responses to vaccination in patients is therefore urgently needed. Using extensive immune monitoring data from the prospective, multicentric ImV-Hong (OSHO#98) study, we, herein, comprehensively compare the immune system of patients with lymphoid and myeloid neoplasms who are SARS-CoV-2-vaccinated with that of healthy vaccinated controls. In-depth immunophenotyping data, demographics, clinical data, and the type of vaccine were fitted in multivariable regression models to study their association with vaccination-induced humoral and

cellular immune responses. T-cell responses were assessed using a SARS-CoV-2 spike peptide mix to elicit polyfunctional CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells, which are considered key mediators of a successful T-cell response.<sup>65-67</sup>

## Methods

### Study cohort

ImV-Hong (OSHO#98, registered at the Paul-Ehrlich Institute [NIS-584] and the German Clinical Trials Register [DRKS00027372]) is a longitudinal, prospective, multicenter, noninterventional study to compare spike protein-specific humoral and T-cell responses between controls and patients with hematological neoplasms and solid tumors.<sup>56</sup> The study was approved by the ethical review boards of all participating centers. All participants provided written informed consent.

We present an analysis of 228 participants from whom we received peripheral blood at Special Hematology Laboratory (Rostock University Medical Center) to evaluate the T-cell responses 120 days after the first SARS-CoV-2 vaccination. Patients who received their last disease-specific treatment within 6 months before first vaccination were considered to be under current cancer treatment. Additional details on sample eligibility and timing are provided in the supplemental Methods.

### Detection of SARS-CoV-2-specific T cells

SARS-CoV-2-specific T cells were detected using intracellular cytokine staining after stimulation with peptides covering the full-length, wild-type spike protein of SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Prot\_S Complete, order number 130-127-953; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously published (supplemental Table 1).<sup>56</sup> In short, after adding brefeldin A, heparinized whole blood was either left unstimulated (negative control), stimulated with *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB; positive control), or with the spike peptide mix for 4 hours at 37°C. After incubation, bulk lysis and surface and intracellular staining were performed per EuroFlow guidelines.<sup>68</sup> The panel composition is given in supplemental Table 1. Samples were measured on BD FACS Lyric or Miltenyi MACS Quant 10 flow cytometers, which were aligned in accordance with EuroFlow standards and subjected to biannual EuroFlow quality control ring trials.<sup>69,70</sup> Primary flow cytometry data were analyzed using Infinicyt (version 2.0.4b; Cytognos SL, Salamanca, Spain). Normalized proportions of SEB-activated and spike-specific T cells (expressed as percentages of the samples' total CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively) were obtained by subtracting the respective frequencies of the negative control in the same sample from the raw frequencies. Fourteen unvaccinated and self-reportedly noninfected control participants were used to calculate the limit of detection (LOD) as the mean + 2 standard deviations. Samples >LOD (0.00459% for CD4<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> T cells and 0.00287% for CD8<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> T cells) were considered positive. We report on triple cytokine-positive, polyfunctional CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells (for gating refer to supplemental Figure 1; examples shown in supplemental Figure 2). The absolute numbers of spike-specific and SEB-responsive T cells per μL blood were calculated back from the numbers of T cells measured using immune monitoring tube 1.

## Immune monitoring

The immune monitoring panel comprised 3 eight-color tubes (supplemental Table 1) stained in accordance with the EuroFlow guidelines<sup>68</sup> and acquired on a MACSQuant 10. In total, 121 distinct cell populations were identified using standardized gates and Infinicyt software (detailed in supplemental Figures 3-5). Numbers of cells per  $\mu\text{L}$  blood were derived from relative measurements of cell populations (of total leukocytes) via flow cytometry, and the total white blood count was determined with a Sysmex XP-300 cell counter (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany).

## SARS-CoV-2-specific IgG

SARS-CoV-2-specific immunoglobulin G (IgG) was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay, as previously described<sup>56</sup> (Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S assay, Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Switzerland). The test detects antibodies to the receptor binding domain of the spike protein. The assay is calibrated so that 1 U/mL directly equals 1 binding antibody unit per mL (standardized according to World Health Organization).<sup>56</sup> Titers  $\geq 0.8$  U/mL were considered positive.

## Statistics

Statistical analyses were performed using R (version 4.2.1).<sup>71</sup> Response levels below the LOD were set to the respective LOD if not stated otherwise. Kruskal-Wallis followed by Dunn tests were used to detect differences in central tendency. Welch one-way analysis of variance with subsequent Games-Howell tests were used to detect differences in means. If not stated otherwise, medians were reported for metric data. Count data were compared using Fisher exact test. Robust tree-based feature selection with Monte-Carlo methods was performed using the R package rmcfs (version 1.3.5) with standard cut-offs.<sup>72</sup> Subsequent

multiparametric logistic regression models were generated using the R package logistf (version 1.24.1) including all parameters selected by rmcfs in the full cohort or the 3 subcohorts.

## Results

### Clinical data

We studied 91 healthy control participants, 42 patients with lymphoid, and 88 patients with myeloid malignancies (Table 1; detailed in supplemental Table 2). The healthy control group was younger and comprised more women than the patient groups. Moreover, patients with myeloid neoplasms were significantly more often actively treated than patients with lymphoid neoplasms. We found no significant differences in terms of prior infections, vaccination type, or white blood count.

Details on disease status and detection of spike-specific IgG before vaccination are provided in the supplemental Results.

### SARS-CoV-2 specific CD8<sup>+</sup> T-cell, CD4<sup>+</sup> T-cell, and IgG responses in patient cohorts and healthy controls

We compared SARS-CoV-2 spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell, CD8<sup>+</sup> T-cell, and IgG responses between controls and both patient cohorts (Table 2) and additionally subdivided patients who were actively treated and those who were (at least currently) untreated (supplemental Table 3).

Compared with healthy controls, fewer patients with lymphoid malignancies demonstrated a seroconversion after vaccination (99% vs 78%;  $P < .001$ ). The reduced ability to generate SARS-CoV-2-specific IgG was similarly reflected by the antibody titers of responders: we measured median antibody titers of 222 U/mL in patients with lymphoid malignancies but sevenfold higher titers in

**Table 1. Demographic and clinical data for controls as well as patients with lymphoid and myeloid neoplasms**

Variable	Healthy controls, n = 91*	Lymphoid neoplasms, n = 42*	Myeloid neoplasms, n = 88*	P value†
Age (y)	52 (38; 62)	66 (48; 74)	62 (52; 67)	< .001
Sex				.033
Female	54 (59%)	17 (40%)	37 (42%)	
Male	37 (41%)	25 (60%)	51 (58%)	
WBC	6.10 (5.30; 7.75)	5.40 (4.10; 6.77)	6.00 (4.27; 8.38)	.2
SARS-CoV-2 vaccination scheme				.07
Vector based	13 (14%)	4 (9.5%)	11 (12%)	
2× mRNA-based	62 (68%)	37 (88%)	69 (78%)	
Only one‡	16 (18%)	1 (2.4%)	8 (9.1%)	
Prior SARS-CoV-2 infection				.7
Yes	3 (3.3%)	1 (2.4%)	5 (5.7%)	
No	88 (97%)	41 (98%)	83 (94%)	
Current cancer treatment				.04 (lymphoid vs myeloid)
Yes	0 (0%)	21 (50%)	60 (68%)	
No	91 (100%)	21 (50%)	28 (32%)	

WBC, white blood cell count.

\*Median (Q1 and Q3); n (%).

†Kruskal-Wallis rank sum test; Fisher exact test.

‡Summarizes in-label Ad26.COV2.S (Janssen) and off-label single-shot immunization using either mRNA vaccine.

**Table 2. Comprehensive comparative analysis of vaccination responses in patients and healthy controls**

Variable	N	Healthy control, n = 91	Lymphoid neoplasms, n = 42	P value healthy vs lymphoid neoplasms*	Myeloid neoplasms, n = 88	P value healthy vs myeloid neoplasms*
Spike-specific IgG detectable (n [%] of participants†)	219	90 (99%)	32 (78%)	<b>&lt; .001</b>	86 (99%)	1
Spike-specific IgG levels (U/mL)‡	208	1554 (433; 3079)	222 (92; 2115)	<b>.02</b>	942 (144; 2384)	.11
Spike-specific CD4 <sup>+</sup> T cells detectable (n [%] of participants†)	221	67 (74%)	30 (71%)	.8	47 (53%)	<b>.005</b>
Spike-specific CD4 <sup>+</sup> T cells (cells per μL blood)‡	144	0.166 (0.093; 0.251)	0.165 (0.061; 0.248)	.7	0.111 (0.075; 0.238)	.7
Spike-specific CD4 <sup>+</sup> T-cells (% of CD4 <sup>+</sup> T-cells)‡	144	0.012 (0.008; 0.02)	0.024 (0.007; 0.035)	.12	0.018 (0.010; 0.027)	.26
Activated CD4 <sup>+</sup> T cells by SEB detectable (n [%] of participants†)	221	81 (89%)	41 (97.6%)	.2	80 (91%)	.8
Activated CD4 <sup>+</sup> T cells by SEB (cells per μL blood)‡	202	9.9 (3.9; 17.3)	6.9 (4.3; 14.7)	.6	5.7 (2; 9.8)	<b>.009</b>
Activated CD4 <sup>+</sup> T cells by SEB (% of CD4 <sup>+</sup> )‡	202	0.82 (0.47; 1.25)	1.71 (0.77; 2.81)	<b>&lt; .001</b>	0.55 (0.34; 1.20)	.24
Spike-specific CD8 <sup>+</sup> T-cells detectable (n [%] of participants†)	221	38 (42%)	13 (31%)	.3	25 (28%)	.08
Spike-specific CD8 <sup>+</sup> T cells (cells per μL blood)‡	76	0.038 (0.022; 0.085)	0.035 (0.015; 0.057)	.5	0.050 (0.019; 0.168)	.5
Spike-specific CD8 <sup>+</sup> T cells (% of CD8 <sup>+</sup> )‡	76	0.008 (0.005; 0.017)	0.009 (0.004; 0.012)	.9	0.014 (0.005; 0.027)	.4
Activated CD8 <sup>+</sup> T cells by SEB detectable (n [%] of participants†)	221	82 (90.1%)	41 (97.6%)	.2	82 (93.2%)	.6
Activated CD8 <sup>+</sup> T cells by SEB (cells per μL blood)‡	205	4 (1.9; 7.4)	4.4 (2.7; 8.9)	.5	3 (0.9; 7.3)	.2
Activated CD8 <sup>+</sup> T cells by SEB (% of CD8 <sup>+</sup> )‡	205	0.86 (0.36; 1.50)	1.15 (0.59; 2.01)	.14	0.76 (0.26; 1.65)	.6

Significant (<0.05) P values are highlighted in bold.

\*P values calculated using Dunn post hoc test (continuous data) or Fisher exact test (categorical data).

†Numbers and percentages of participants who show a response in spike-specific IgG, CD4<sup>+</sup> T cells, and CD8<sup>+</sup> T cells as well as in SEB-activated CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells are tabulated by patient and control groups.

‡Spike-specific IgG levels are provided in U/mL, spike-specific and SEB-activated CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively, are provided as percentage of the respective T-cell subpopulations and as counts of polyfunctional T cells per μL blood (medians, Q1 and Q3). These data were calculated based upon all participants with detectable IgG, polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells, and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively.

healthy controls (1554 U/mL;  $P = .02$ ). The reduced seroconversion rate as well as reduced antibody titers affected predominantly those patients with lymphoid neoplasms under active treatment. Patients with myeloid malignancies showed the same high seroconversion rate as the control cohort and a nonsignificant trend toward lower IgG antibody titers.

SARS-CoV-2-specific polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells were detectable in a lower proportion of patients with myeloid neoplasms (53%) than in the control cohort (74%,  $P = .005$ ), whereas no significant difference could be observed between controls and patients with lymphoid malignancies. Responding controls and patients did not differ in the numbers of spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells: we detected at median 0.166, 0.165, and 0.111 polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells per μL. This pattern suggests that a particular subgroup of patients with myeloid neoplasms was unable to mount a polyfunctional spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response, whereas the remaining patients with myeloid neoplasms and the patients with lymphoid neoplasms showed CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the control level. Considering similar CD4<sup>+</sup> T-cell response rates in patients receiving treatment and those who were not (supplemental Table 3), active treatment apparently does not explain subgroups with different vaccination results in myeloid malignancies.

Fewer CD4<sup>+</sup> T cells were activated upon T-cell receptor (TCR)-mediated, antigen-unspecific stimulation in patients with myeloid neoplasms compared with healthy participants (5.7 vs 9.9 polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells per μL), whereas the percentages of responding CD4<sup>+</sup> T cells were comparable (0.55% vs 0.82%). In contrast, we observed an increased percentage of CD4<sup>+</sup> T cells activated by SEB in patients with lymphoid neoplasms as compared with healthy controls (1.71% vs 0.82%). This suggests that the CD4<sup>+</sup> T cells in patients with lymphoid neoplasms are easier to activate, and this effect might compensate for the lower numbers of CD4<sup>+</sup> T cells. The effect might be particularly relevant when patients are being actively treated (supplemental Table 3).

The proportion of participants with detectable SARS-CoV-2-specific polyfunctional CD8<sup>+</sup> T cells and the numbers of these cells did not differ between controls and both patient cohorts. Moreover, CD8<sup>+</sup> T cells from both patient groups could be as readily activated by SEB as those from control participants. Patients with lymphoid malignancies actively undergoing treatment might even possess an increased response to SEB (supplemental Table 3).

In summary, patients with lymphoid malignancies mounted an insufficient IgG response accompanied by a normal or even improved CD4<sup>+</sup> T-cell function against SARS-CoV-2. Patients with



myeloid neoplasia had normal spike-specific IgG levels, but a major subpopulation of these individuals presented with a defective CD4<sup>+</sup> T-cell response. Spike-specific CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses were preserved in both patient groups.

### In-depth immune phenotyping in patient cohorts and healthy controls

Having demonstrated differences in CD4<sup>+</sup> T-cell and IgG response rates toward vaccination between patients with myeloid malignancies and those with lymphoid malignancies, we searched for mechanistic explanations and, therefore, characterized the composition of the immune system in the cohorts.

In contrast to the largely unaffected myeloid lineage, we observed a significant lymphopenia in both patients with myeloid malignancies and those with lymphoid malignancies (Table 3; supplemental Figure 6). T cells, B cells, and natural killer (NK)-cells were all significantly reduced in both patient cohorts compared with in healthy controls, with greater numerical reductions observed for patients with lymphoid neoplasia.

We found a reduction in the number of CD4<sup>+</sup> T cells in both patient cohorts. Within the CD4<sup>+</sup> T-cell compartment, all maturation steps, except the effector memory CD4<sup>+</sup> T cells in lymphoid neoplasia were significantly reduced. Naive CD4<sup>+</sup> T cells were diminished the most: patients with lymphoid neoplasms exhibited only a quarter of the number of naive CD4<sup>+</sup> T cells compared with that in the healthy controls (100 vs 398 cells per  $\mu$ L). Similarly, the controls had twice as many naive CD4<sup>+</sup> T cells than patients with myeloid neoplasms (398 vs 194 cells per  $\mu$ L). A significant overall reduction of CD8<sup>+</sup> T cells

was demonstrated in patients with myeloid neoplasms, whereas patients with lymphoid neoplasms presented nearly normal CD8<sup>+</sup> T-cell numbers. Nevertheless, naive CD8<sup>+</sup> T cells were reduced in both patient cohorts when compared with the control population.

A systematic comparison of both patient cohorts with the normal control group and between each other (supplemental Figure 6) revealed that both patient cohorts presented similar reductions of many different T-cell subpopulations. In lymphoid, compared with myeloid malignancies, fewer T cells, naive regulatory T cells, and naive CD4<sup>+</sup> T cells were detected. Patients with lymphoid neoplasms presented not only fewer CD4<sup>+</sup> T cells expressing inhibitory molecules TIM3<sup>73</sup> and LAG3,<sup>74</sup> but also fewer CD4<sup>+</sup> T cells expressing the activating NKG2D molecule.<sup>75</sup>

A complete list of all 121 investigated parameters, including descriptive statistics, is provided in supplemental File 2.

Taken together, the immune system of patients with lymphoid or myeloid malignancies resembled each other with an overall lymphopenia and a pronounced reduction in naive CD4<sup>+</sup> T cells, which might reflect a contraction of the reservoir of CD4<sup>+</sup> T cells that are able to respond to vaccination. Both patient cohorts differed between each other in the numbers of naive CD4<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells as well as in the expression of inhibitory and activating receptors on CD4<sup>+</sup> T cells.

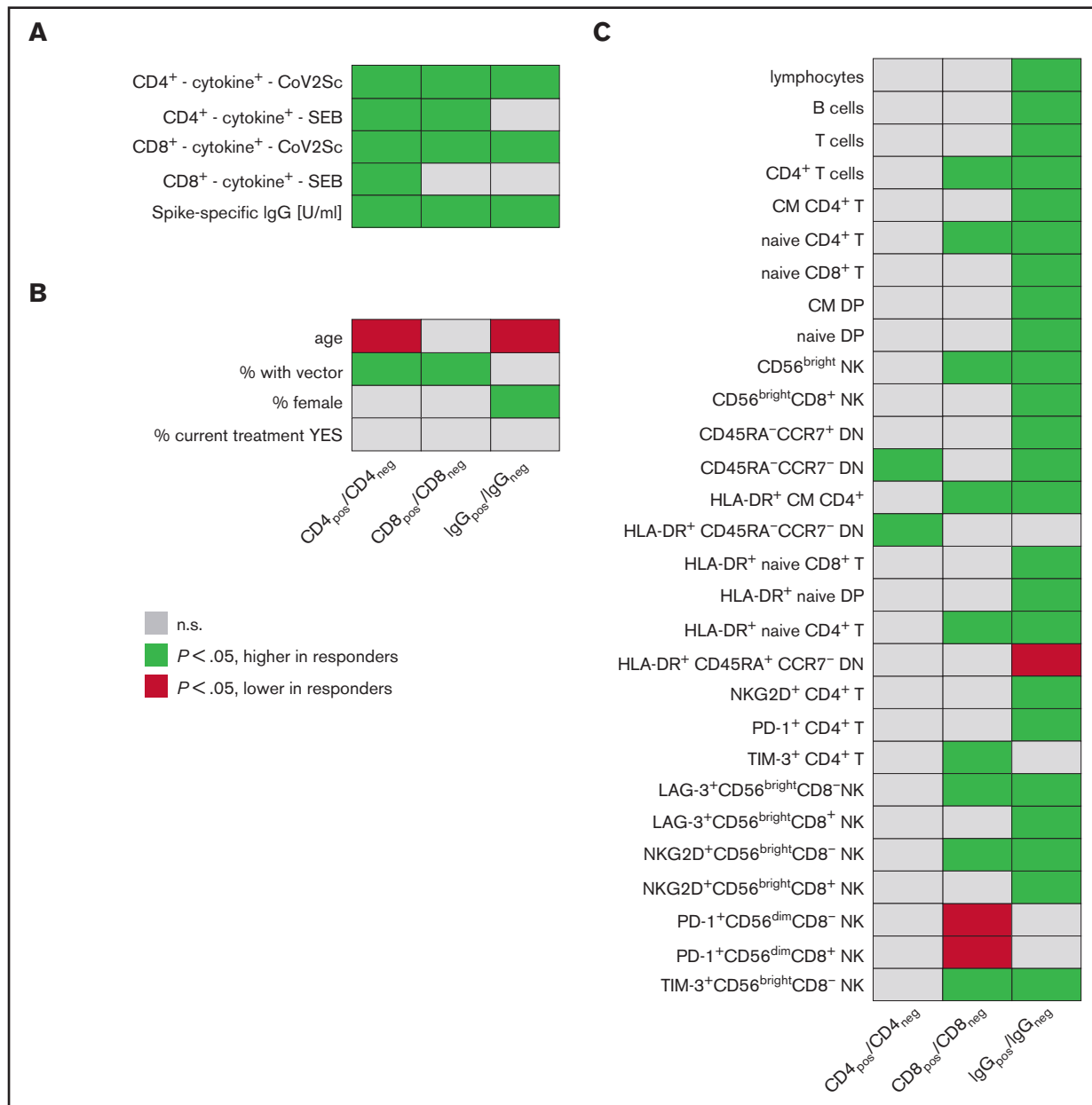
### Parameters associated with spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cells, CD8<sup>+</sup> T-cell, and IgG responses

We investigated whether immunophenotypic or demographic parameters or the type of vaccination were significantly associated

**Table 3. Differences in major leukocyte subsets per  $\mu$ L blood between patients with hematological neoplasia and healthy controls**

Population	Healthy control* (n = 87)	Lymphoid neoplasms* (n = 41)	P value healthy vs lymphoid neoplasms†	Myeloid neoplasms* (n = 86)	P value healthy vs myeloid neoplasms†
Myeloid cells	3424 (2737; 4775)	3461 (2680; 4286)	.7	4056 (2429; 6338)	.5
Neutrophils	2789 (2215; 3947)	2771 (2167; 3707)	.8	3190 (1868; 5324)	.6
Eosinophils	83 (46; 151)	72 (35; 102)	.2	68 (35; 165)	.4
Monocytes	412 (323; 612)	417 (343; 538)	1	404 (295; 633)	.9
Lymphocytes	2529 (2073; 3189)	1556 (1150; 2536)	<b>&lt; .001</b>	2031 (1462; 2864)	<b>.002</b>
B cells	304 (206; 462)	160 (47; 542)	<b>.03</b>	251 (122; 384)	<b>.03</b>
T cells	1937 (1513; 2390)	1220 (752; 1675)	<b>&lt; .001</b>	1520 (993; 2150)	<b>.002</b>
CD4 <sup>+</sup> T cells	939 (643; 1293)	421 (258; 694)	<b>&lt; .001</b>	577 (355; 928)	<b>&lt; .001</b>
Naive CD4 <sup>+</sup> T cells	398 (232; 641)	100 (36; 194)	<b>&lt; .001</b>	194 (88; 389)	<b>&lt; .001</b>
CM CD4 <sup>+</sup> T cells	330 (218; 491)	184 (115; 306)	<b>.001</b>	224 (141; 346)	<b>.001</b>
EM CD4 <sup>+</sup> T cells	89 (58; 144)	77 (40; 116)	.06	55 (34; 88)	<b>.002</b>
TE CD4 <sup>+</sup> T cells	7 (3; 20)	2 (2; 10)	<b>.02</b>	3 (2; 11)	<b>.009</b>
CD8 <sup>+</sup> T cells	444 (277; 581)	380 (258; 532)	.4	284 (178; 443)	<b>.001</b>
Naive CD8 <sup>+</sup> T cells	106 (49; 164)	35 (18; 111)	<b>.002</b>	53 (23; 103)	<b>.002</b>
CM CD8 <sup>+</sup> T cells	43 (23; 68)	31 (17; 59)	.2	28 (15; 55)	<b>.01</b>
EM CD8 <sup>+</sup> T cells	89 (47; 173)	95 (61; 150)	.7	57 (33; 118)	<b>.02</b>
TE CD8 <sup>+</sup> T cells	132 (50; 203)	116 (72; 212)	.6	100 (33; 168)	.1
NK cells	293 (182; 425)	209 (103; 292)	<b>.003</b>	231 (122; 355)	<b>.04</b>

CM, central memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>); EM, effector memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>); TE, terminal effector cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>).  
 Significant (<0.05) P values are highlighted in bold.  
 \*Median (Q1 and Q3); n (%); T-cell maturation parameters (CCR7, CD45RA) could not be assessed in 1 healthy control, 3 patients with lymphoid, and 1 patient with myeloid neoplasia because of technical reasons.  
 †P values calculated using Dunn post hoc test.



**Figure 1. Parameters associated with vaccination responses.** Univariate analyses of (A) vaccination response parameters, (B) clinicodemographic features, and (C) immune signatures in study participants based on CD4<sup>+</sup> T-cell, CD8<sup>+</sup> T-cell, and IgG responses. (left) Groups of study participants with detectable spike-specific CD4<sup>+</sup> response (n = 144) compared with those without detectable CD4<sup>+</sup> response (n = 77). Analogously, (middle) comparison of participants with spike-specific CD8<sup>+</sup> response (n = 76) with CD8<sup>+</sup> nonresponders (n = 145); (right) participants with specific IgG levels above median (n = 109) vs participants with lower spike-specific IgG (n = 110). Each line represents a vaccination response parameter, clinicodemographic feature, or specific population from in-depth immunophenotyping (expressed as cells per  $\mu$ L). Green cells denote higher age, higher IgG titers, higher percentages of women, and of recipients of heterologous vaccination schemes, as well as higher cell numbers per  $\mu$ L blood for all other features in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and IgG responders. Red cells indicate lower respective values in responders. Shown are all parameters with at least 1 of the 3  $P$  values  $< .05$  and for comparison, also the percentage of patients under active treatment. A total of 121 immunophenotypic parameters were analyzed. CD4<sub>pos/neg</sub>, with/without detectable spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response; CD8<sub>pos/neg</sub>, with/without detectable spike-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response; CM, central memory; CoV2Sc, after stimulation with spike peptides; cytokine<sup>+</sup>, polyfunctional activated T cells; DN, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T cells; DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive T cells; EM, effector memory; IgG<sub>pos/neg</sub>, with/without spike-specific IgG levels above median; TE, terminal effector.

with detectable polyfunctional spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells or with above-median spike-specific IgG titers (Figure 1; detailed in supplemental File 2).

Participants with detectable spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sub>pos</sub>) were more frequently vaccinated with at least 1 dose of vector-based AZD1222 vaccine when compared with nonresponders

**Table 4. Demographic, clinical, and vaccination response data for participants grouped based on the vaccination scheme**

Variable	Vector based, n = 28*	Only 1+, n = 25*	2x mRNA-based, n = 168*	P value‡
Age (y)	53 (45; 60)	55 (48; 61)	60 (47; 69)	<b>.05</b>
Sex				.2
Female	13 (46%)	8 (32%)	87 (52%)	
Male	15 (54%)	17 (68%)	81 (48%)	
WBC	5.5 (4.5; 6.1)	5.7 (4.7; 7.1)	6.3 (4.8; 8.2)	.1
Study cohort				.07
Healthy control	13 (46%)	16 (64%)	62 (37%)	
Lymphoid neoplasms	4 (14%)	1 (4%)	37 (22%)	
Myeloid neoplasms	11 (39%)	8 (32%)	69 (41%)	
Prior SARS-CoV-2 infection				<b>&lt; .001</b>
Yes	0 (0%)	7 (28%)	2 (1.2%)	
No	28 (100%)	18 (72%)	166 (98.8%)	
Current cancer treatment				.4
Yes	11 (39%)	6 (24%)	64 (38%)	
No	17 (61%)	19 (76%)	104 (62%)	
Spike-specific IgG detectable (n [%] of participants)	26 (93%)	23 (96%)	159 (95%)	.9
Spike-specific CD4 <sup>+</sup> T cells detectable (n [%] of participants)	27 (96%)	15 (60%)	102 (61%)	<b>.001</b>
Spike-specific CD8 <sup>+</sup> T cells detectable (n [%] of participants)	20 (71%)	8 (32%)	48 (29%)	<b>&lt; .001</b>

Vaccination success is expressed as percentage of study participants with detectable spike-specific IgG, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> responses, respectively. WBC, white blood cell count. Significant (<0.05) P values are highlighted in bold.

\*Median (Q1 and Q3); n (%).

†Summarizes in-label Ad26.COV2.S (Janssen) and off-label single-shot immunization using either mRNA vaccine.

‡Kruskal-Wallis rank sum test; Fisher exact test.

(27 of 144 vs 1 of 77;  $P < .001$ ). CD4<sub>pos</sub> individuals at median had higher spike-specific IgG titers (1500 vs 176 U/mL;  $P < .001$ ) and more spike-specific CD8<sup>+</sup> T cells (0.019 vs 0.016 cells per  $\mu\text{L}$ ;  $P = .007$ ). These CD4<sup>+</sup> T-cell responders also showed a stronger activation upon antigen-unspecific, TCR-dependent stimulation using SEB (CD4<sup>+</sup> T cells: 8.0 vs 4.0 cells per  $\mu\text{L}$  and CD8<sup>+</sup> T cells: 4.3 vs 1.9 cells per  $\mu\text{L}$ ). CD4<sub>pos</sub> participants were younger than nonresponders (55 vs 62 years; all  $P < .001$ ) and had significantly more frequent CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T cells<sup>76</sup> lacking both CD45RA and CCR7 and an increased frequency of HLA-DR<sup>+</sup> among those cells.

A vector-based vaccine was more frequently used in participants with detectable spike-specific CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sub>pos</sub>, 20 of 76) compared with nonresponders (8 of 145;  $P < .001$ ). CD8<sub>pos</sub> participants had higher IgG titers (1621 vs 623 U/mL;  $P < .001$ ). As expected from the data mentioned above, we detected more spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells in CD8<sub>pos</sub> individuals (median: 0.16 vs 0.07 cells per  $\mu\text{L}$ ;  $P < .001$ ). SEB stimulation induced a stronger CD4<sup>+</sup> T-cell response in CD8<sub>pos</sub> individuals (median 8.3 vs 5.5 cells per  $\mu\text{L}$ ,  $P = .006$ ), whereas the CD8<sup>+</sup> T-cell response to SEB was comparable (medians 3.2 vs 4.3 cells per  $\mu\text{L}$ ;  $P = .1$ ). Furthermore,

we found a significantly higher number of CD4<sup>+</sup> T cells and naive CD4<sup>+</sup> T cells (median, 357 vs 208 cells per  $\mu\text{L}$ ;  $P = .006$ ) in CD8<sub>pos</sub> individuals. Moreover, the numbers of PD-1<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and CD56<sup>dim</sup>CD8<sup>+</sup> NK cells were significantly lower in the CD8<sub>pos</sub> group, whereas the number of CD56<sup>bright</sup> NK cells was elevated (supplemental File 2).

Given the remarkable benefit for the vector-based AZD1222 to induce spike-specific T-cell vaccination responses, we specifically compared study participants by vaccination scheme (Table 4). Vaccinees who received schemes that included vector-based AZD1222 were marginally younger than the remaining participants but exhibited no other clinical or demographic features suggestive of a higher likelihood for a successful immunization. When analyzed based on the participant cohort, AZD1222 induced a detectable, specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in 100% (13 of 13) of healthy controls, 100% (4 of 4) of patients with lymphoid neoplasms, and 90% (10 of 11) of patients with myeloid neoplasms, whereas fully mRNA-based vaccination schemes resulted in measurable CD4<sup>+</sup> T-cell responses in 73% (45 of 62;  $P = .03$ ), 68% (25 of 37;  $P = .3$ ), and 46% (32 of 69;  $P = .008$ ), of the participant cohorts, respectively. Similarly, vector-based prime-boost vaccination also more frequently induced spike-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in controls (vector, 11 of 13 [85%] vs mRNA, 21 of 62 [34%];  $P = .001$ ), lymphoid malignancies (vector 2 of 4 [50%] vs mRNA, 11 of 37 [30%];  $P = .6$ ), and myeloid malignancies (vector, 7 of 11 [64%] vs mRNA, 16 of 69 [23%];  $P = .01$ ). However, quantitatively, spike-specific T cells per  $\mu\text{L}$  blood in responders did not differ significantly between mRNA-based vaccination schemes and AZD1222 immunization.

Finally, we compared participants with IgG<sup>+</sup> and without spike-specific IgG titers above the overall median titer 120 days after vaccination. Individuals who were IgG<sup>+</sup> were younger (median: 54 vs 63.5 years;  $P < .001$ ) and more often female (65 of 109 vs 42 of 110;  $P = .002$ ). Spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells were roughly twice as frequent in IgG<sup>+</sup> compared with IgG<sup>-</sup> patients and controls (medians: 0.13 vs 0.07 cells per  $\mu\text{L}$  blood;  $P < .001$ ). A stronger IgG response was associated with higher B-cell counts (median: 318 vs 196 cells per  $\mu\text{L}$ ). Total lymphocyte and T-cell numbers followed this pattern, as did the numbers of various T-cell and NK-cell subpopulations (supplemental File 2). Of note, the numbers of naive CD4<sup>+</sup> T cells were also increased in individuals who were IgG<sup>+</sup> compared with those who were IgG<sup>-</sup> (median 334 vs 186 cells per  $\mu\text{L}$ ;  $P < .001$ ).

In general, strong vaccination responses of CD8<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, and IgG cooccur when all participants are analyzed together and when the quantitative strength of the responses (ie, titers and cell counts) are considered. Furthermore, a responsive immune system can be characterized by sufficient numbers of naive T cells<sup>77</sup> and the responsiveness of T cells after a TCR-mediated, antigen-independent stimulation. Importantly, spike-specific T-cell responses were detected in a higher fraction of study participants when vector-based vaccinations were used.

### Multivariable response models

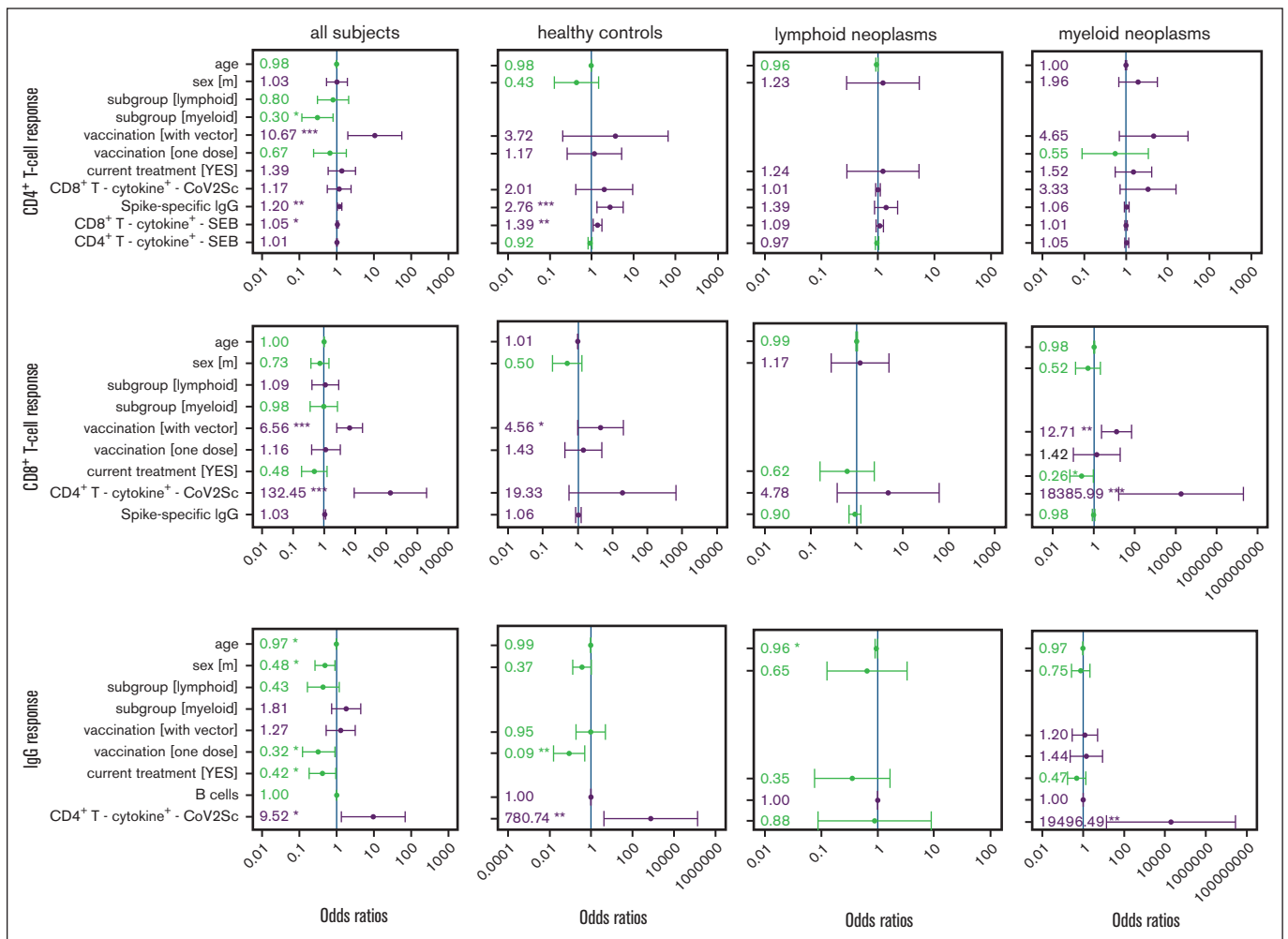
Lastly, we identified parameters that were independently associated with SARS-CoV-2-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell and IgG vaccination responses using multivariable logistic regression models. We included parameters identified as important using a

Monte Carlo-based feature selection approach (supplemental Figure 7) along with parameters significantly associated with the response in univariable analyses: age, sex, and the vaccination type. Owing to published evidence on the significance of the current treatment status,<sup>33,78</sup> the initial models were also fitted to include this parameter.

The generic model identified vaccination with at least 1 vector-based vaccine dose (odds ratio [OR], 10.7), the CD8<sup>+</sup> antigen-unspecific T-cell responsiveness (OR, 1.05), and spike-specific IgG titers (OR, 1.2) as significantly associated with a spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response (Figure 2). Patients with myeloid neoplasms were significantly less likely to mount a detectable CD4<sup>+</sup> T-cell response (OR, 0.3). Exclusively for healthy controls, the model retained a positive association with IgG titers (OR, 2.76) and with unspecific CD8<sup>+</sup> T-cell responsiveness (OR, 1.39). With lower participant numbers, the models for each subgroup separately did not identify any other parameter as being significantly

associated with CD4<sup>+</sup> T-cell response. However, the chance of developing a spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response was numerically higher when at least 1 vector-based vaccine dose was given to control participants (OR, 3.72) and patients with myeloid neoplasms (OR, 4.65).

Similarly, the CD8<sup>+</sup> T-cell response was also significantly associated with a vaccination scheme that included at least 1 vector-based dose as compared with 2 doses of a mRNA-based vaccine (OR, 6.56). Furthermore, the numbers of spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells were associated with a CD8<sup>+</sup> T-cell response. The subgroup-specific models underlined the statistically significant beneficial effect of using at least 1 vector-based vaccine for the control group (OR, 4.56) and patients with myeloid neoplasms (OR, 12.71). In contrast to our observations for the CD4<sup>+</sup> T-cell response, for patients with myeloid neoplasms, ongoing therapy, when being vaccinated, lowered the chance of developing a measurable CD8<sup>+</sup> T-cell response.



**Figure 2. Multivariable regression of factors associated with response to vaccination against SARS-CoV-2 in patients with hematological neoplasms and in controls.** Parameters rated important by the feature selection algorithm (supplemental Figure 7) in 1 of the 4 groups were included in every model. ORs and the 95% confidence intervals are indicated. Reference groups for the categorical parameters were belonging to the healthy control group, female sex, 2 mRNA-based vaccine doses, and no current treatment. The CD4<sup>+</sup> T-cell, CD8<sup>+</sup> T-cell, and IgG vaccination response models were calculated for the total study population as well as for the 3 study cohorts, separately. Parameters in green show an OR < 1 and parameters in violet an OR > 1. The size of vaccination groups "only 1" (n = 1) and "with vector" (n = 4) precluded an analysis of vaccination scheme in lymphoid neoplasia models. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001.

The serological response was negatively affected by older age, being male, currently receiving therapy, and by having received only a single immunization. In contrast, having measurable spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells was positively associated with an IgG response. Of note, the numbers of B cells were not associated with an IgG response in the multivariable models.

In summary, the multivariable models confirmed a strong interdependence of spike-specific CD8<sup>+</sup> T-cell, CD4<sup>+</sup> T-cell, and IgG responses to vaccination across the study cohorts of patients and controls. Of particular interest was the observation of a higher likelihood of mounting spike-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell responses upon vector-based vaccination. None of the immunophenotypic parameters showed an association to the cellular or humoral vaccination immunity independent of the respective other spike-specific immune response outcomes and the vaccination scheme.

## Discussion

In order to elucidate immunological mechanisms for vaccination success and failure, we, herein, provide a comprehensive characterization of the specific CD8<sup>+</sup> T-cell, CD4<sup>+</sup> T-cell, and serological immunity induced by SARS-CoV-2 vaccination in 130 patients with hematological malignancies and 91 healthy controls. To the best of our knowledge, our study is the first to measure polyfunctional spike-specific T-cell responses using a dedicated assay in a large cohort of patients with lymphoid or myeloid neoplasms.

The flow cytometry assay used in this study allows the separate analysis of spike-specific CD8<sup>+</sup> T-cell and CD4<sup>+</sup> T-cell responses, unlike, for example, the enzyme-linked immunospot assay used by others.<sup>44,58,79</sup> Taking advantage of this technical feature, we could demonstrate (Table 2) that the reduced T-cell response in myeloid malignancies affects CD4<sup>+</sup> T cells only, whereas the CD8<sup>+</sup> T-cell response can be detected with the same frequency and strength as those in controls and patients with lymphoid malignancies. The reduction in CD4<sup>+</sup> T-cell responsiveness appears to be restricted to a distinct subgroup of patients with myeloid malignancies, because the counts of SARS-CoV-2-specific CD4<sup>+</sup> T cells in responders equal the counts in healthy controls. T-cell responses without seroconversion were detectable in a sizable fraction of patients with lymphoid malignancies.<sup>56</sup> That dissociation of humoral and cellular vaccination immunity in hematological malignancies has very recently also been described by other groups.<sup>44,58,79,80</sup>

To explain the differences in responses between myeloid and lymphoid neoplasia, we hypothesized that certain myeloid neoplasms and their treatment might specifically impair the CD4<sup>+</sup> T-cell compartment, whereas the treatment of lymphoid malignancies might interfere with a B cell-mediated vaccination response. We sought to elucidate mechanistic links between vaccination success and disease categories using in-depth immunophenotyping of 121 distinct cell populations. However, these investigations mainly revealed similarities between both patient groups: lymphopenia affecting T, B, and NK cells as well as a profound reduction of the naive compartment in CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells. We identified only a few, relatively small CD4<sup>+</sup> T-cell populations that were increased in myeloid neoplasm in comparison with lymphoid neoplasms. Thus, immunophenotyping did not offer a clear explanation for the impaired CD4<sup>+</sup> T-cell immunity co-occurring with preserved

CD8<sup>+</sup> T-cell responses in a fraction of patients with myeloid malignancies.

In order to identify immunophenotypic predictors for the observed different immune responses by study cohort, we developed multivariable models for the prediction of detectable spike-specific CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells as well as above-median IgG levels. Our analyses revealed that the CD8<sup>+</sup> T-cell response strongly depended on the CD4<sup>+</sup> T-cell response reaching statistical significance in multivariable models of the total study population and patients with myeloid malignancies and was also evident for healthy controls and patients with lymphoid malignancies. This observation suggests that a strong CD8<sup>+</sup> T-cell response is supported by an extensive spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell activation (Figure 2). Moreover, the CD8<sup>+</sup> T-cell but not the CD4<sup>+</sup> T-cell response is negatively affected by the current treatment. In line with our observation, a negative impact of the current treatment on T-cell responses in general had been demonstrated before.<sup>32,79,80</sup> In our study, we could refine this observation as being only significant for the CD8<sup>+</sup> T-cell response.

Reduced titers of anti-SARS-CoV-2 spike-protein IgG as well as neutralizing antibodies in patients with hematological neoplasms has previously been described to be likely mediated by B-cell depletion or suppression.<sup>31,81</sup> This is in line with our multivariable model showing a strong significant effect of current treatment on the serological response. In our cohort, the numbers of B cells showed no independent association with the serological response. We speculate that in our models the same effect might be captured by the parameter current treatment, which would lead to a severe B-cell depletion in many lymphoid malignancies. The multivariable approach also identified a strong spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response as a beneficial parameter for a strong serological immunization response for both individuals with myeloid neoplasia and healthy controls. That interaction was completely lost in lymphoid malignancies.

Our data endorsed a model with a central role of spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell support for both CD8<sup>+</sup> T-cell and IgG immunization responses. Patients without an operational B-cell compartment, such as those with treated lymphoid malignancies, cannot mount an IgG response even in the presence of a strong CD4<sup>+</sup> T-cell activation. They therefore have to rely upon CD8<sup>+</sup> T cells for protection from severe COVID-19.<sup>25</sup>

For both the CD4<sup>+</sup> T-cell and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, we found a significant beneficial effect of vector-based vaccination schemes. The healthy controls, but more importantly the group of patients with myeloid malignancy, appeared to benefit from such a schedule in terms of response rates (with low patient numbers receiving vector-based vaccines, the relationship could not be established for lymphoid neoplasia). Very recently, it had been shown that in healthy vaccinees, a heterologous prime-boost immunization resulted in higher T-cell reactivities as compared with homologous vaccination using mRNA vaccines only.<sup>60,61,63,64</sup> To our knowledge, no such studies had been performed with focus on individuals who are immune compromised. If confirmed in additional studies, our results suggest revisiting heterologous vaccination schemes for those vulnerable patient groups.

Published data on T-cell responses to SARS-CoV-2 vaccination in patients with hematological neoplasms are sparse and sometimes

conflicting.<sup>32,44,45,57,58,66,79,80,82-86</sup> The majority of studies used enzyme-linked immunospot assays to assess T-cell responses and thus were not able to distinguish between CD4<sup>+</sup> T-cell and CD8<sup>+</sup> T-cell responses or measure polyfunctional responses. In contrast, we had established an intracellular cytokine staining assay using minimal sample manipulation to calculate the exact numbers of spike-specific CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells. We were able to detect spike protein-specific polyfunctional CD4<sup>+</sup> T-cell responses in 74% of all healthy participants and spike protein-specific polyfunctional CD8<sup>+</sup> T-cell responses in 42% of all healthy donors. The frequencies of spike-specific polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells ranged from 0.00459% (our LOD) to 0.5% among all CD4<sup>+</sup> T cells and from 0.00287% to 0.6% among all CD8<sup>+</sup> T cells, and thus match respective values published, for example by Cohen et al.<sup>65</sup> Seminal work by Sahin et al.<sup>87</sup> reported CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in 95% and 76%, respectively, of all participants, 7 days after secondary immunization with tozinameran, with frequencies ranging from 0.02% to 0.1% and from 0.01% to 1.44% for interferon- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively. These studies indicate that CD8<sup>+</sup> T-cell responses are less frequently detectable than CD4<sup>+</sup> T-cell responses. Our results are within these published ranges.<sup>7</sup>

Beside the technically advanced assay used to quantify T-cell responses, another strength of our study is the large control cohort that was treated and investigated exactly like the patient cohorts. As a major drawback, we acknowledge that our patient cohorts are heterogeneous in terms of diseases and treatments. This heterogeneity and the resulting low number of study participants with particular clinicodemographic and disease features most probably explain the lack of statistical significance of certain associations in our multivariable analyses. Thus, our cohort is a cross-sectional representation of the patient's spectrum that allows the generation of hypotheses for patient groups but not disease or treatment-specific analyses.

Although there are convincing data to link spike-specific IgG responses in vaccinees with protection from disease, such correlations between spike-specific CD4<sup>+</sup> T-cell and CD8<sup>+</sup> T-cell counts as a quantitative correlate of protection against symptomatic or severe COVID-19 remain to be established.<sup>16,25</sup> In an attempt to clarify this in the future, we are currently assessing long-term clinical outcomes in our study participants.

In conclusion, our study untangles the links and differences between the 3 arms of the adaptive immune system in a large, healthy control group compared with those in patients with malignancies of the lymphoid and myeloid lineage. These clear

differences in responses reported herein call for tailored vaccination plans that might be additionally refined using the monitoring of polyfunctional T cells. Moreover, we provide preliminary evidence that the use of vector-based vaccines increases T-cell responses, which might be important to protect patients who are immune compromised from severe COVID-19.<sup>3,16,25</sup>

## Acknowledgments

The authors thank Patrick Brennan for English proof reading.

This work received a grant from the East German Study Group for Hematology and Oncology (OSHO e.V.; project number: OSHO#98).

The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## Authorship

Contribution: S.B., H.K.A.-A., and R.E. designed the research; S.B. and R.E. analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript; and all authors performed research and carefully revised and approved the final version of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: H.K.A.-A. consults for Novartis, Bristol Myers Squibb, Takeda, Pfizer, and AbbVie; receives honoraria from Novartis, Bristol Myers Squibb, Takeda, Pfizer, and AbbVie; and receives research funding from Novartis, Bristol Myers Squibb, and Incyte. S.B. consults for Roche; reports honoraria from Roche, AbbVie, Novartis, AstraZeneca, Amgen, and Janssen; and receives research funding from Janssen, Miltenyi Biotec, Roche, Genentech, and AbbVie. C.J. receives honoraria from Novartis, Amgen, Janssen, and AbbVie and received research funding from Janssen, Miltenyi Biotec, Roche, and Centogene. The remaining authors declare no conflicting financial interests.

ORCID profiles: R.E., [0000-0002-1048-3638](https://orcid.org/0000-0002-1048-3638); N.J., [0001-6162-515X](https://orcid.org/0001-6162-515X); B.L.-K., [0000-0003-2660-4921](https://orcid.org/0000-0003-2660-4921); F.B.K., [0000-0003-4354-9952](https://orcid.org/0000-0003-4354-9952); S.S., [0000-0002-3856-7956](https://orcid.org/0000-0002-3856-7956); C.J., [0000-0003-4707-777X](https://orcid.org/0000-0003-4707-777X); S.B., [0000-0002-3603-761X](https://orcid.org/0000-0002-3603-761X).

Correspondence: Sebastian Böttcher, Clinic III (Hematology, Oncology and Palliative Medicine), Special Hematology Laboratory, Rostock University Medical Center, Ernst-Heydemann-Strasse 6, 18057 Rostock, Germany; email: [sebastian.boettcher@med.uni-rostock.de](mailto:sebastian.boettcher@med.uni-rostock.de).

## References

1. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity*. 2020;52(4):583-589.
2. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med Overseas Ed*. 2021;384(5):403-416.
3. Barouch DH. Covid-19 vaccines – immunity, variants, boosters. *N Engl J Med*. 2022;387(11):1011-1020.
4. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;385(13):1172-1183.
5. Lazarus R, Taucher C, Brown C, et al. Safety and immunogenicity of the inactivated whole-virus adjuvanted COVID-19 vaccine VLA2001: a randomized, dose escalation, double-blind phase 1/2 clinical trial in healthy adults. *J Infect*. 2022;85(3):306-317.
6. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603-2615.

7. Swanson PA, Padilla M, Hoyland W, et al. AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific Th1 response with a diverse TCR repertoire. *Sci Transl Med.* 2021;13(620):eabj7211.
8. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet.* 2021;397(10269):99-111.
9. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell.* 2022;185(5):847-859.e11.
10. Willett BJ, Grove J, MacLean OA, et al. SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat Microbiol.* 2022;7(8):1161-1179.
11. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell.* 2020;183(4):996-1012.e19.
12. Collier DA, Ferreira IATM, Kotagiri P, et al. Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature.* 2021;596(7872):417-422.
13. Sahin U, Muik A, Vogler I, et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature.* 2021;595(7868):572-577.
14. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med.* 2020;383(25):2439-2450.
15. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1544-1555.
16. Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev.* 2022;310(1):6-26.
17. Hassan AO, Case JB, Winkler ES, et al. A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell.* 2020;182(3):744-753.e4.
18. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature.* 2022;603(7901):488-492.
19. McMahan K, Yu J, Mercado NB, et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature.* 2021;590(7847):630-634.
20. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):186-193.
21. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861-880.
22. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature.* 2022;601(7891):110-117.
23. Tan AT, Linster M, Tan CW, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.* 2021;34(6):108728.
24. Zhao J, Zhao J, Mangalam AK, et al. Airway memory CD4+ T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses. *Immunity.* 2016;44(6):1379-1391.
25. Bange EM, Han NA, Wileyto P, et al. CD8 + T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med.* 2021;27(7):1280-1289.
26. Jergović M, Coplen CP, Uhrlaub JL, et al. Cutting edge: T cell responses to B.1.1.529 (Omicron) SARS-CoV-2 variant induced by COVID-19 infection and/or mRNA vaccination are largely preserved. *J Immunol.* 2022;208(11):2461-2465.
27. Liu J, Chandrashekar A, Sellers D, et al. Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature.* 2022;603(7901):493-496.
28. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res.* 2014;59(1-3):118-128.
29. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol.* 2014;88(19):11034-11044.
30. Corti C, Antonarelli G, Scotté F, et al. Seroconversion rate after vaccination against COVID-19 in patients with cancer—a systematic review. *Ann Oncol.* 2022;33(2):158-168.
31. Ghione P, Gu JJ, Attwood K, et al. Impaired humoral responses to COVID-19 vaccination in patients with lymphoma receiving B-cell-directed therapies. *Blood.* 2021;138(9):811-814.
32. Malard F, Gaugler B, Gozlan J, et al. Weak immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine in patients with hematologic malignancies. *Blood Cancer J.* 2021;11(8):142.
33. Pimpinelli F, Marchesi F, Piaggio G, et al. Fifth-week immunogenicity and safety of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in patients with multiple myeloma and myeloproliferative malignancies on active treatment: preliminary data from a single institution. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):81.
34. Fendler A, de Vries EGE, GeurtsvanKessel CH, et al. COVID-19 vaccines in patients with cancer: immunogenicity, efficacy and safety. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(6):385-401.
35. Abdul-Jawad S, Baù L, Alaguthurai T, et al. Acute immune signatures and their legacies in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infected cancer patients. *Cancer Cell.* 2021;39(2):257-275.e6.
36. Beaton B, Sasson SC, Rankin K, et al. Patients with treated indolent lymphomas immunized with BNT162b2 have reduced anti-spike neutralizing IgG to SARS-CoV-2 variants, but preserved antigen-specific T cell responses. *Am J Hematol.* 2023;98(1):131-139.

37. García-Suárez J, de la Cruz J, Cedillo Á, et al. Impact of hematologic malignancy and type of cancer therapy on COVID-19 severity and mortality: lessons from a large population-based registry study. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):133.
38. Ikeda D, Terao T, Miura D, et al. Impaired antibody response following the second dose of the BNT162b2 vaccine in patients with myeloproliferative neoplasms receiving ruxolitinib. *Front Med.* 2022;9:826537.
39. Kuderer NM, Choueiri TK, Shah DP, et al. Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): a cohort study. *Lancet.* 2020;395(10241):1907-1918.
40. Lee LY, Cazier J-B, Angelis V, et al. COVID-19 mortality in patients with cancer on chemotherapy or other anticancer treatments: a prospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10241):1919-1926.
41. Bird S, Panopoulou A, Shea RL, et al. Response to first vaccination against SARS-CoV-2 in patients with multiple myeloma. *Lancet Haematol.* 2021; 8(6):e389-e392.
42. Collier ARY, Yu J, McMahan K, et al. Coronavirus disease 2019 messenger RNA vaccine immunogenicity in immunosuppressed individuals. *J Infect Dis.* 2022;225(7):1124-1128.
43. Diefenbach C, Caro J, Koide A, et al. Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 vaccination in non-Hodgkin lymphoma and CLL patients. *medRxiv.* 2021;2021.06.02.21257804.
44. Fendler A, Shepherd STC, Au L, et al. Immune responses following third COVID-19 vaccination are reduced in patients with hematological malignancies compared to patients with solid cancer. *Cancer Cell.* 2022;40(4):438.
45. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell.* 2021;39(8):1031-1033.
46. Haggenburg S, Lissenberg-Witte BI, van Binnendijk RS, et al. Quantitative analysis of mRNA-1273 COVID-19 vaccination response in immunocompromised adult hematology patients. *Blood Adv.* 2022;6(5):1537-1546.
47. Harrington P, de Lavallade H, Doores KJ, et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2 induces high frequency of neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2021;35(12):3573-3577.
48. Harrington P, Doores KJ, Radia D, et al. Single dose of BNT162b2 mRNA vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) induces neutralising antibody and polyfunctional T-cell responses in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2021; 194(6):999-1006.
49. Lim SH, Campbell N, Johnson M, et al. Antibody responses after SARS-CoV-2 vaccination in patients with lymphoma. *Lancet Haematol.* 2021;8(8): e542-e544.
50. Monin L, Laing AG, Muñoz-Ruiz M, et al. Safety and immunogenicity of one versus two doses of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with cancer: interim analysis of a prospective observational study. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):765-778.
51. Van Oekelen O, Gleason CR, Agte S, et al. Highly variable SARS-CoV-2 spike antibody responses to two doses of COVID-19 RNA vaccination in patients with multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2021;39(8):1028-1030.
52. Okamoto A, Fujigaki H, Iriyama C, et al. CD19-positive lymphocyte count is critical for acquisition of anti-SARS-CoV-2 IgG after vaccination in B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2022;6(11):3230-3233.
53. Piñana JL, López-Corral L, Martino R, et al. SARS-CoV-2 vaccine response and rate of breakthrough infection in patients with hematological disorders. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):54-11.
54. Re D, Seitz-Polski B, Brglez V, et al. Humoral and cellular responses after a third dose of SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in patients with lymphoid malignancies. *Nat Commun.* 2022;13(1):864.
55. Thümmler L, Koldehoff M, Fisenkci N, et al. Cellular and humoral immunity after the third vaccination against SARS-CoV-2 in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *Vaccines.* 2022;10(6):972.
56. Jotschke S, Schulze S, Jaekel N, et al. Longitudinal humoral and cellular immune responses following SARS-CoV-2 vaccination in patients with myeloid and lymphoid neoplasms compared to a reference cohort: results of a prospective trial of the East German Study Group for Hematology and Oncology (OSHO). *Cancers (Basel).* 2022;14(6):1544.
57. Fendler A, Shepherd STC, Au L, et al. Adaptive immunity and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern following vaccination in patients with cancer: the CAPTURE study. *Nat Cancer.* 2021;2(12):1305-1320.
58. Liebers N, Speer C, Benning L, et al. Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20-treated lymphoma patients. *Blood.* 2022;139(1):142-147.
59. Atmar RL, Lyke KE, Deming ME, et al. Homologous and heterologous Covid-19 booster vaccinations. *N Engl J Med.* 2022;386(11):1046-1057.
60. Barros-Martins J, Hammerschmidt SI, Cossmann A, et al. Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Nat Med.* 2021;27(9):1525-1529.
61. Chiu N-C, Chi H, Tu Y-K, et al. To mix or not to mix? A rapid systematic review of heterologous prime–boost Covid-19 vaccination. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(10):1211-1220.
62. Gray G, Collie S, Goga A, et al. Effectiveness of Ad26.COV2.S and BNT162b2 vaccines against Omicron variant in South Africa. *N Engl J Med.* 2022; 386(23):2243-2245.
63. Hillus D, Schwarz T, Tober-Lau P, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of homologous and heterologous prime-boost immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med.* 2021;9(11):1255-1265.



64. Pozzetto B, Legros V, Djebali S, et al. Immunogenicity and efficacy of heterologous ChAdOx1–BNT162b2 vaccination. *Nature*. 2021;600(7890):701-706.
65. Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med*. 2021;2(7):100354.
66. Harrington P, Doores KJ, Saha C, et al. Repeated vaccination against SARS-CoV-2 elicits robust polyfunctional T cell response in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Cancer Cell*. 2021;39(12):1654-1449.
67. Pizzolla A, Nguyen THO, Sant S, et al. Influenza-specific lung-resident memory T cells are proliferative and polyfunctional and maintain diverse TCR profiles. *J Clin Invest*. 2018;128(2):721-733.
68. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
69. Kalina T. Reproducibility of flow cytometry through standardization: opportunities and challenges. *Cytometry*. 2020;97(2):137-147.
70. Kalina T, Flores-Montero J, Lecomte Q, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. *Cytometry A*. 2015;87(2):145-156.
71. *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Core Team; 2022. <https://www.R-project.org/>
72. Dрамиński M, Koronacki J. rmcfs: an R package for Monte Carlo feature selection and interdependency discovery. *J Stat Softw*. 2018;85(12):1-28.
73. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(3):173-185.
74. Ruffo E, Wu RC, Bruno TC, Workman CJ, Vignali DAA. Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): the next immune checkpoint receptor. *Semin Immunol*. 2019;42:101305.
75. Babic M, Dimitropoulos C, Hammer Q, et al. NK cell receptor NKG2D enforces proinflammatory features and pathogenicity of Th1 and Th17 cells. *J Exp Med*. 2020;217(8):e20190133.
76. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al. CD3+CD4–CD8– (double-negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer. *Front Immunol*. 2022;13:816005.
77. Croke SN, Ovsyannikova IG, Poland GA, Kennedy RB. Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immun Ageing*. 2019;16(1):25.
78. Herishanu Y, Avivi I, Aharon A, et al. Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021;137(23):3165-3173.
79. Mairhofer M, Kausche L, Kaltenbrunner S, et al. Humoral and cellular immune responses in SARS-CoV-2 mRNA-vaccinated patients with cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(9):1171-1172.
80. Aleman A, Upadhyaya B, Tuballes K, et al. Variable cellular responses to SARS-CoV-2 in fully vaccinated patients with multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2021;39(11):1442-1444.
81. Narita K, Nakaji S, Tabata R, et al. Antibody response to COVID-19 vaccination in patients with lymphoma. *Int J Hematol*. 2022;115(5):728-736.
82. Ehmsen S, Asmussen A, Jeppesen SS, et al. Antibody and T cell immune responses following mRNA COVID-19 vaccination in patients with cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(8):1034-1036.
83. Marasco V, Carniti C, Guidetti A, et al. T-cell immune response after mRNA SARS-CoV-2 vaccines is frequently detected also in the absence of seroconversion in patients with lymphoid malignancies. *Br J Haematol*. 2022;196(3):548-558.
84. McKenzie DR, Muñoz-Ruiz M, Monin L, et al. Humoral and cellular immunity to delayed second dose of SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination in patients with cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(11):1445-1447.
85. Mellinshoff SC, Robrecht S, Mayer L, et al. SARS-CoV-2 specific cellular response following COVID-19 vaccination in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2022;36(2):562-565.
86. Ram R, Hagin D, Kikozashvili N, et al. Safety and immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in patients after allogeneic HCT or CD19-based CART therapy—a single-center prospective cohort study. *Transplant Cell Ther*. 2021;27(9):788-794.
87. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020;586(7830):594-599.

## Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung mit Unterschrift

### **Erklärungen**

- (1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
  
- (2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.
  
- (3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

*Datum, Unterschrift*

## Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr.med. Al-Ali, die mir die Möglichkeit gab, Teil dieses großen Projektes zu sein und von deren langjähriger Erfahrung und Wissensschatz ich viel lernen durfte.

Großer Dank geht außerdem an Dr.med. Susann Schulze, die mir als Ansprechpartnerin bei jeder Frage helfend zur Seite stand und tatkräftig bei der Datensammlung unterstützte.

Für die Organisation der Termine, Verwaltung der Blutproben und Hilfe bei der Datensammlung danke ich Christina Zahn aus dem Studiensekretariat der KIM IV des Universitätsklinikums Halle. Vielen Dank auch an Dr.med. Nadja Jäkel aus der KIM IV, die mir bei Fragen ebenfalls helfend zur Seite stand und die das Projekt ebenfalls tatkräftig unterstützte.

Dank geht auch an Nicole Nedlitz, die nicht nur im Rahmen ihrer Tätigkeit als Studienkoordinatorin im Krukenberg Krebszentrum das Projekt unterstützte, sondern auch beim Transport der Blutproben regelmäßig mit einsprang und bei Problemen stets ein offenes Ohr hatte.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Prof. Dr. med. Patrick Michl.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Freundin Lea Eiltzer, ohne die ich mich nicht für diese Promotionsarbeit beworben hätte.

Für die emotionale Unterstützung danke ich außerdem meiner Familie und meinem Partner, der mir viel Verständnis entgegenbrachte.

Zu guter Letzt danke ich natürlich jedem einzelnen, der das Projekt unterstützt und möglich gemacht hat und bisher noch nicht explizit erwähnt wurde – Dank geht an alle Patient\*innen und Proband\*innen, an alle beteiligten Praxen, die wir als Zentren gewinnen konnten, an das Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle und an die Kollegen aus der Universitätsmedizin Rostock für die durchgeführten Bestimmungen der zellulären Immunantwort, sowie an die OSHO und Deutsche Leukämie- und Lymphomstiftung für die finanzielle Unterstützung des Projektes.