

**Aus dem medizinischen Zentrum für Operative Medizin I
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. P. Griss
Klinik für Neurochirurgie
Leiter: Prof. Dr. Helmut Bertalanffy**

**Aktive adjuvante Immuntherapie
maligner intrakranieller astrozytärer Tumoren
mittels Gangliosidkonjugatvakzin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Michael Karl Eichler
aus Fulda

Marburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 07.03.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. med. Helmut Bertalanffy

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans-Martin Sommer

gewidmet meinen Eltern

*Aktive adjuvante Immuntherapie
maligner intrakranieller astrozytärer Tumoren
mittels Gangliosidkonjugatvakzin*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1-1
1 Einleitung	1-5
1.1 Epidemiologie und Therapie maligner Gliome	1-5
1.1.1 Definition	1-5
1.1.2 Prognose	1-5
1.1.3 Erörterung der etablierten Therapieoptionen	1-6
1.2 Problemstellung und Lösungsansatz	1-7
1.3 Über die Ganglioside	1-8
1.3.1 Funktionen	1-10
1.4 Immunologische Privilegien des ZNS	1-10
1.5 Immunologische Abwehrstrategien maligner Gliome	1-12
1.6 Historische Grundlage	1-13
1.7 Immunologische Überwachung neoplastischer Prozesse	1-14
1.7.1 Immunantwort auf prinzipiell autologe Moleküle	1-15
1.7.2 die humorale Antwort	1-15
1.7.2.1 Komplement	1-15
1.7.2.2 Antikörper	1-16
1.7.3 Die zellvermittelte Immunantwort	1-18
1.7.3.1 T-Helferzellen	1-18
1.7.3.2 CD8+ Zytotoxische/ Suppressor- T- Zellen	1-20
1.7.3.3 NK- (Natürliche Killer-) Zellen	1-20
1.8 Vorarbeiten auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung zur Behandlung neuroektodermaler Neoplasien. Ganglioside als Antigene	1-22
1.8.1 Immunisierungen mit Ganzzellpräparationen	1-22
1.8.2 Purifizierte Gangliosidvakzine	1-22
1.8.3 Immunisierung mit strukturell ähnlichen Substanzen	1-23
1.8.4 Konjugatimpfstoffe	1-23
1.9 Verwendetes Vakzin	1-24
1.9.1 Zusammensetzung des Konjugatvakzins	1-24

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1-2
1.9.2 Gangliosid _____	1-24
1.9.3 Carrier-Protein _____	1-25
1.9.3.1 Funktion _____	1-25
1.9.4 Adjuvans _____	1-25
1.9.4.1 Funktion _____	1-25
1.10 Potentielle Komplikationen der Vakzinierungstherapie _____	1-26
1.11 Fragestellung und Zielsetzung _____	1-26
2 <i>Material</i> _____	2-28
2.1 Patienten _____	2-28
2.1.1 Patientenauswahl _____	2-28
2.1.1.1 Einschlußkriterien _____	2-28
2.1.1.2 Ausschlußkriterien _____	2-28
2.1.1.3 Diagnostik des Ausgangszustandes _____	2-28
2.1.1.4 Übersicht über das Patientenkollektiv _____	2-29
3 <i>Methoden</i> _____	3-31
3.1 Herstellung des Vakzins: siehe Anlage _____	3-31
3.2 Studienplan _____	3-31
3.3 Untersuchungsparameter _____	3-32
3.3.1 Beurteilungskriterien _____	3-32
3.3.2 Blutuntersuchung _____	3-33
3.3.3 Liquoruntersuchung _____	3-33
3.3.4 Urinuntersuchung _____	3-33
3.3.5 Feststellung des neurologischen Status und Bestimmung des Barthel-Indexes _____	3-34
3.4 Statistische Methoden _____	3-34
4 <i>Kasuistiken, klinische Verläufe</i> _____	4-35
4.1 Patientin A: _____	4-35
4.1.1 Kasuistik _____	4-35
4.1.2 Klinischer Verlauf _____	4-36
4.2 Patient B _____	4-38
4.2.1 Kasuistik _____	4-38

4.2.2	Klinischer Verlauf	4-38
4.3	Patient C	4-40
4.3.1	Kasuistik	4-40
4.3.2	Klinischer Verlauf	4-41
4.4	Patient D	4-44
4.4.1	Kasuistik	4-44
4.4.2	Klinischer Verlauf	4-45
4.5	Patientin E	4-47
4.5.1	Kasuistik	4-47
4.5.2	Klinischer Verlauf	4-48
4.6	Patient F	4-50
4.6.1	Kasuistik	4-50
4.6.2	Klinischer Verlauf	4-52
4.7	Patientin G	4-53
4.7.1	Kasuistik	4-53
4.7.2	Klinischer Verlauf	4-54
5	Ergebnisse	5-55
5.1	Unerwünschte Medikamentenwirkungen	5-55
5.2	Die Immunologische Antwort auf das Vakzin	5-55
5.3	Überlebenszeiten / Tumorkontrolle	5-56
5.4	Stabilität der postoperativen Phase	5-58
5.4.1	Latenz Initialvakzinierung - Rezidiv	5-59
5.4.2	Stabilität des Barthel-Indexes	5-60
5.5	Ergebnisse der Lymphozytensubsetuntersuchungen	5-61
5.5.1	T-Zellen	5-61
5.5.2	Natürliche Killerzellen	5-62
5.5.3	Relative Verteilung der Abwehrzellen	5-63
5.5.3.1	Patientin A	5-63
5.5.3.2	Patient B	5-64
5.5.3.3	Patient C	5-65
5.5.3.4	Patient D	5-66

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1–4
5.5.3.5 Patientin E _____	5–67
5.5.3.6 Patient F _____	5–68
5.5.4 Zusammenhänge zwischen T-Zellzahlen und Überlebenszeit	5–69
6 Diskussion _____	6–72
6.1 Verträglichkeit der Therapie _____	6–72
6.2 Auswahl des Antigens _____	6–73
6.3 Antigangliosid-Antikörperproduktion und ihr Einfluß auf den Krankheitsverlauf _____	6–73
6.4 Zelluläre Immunität _____	6–75
6.4.1 T-Zellstatus _____	6–75
6.4.2 Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	6–76
6.5 Klinischer Verlauf _____	6–77
6.5.1 Überlebenszeit _____	6–77
6.5.2 Lebensqualität _____	6–78
6.6 Abschließende Bewertung und Ausblick _____	6–80
7 Zusammenfassung _____	7–82
8 Literaturverzeichnis _____	8–84
9 Anlagen _____	9–94
9.1 Herstellung des Vakzins _____	9–94
9.1.1 Ozonolyse _____	9–94
9.1.2 Konjugation an KLH _____	9–94
9.1.3 Konfektion des Impfstoffes _____	9–94
9.2 WHO-Kriterien zur Bemessung akuter und subakuter Toxizität	9–96
9.3 Der Barthel – Index _____	9–97
10 Abbildungsverzeichnis _____	10–98
11 Anhang _____	11–99
11.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer _____	11–99
11.2 Danksagung _____	11–100

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Therapie maligner Gliome

Die jährliche Inzidenz primärer intrakranieller Tumoren stieg in den Vereinigten Staaten in der Dekade bis 1985 um das Fünffache (35). In Großbritannien lag sie 1988 bei 12,8 / 100.000 Einwohnern (96), Tendenz steigend.

Hirntumoren sind die dritthäufigste Todesursache bei jungen Erwachsenen (10).

1.1.1 Definition

Mehr als die Hälfte aller neuroepithelialen Neoplasien rekrutieren sich aus Zellen des hirneigenen Hüll- und Bindegewebsapparates, der Neuroglia und deren Vorläuferzellen (117). Sie werden als Gliome bezeichnet und durch den Namenszusatz ihrer Progenitorzellen näher klassifiziert. So unterscheidet man:

- Astrozytome, die sich von Astrozyten ableiten von
- Ependymomen, Tumoren von Zellen des Ventrikependyms und
- Oligodendrogliomen, den tumorösen Neoplasien der Oligodendrozyten.

Astrozytome stellen mit ca. 75% den größten Anteil an primären Tumoren des Zentralen Nervensystems (16).

1.1.2 Prognose

Die Erhebung des Karnofsky-Indexes erlaubt eine ungefähre prognostische Einschätzung der Überlebenszeiten. Sie variieren ohne Therapie bei einem Indexwert größer/ gleich 60 zwischen 22 und 32 Wochen (2,44).

Unter voller Ausschöpfung und in Kombination der derzeit verfügbaren Behandlungsmöglichkeit gibt man die mediane Überlebenszeit eines Patienten mit malignem Gliom mit 9 Monaten bis 1 Jahr an (5,12,11).

Im Anschluß an eine Rezidivoperation verlängert sich die Zeitspanne bis zum Tod des Erkrankten um etwa 14 Wochen (2,44).

1.1 Epidemiologie und Therapie maligner Gliome

Weniger als 10% der betroffenen Patienten (Diagnose eines Glioms vom histologischen Grad III und IV) überleben einen Zeitraum von 2 Jahren. Nicht einmal 5% der Erkrankten erreichen Überlebenszeiten von mehr als 5 Jahren (69,121).

1.1.3 Erörterung der etablierten Therapieoptionen

Die Standardtherapie des malignen Glioms erstreckt sich auf Kraniotomie mit maximal möglicher Tumorsektion gefolgt von postoperativer Strahlentherapie und / oder Chemotherapie (65,66). Der Erfolg einer solchen etablierten therapeutischen Strategie erfährt durch die im folgenden orientierend dargestellten Problematiken strenge Limitierung:

Das diffus oft weit in gesundes Gewebe ausstrahlende Wachstumsverhalten der Tumoren bestimmt weitestgehend die Aussichten einer suffizienten chirurgischen Therapie.

Hinsichtlich des strahlentherapeutischen Ansatzes erschwert eine in etwa 10% der neoplastischen Zellen nachweisbare Hypoxie die Behandlung; sie verleiht den tumorösen Zellen eine Strahlenresistenz. Versuche, diese Widrigkeit zu überwinden, sind bislang weitgehend gescheitert (30,28).

Neue Ansätze auf dem Gebiet der Radiotherapie, insbesondere im Zusammenhang mit Boron Neutron Capture Verfahren (BNCV), befinden sich allerdings bereits in der Erprobung (6,90,122). Prinzip dieser BNCV ist die Anreicherung von Bor oder Gadolinium im Inneren maligne transformierter Zellen und deren Exposition gegenüber einer bestimmten, von einem Nuklearreaktor generierten, Neutronenstrahlung. Die auf diese Weise erzeugte Alpha- sowie Gammastrahlung als auch entstehende Radikale sollen idealerweise den Tod neoplastischer Zellen einleiten.

Die Existenz der Blut- Hirn- Schranke problematisiert den Übertritt chemotherapeutischer Agentien und mag zusammen mit der Expression eines sogenannten multi- drug- resistance- Glykoproteins in Zellen maligner Gliome (25,120) die Ursache für bislang größtenteils enttäuschende Ergebnisse chemotherapeutischer Interventionen darstellen.

Rezidive, zumeist am Rande des ursprünglichen Tumorbettes (47), stellen daher eine regelmäßige Komplikation in der Therapie maligner Gliome dar.

1.2 Problemstellung und Lösungsansatz

Die etablierten therapeutischen Optionen für die Behandlung primärer maligner intrakranieller Tumoren müssen, da sie im wesentlichen kaum etwas zur Veränderung des Schicksals erkrankter Patienten beizutragen vermögen, im Ergebnis als unzufriedenstellend bezeichnet werden.

Die immer noch fatale Prognose der Erkrankung sowie die steigende Inzidenz primärer Hirntumoren, speziell in der stetig wachsenden Patientengruppe des höheren Lebensalters (12), veranlassen zur Suche nach neuen und / oder anderen Therapiekonzepten.

Die in Kapitel 1.1.3 gelisteten Widrigkeiten im therapeutischen Umgang mit malignen intrakraniellen Gliomen und im folgenden dargestellte Untersuchungsergebnisse bezüglich ihrer Immunologie lassen eine Immuntherapie als geeignete adjuvante Behandlungsstrategie erscheinen.

Hintergrund und auslösendes Moment für die Initiierung der Studie ist die Beobachtung, daß tumorspezifische Glykosphingolipid- Epitope (Ganglioside) der äußeren Zellmembran eine wichtige Rolle in der humoralen Immunüberwachung zu spielen scheinen.

Ein erhöhter Antikörpertiter gegen diese antigenen Strukturen scheint, wie Studien gangliosidgestützter Immuntherapien bei Melanompatienten dokumentieren, mit einer verlängerten Überlebenszeit in Verbindung zu stehen (75,77,79). Eine intensivierete Immunantwort gegen tumorassoziierte GSL- Epitope maligner Gliome sollte daher mit einer erhöhten Lebenserwartung einhergehen.

Gliompatienten demonstrieren erhöhte Gangliosidkonzentrationen im Serum und Liquor cerebrospinalis (80). Untersuchungen von Lo et al. konnten zeigen, dass Gangliosidkonzentrationen im Serum von Patienten mit cerebralen Astrozytomen diejenigen gesunder Patienten um das Doppelte überstiegen (80). Träger anderer

intrakranieller Tumoren wiesen lediglich marginal erhöhte Gangliosidkonzentrationen auf, und an extrakraniellen Tumoren erkrankte Patienten zeigten keine Elevation. Diese Voraussetzungen qualifizieren Gliome als Ziel immuntherapeutischer Bemühungen mittels Gangliosidvakzinierung.

Untersuchungen unter Verwendung monoklonaler Antikörper berichten über deren Potenz, lymphozyten- oder komplementabhängig Gliomzellen zu lysieren (91,126).

Insbesondere Experimente am malignen Melanom (75,77,46,62,135,79) bestätigten die Ganglioside als geeignete Kohlenhydrat- und somit Antigenträger für weitergehende Untersuchungen in Form von aktiven und passiven Immunisierungen. Parallelen zur Behandlung des malignen Melanoms werden im weiteren mehrfach angeführt, da Melanom und Gliom gleichermaßen ontogenetische Abkömmlinge von Zellen des Neuroektoderms darstellen. Beide Tumoren teilen, wie im übrigen auch Neuroblastome und das kleinzellige Lungenkarzinom, eine ähnliche Gangliosid- und damit Antigenverteilung in ihren plasmamembranösen Entitäten.

1.3 Über die Ganglioside

Ganglioside, 1935 von Klenk erstmals beschrieben (52), gehören zur Gruppe der Glykosphingolipide (GSL) und stellen ca. 5- 10 % der gesamten Lipidmasse einer tierischen Zellhülle.

Sie bestehen aus einem komplexen Oligosaccharidanteil (Glyko-), einer sphingoiden Base (-sphingo-) und zwei parallelen Fettsäureketten (-lipide). Das Sphingosin bildet mit den Fettsäureresten den sogenannten Ceramidanteil der Moleküle.

Man unterscheidet zwei Klassen: „saure Glykosphingolipide“, an deren Kohlenhydratanteil eine oder mehrere saure Gruppen (Sialylsäure) gekoppelt sind und „neutrale GSL“, ohne Säurereste am Zucker.

Die Nomenklatur der Ganglioside läßt sich von ihrer chemischen Struktur ableiten. So steht die Abkürzung G für Gangliosid, die Indices tri, tet oder lac bezeichnen die Art des Oligosaccharids (tri = Gangliotriose, tet = Gangliotetraose, lac = Lactose) und die angehängte Ziffer erklärt die Anzahl der Sialylsäuregruppen.

Dementsprechend bezeichnet z.B. die Formel Gtri 1 ein Gangliosid, das durch den Zucker Gangliotriose und eine Sialylsäuregruppe charakterisiert ist.

Die Polarität der Moleküle ist der Natur ihrer funktionellen Gruppen entsprechend amphipatisch. Sie gliedert sich in einen hydrophoben, bzw. lipophilen Anteil, das Ceramid, mit dem sie in der Lipiddoppelschicht verankert sind und einen lipophoben Anteil, repräsentiert durch den Zucker und die Säuregruppe(n).

Dieses lipophobe Epitop ragt vom äußeren Blatt der Plasmamembran dem Extrazellulärraum entgegen und beteiligt sich an der Organisation der Hülle, eine für immuntherapeutische Überlegungen essentielle Eigenschaft. Sie macht die Glykosphingolipide für das Immunsystem angreifbar.

Ganglioside sind in der Oberfläche aller tierischen Zellen anzutreffen. Differenzen existieren in der Verteilung innerhalb verschiedener Zell- und Gewebetypen. So findet man die höchsten Konzentrationen in neuronalen Strukturen, besonders in der grauen Hirnsubstanz (104).

Als physiologischer Bestandteil der Zellmembran sind sie im Rahmen ihrer Biosynthese auch in den intrazellulären Organen des Golgiapparates, dem Endoplasmatischen Reticulum und in Lysosomen apparent. Ihre biologische Halbwertszeit wird mit 34- 38 Tagen angegeben (136).

Im Jahre 1965 (119) erkannte man erstmals Unterschiede in der GSL- Zusammensetzung normaler und maligne entarteter Zellen. Weitergehende Studien, speziell am Beispiel intrakranieller Tumoren, differenzierten unterschiedliche Gangliosidmuster, die eng mit dem histologischen Entdifferenzierungs- also Malignitätsgrad korrelierten (38).

Die charakteristischen Veränderungen in Gangliosidzusammensetzung und -metabolismus entarteter Zellen präsentieren sich zwar nur in wenigen Fällen in Form eines Auftretens neuer, dh. untypischer (neo-) GSL an der Oberfläche. Sie äußert sich vielmehr in Form einer Verschiebung zugunsten einfacher strukturierter Moleküle (55). Ihr neutrales Kohlenhydratgerüst ist kürzer.

Während das Gangliosidmuster normalen Hirngewebes sich aus Konstituenten höherer struktureller Komplexität zusammensetzt, vertreten durch Sialologlykolipide der Gtet- Gruppe (Gtet1, Gtet2a, Gtet2b und Gtet3b), zeigen die Zellen mit

zunehmender Entdifferenzierung erhöhte Konzentrationen simpler Ganglioside aus der Gtri- und Glac- Reihe.

Eine solche Umverteilung entspricht also strukturell einer Regression auf dem Wege der zellulären Reifung.

1.3.1 Funktionen

Glykosphingolipide erfüllen ein weites Spektrum unterschiedlichster physiologischer Funktionen. Sie üben Einfluß auf Ionenkanäle und Signaltransduktionssysteme aus, treten mit Zellerkennungs- und Adhäsionsmolekülen in Verbindung und beeinflussen Wachstumsfaktorrezeptoren (87,42).

So sind sie beispielsweise in der Lage, die Neuritogenese zu organisieren und die funktionelle Integrität geschädigter zentraler und peripherer Neurone wiederherzustellen (41,40). Ganglioside spielen eine Rolle bei der zellulären Differenzierung (27), in Entitäten der Angiogenese (1) sowie als Rezeptoren bakterieller Toxine (33).

Der für die vorliegende Studie wichtigste und in diesem Fall entscheidende Punkt ist allerdings die Tatsache, daß Ganglioside auch als antigene Strukturen auf Gliomen erkannt werden können, was bereits tierexperimentell dokumentiert wurde (41,112).

Eine im folgenden näher besprochene Problematik erschwert allerdings die Nutzbarkeit dieser Eigenschaft: Das Hirn stellt einen zumindest zum Teil immunologisch (unter-) privilegierten Ort dar.

1.4 Immunologische Privilegien des ZNS

Grundlage zur Vermutung, das Hirn stelle einen Ort mit immunologischen Privilegien dar, bildeten Beobachtungen, daß in Hirngewebe transplantierte Neoplasien in Form von Allo- und Xenotransplantaten besser und länger wachsen konnten als subkutan oder intramuskulär transplantierte.

Die zusätzliche intrakranielle Transplantation autologen Milzgewebes, d.h. immunologisch potenter Zellen, führte jedoch zu beschleunigten Abstoßungsreaktionen (89).

Medawar et al. konsolidierten die Theorie der abgeschwächten Immunantwort im Hirn und modifizierten so den Begriff der absoluten immunologischen Privilegierung in den der relativen. Sie konnten zeigen, daß im Falle einer initialen Immunisierung in Form einer orthotopen Transplantation eines homologen Hauttumors derselbe als Transplantat im Hirn eine verzögerte Abstoßungsreaktion provozierte. Hierbei zeigten sich lymphozytäre Infiltrate im cerebral applizierten Tumorgewebe (85).

Die Verzögerung der Abstoßung ordneten Ridley und Cavanagh der schlechten Vaskularisierung des Tumortransplantates zu (106).

Scheinberg et al. bewiesen, daß die immunologische Sensibilisierung auch von intracerebral ausgehen kann. Gewissermaßen in Umkehrung der Versuche von Medawar, implantierten sie initial einen homologen Hauttumor in Hirngewebe und erkannten eine schnellere Abstoßung des später orthotop implantierten gleichen Tumors. Diese Beschleunigung der Immunantwort war der Ausdruck einer sekundären Immunantwort.

Es mußten sich also im Rahmen der primären Sensibilisierung Gedächtniszellen gebildet haben, die nun die Intensität der zweiten Immunreaktion verstärkten (116).

Wiederum Scheinberg et al. entwickelten einen unspezifischen Impfstoff aus Tumorzellen und Adjuvans und immunisierten Mäuse. Derselbe Tumor wurde daraufhin intracerebral implantiert. Sowohl Tumor als auch umgebendes Hirngewebe erfuhren eine massive lymphozytäre Infiltration, die Neoplasie sogar eine Degeneration (115). Die Ergebnisse dieser Studie untermauerten die Erkenntnis, daß intracerebrale Tumoren sich der immunologischen Kontrolle nicht entziehen können; vor allem nicht nach einer initialen Sensibilisierung.

Die immunologische Sonderstellung des Hirns ist also bereits problematisiert worden. Die Ursachen dieser Position sind vielfältig. Sicherlich spielt die anatomische Struktur eine Rolle. Beispielhaft sei das Fehlen einer effektiven Lymphdrainage erwähnt.

Das Hirn besitzt keine Lymphknoten oder -abflußwege, was z.B. eine erfolgreiche Antigenpräsentation stark erschwert. Der Blutweg ist der einzig beschreibbare

für immunologische Interventionen des Tumorwirtes. Er ist der Alternative der Antigenpräsentation im Lymphknoten allerdings unterlegen (134).

Nun ist zudem die Vaskularisierung des Hirngewebes nicht dieselbe wie die der Peripherie. Die hier ausgebildete Blut- Hirn- Schranke (BHS) stellt eine massive Erschwernis für eine möglich Antigenpenetration dar. Auf diese Weise behindern die perivaskulären Zellen der BHS auch den Zugang immunologisch kompetenter Abwehrzellen, chemotaktischer Proteine und humoraler Effektormoleküle (32).

Hier kommen der immunologischen Abwehr die vaskulären Veränderungen in gliomatösen Tumoren entgegen. In Gliomen ist die Integrität der Blut- Hirn- Schranke gestört, so daß die Passage von Flüssigkeiten und größeren Molekülen durch die endothelialen Strukturen deutlich erleichtert wird (22,128,24).

Darüberhinaus sorgt der durch die Neoplasie verursachte Druck auf das umgebende Hirnparenchym für ultrastrukturelle neurovaskuläre Veränderungen entsprechend einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Bekannter makroskopischer Ausdruck dieses Phänomens ist das den Tumor umgebende sogenannte perifokale Hirnödem.

1.5 Immunologische Abwehrstrategien maligner Gliome

Die primäre Problematik der immunologischen Erreichbarkeit maligner cerebraler Transformationen besteht in der oben erwähnten anatomischen Ausnahmestellung des Hirns. Blut- Hirn- Schranke und fehlende Lymphabflußwege spielen hier die Hauptrolle.

Darüberhinaus verfügen Gliome über aktive sowie passive Abwehrstrategien, um der immunologischen Kontrolle zu entgehen (89,34).

An erster Stelle steht die Tatsache, daß gliomatöse Tumoren nur wenig immunogen sind (63). Die meisten ihrer Antigene, wie beispielsweise die Ganglioside, sind Autoantigene und unterliegen somit der immunologischen Toleranz. Das bedeutet, sie provozieren in der Regel selbst keine Immunantwort.

Mit zunehmender maligner Transformation ändert sich die Gangliosidverteilung. An dieser Stelle beginnt der immunmodulatorische Einfluß der Ganglioside. Die Tumoren beginnen, Ganglioside in ihre Umgebung wie auch ins Blut auszuschütten, ein Vorgang, den man als Shedding bezeichnet. Ihre Konzentration im Serum

und Liquor cerebrospinalis sind in Gliompatienten erhöht (137,100,143,41,14,105,36,37,39,40,144). Die Tumorzelle erreicht hierdurch beispielsweise eine gesteigerte Resistenzfähigkeit gegenüber Angriffen von NK- Zellen (142,59).

Die exprimierten Ganglioside binden Interleukin2 sowie dessen Rezeptoren und supprimieren so die immunologische Funktion dieses Zytokins. Die Differenzierung Natürlicher Killerzellen in lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) wird unterdrückt (97,111,83) bzw. ihre gesamte immunologische Integrität verändert (3). Scheinbar sind Ganglioside auch in der Lage, die Expression des T-lymphozytären Oberflächenantigens CD4+ zu verhindern (94).

Desweiteren sezernieren Gliome Zytokine wie den immunsuppressiven Faktor TGF- β , dessen Funktion nicht nur in der Absenkung der Freßzellaktivitäten besteht (118,60). Auch scheint er an der Tumorprogression beteiligt zu sein und eine Apoptose im T- Zellkompartiment triggern zu können (132,17).

1.6 Historische Grundlage

Seit der Entdeckung, beziehungsweise dem Beginn der wissenschaftlich fundierten Anwendung von Impfstoffen in der Therapie von Infektionskrankheiten, besteht Hoffnung auf die Entwicklung und erfolgreiche Anwendung immunologischer Therapien für die Behandlung maligner neoplastischer Prozesse.

So versuchte der amerikanische Chirurg William B. Coley bereits im ausklingenden 19. Jahrhundert, an Neoplasien erkrankte Patienten durch die Stimulation ihrer eigenen Immunabwehr zu heilen. Sein Ansatz einer Immuntherapie gründete auf der Vorstellung das Immunsystem des Erkrankten müsse im Sinne einer Initialzündung in Form einer bakteriellen Entzündung erst richtig in Gang gebracht werden, um die neoplastischen Zellen gleichsam im selben Atemzug zu eliminieren. Er infizierte die Patienten mit lebenden Krankheitserregern und hoffte, die Immunreaktion werde auch das entartete Gewebe lysieren. Mit Hilfe dieser Technik war Coley in der Lage, einige vollständige Remissionen zu erzielen (95).

Man nennt diese Art der Therapie unspezifische Immuntherapie, da das gesamte Immunsystem aktiviert wird. Auch heute noch findet sie in modifizierter Form Anwendung in der Krebstherapie (beispielsweise bei der therapeutischen Applikation von Bacillus Calmette-Guérin in der Behandlung des Harnblasenkarzinoms (57)).

Mit fortschreitendem Kenntnis- und Entwicklungsstand auf dem Gebiet der Immunologie gelangten die Therapiestrategien zu höherer Spezifität, mit dem Ziel, das Immunsystem gezielter und effektiver hinsichtlich Erkennung und Entfernung entarteter Zellen sensibilisieren zu können.

Grundlage dieser Vorgehensweise ist die Entdeckung, daß die immunologische Überwachung des Organismus dem Auftreten von Krebszellen grundsätzlich mit der Produktion spezifischer Antikörper begegnet.

Krebszellen besitzen für sie typische antigene Strukturen auf ihren Oberflächen.

Diese ermöglichen die Produktion und den effizienten Einsatz solcher Antikörper.

Livingston et al. entdeckten in ihren Studien am malignen Melanom, einem, ähnlich dem Gliom, Tumor neuroektodermalen Ursprungs, die immunologische Verwertbarkeit der Ganglioside als antigene Zielstrukturen für Vakzinierungsexperimente (78). Ziel einer Therapie solcher Art mußte also sein, diese Antigene der immunologischen Überwachung des betroffenen Organismus kenntlich zu machen.

1.7 Immunologische Überwachung neoplastischer Prozesse

Die immunologische Überwachung des Abwehrsystems beinhaltet neben der Erfassung und Bekämpfung von Infektionen auch die Kontrolle maligner Entartungen.

Anhalt für diese Hypothese bietet die Beobachtung, daß die Inzidenz neoplastischer Prozesse in Patienten mit Immundefizienz anzusteigen scheint. Beispielhaft existieren Studien an Patienten nach Nierentransplantation, die bei einer Fallzahl von $n = 4000$ 37 Fälle mit malignen Neoplasien aufwiesen (26).

Grundlage des Prinzips der immunologischen Tumorüberwachung ist das Erkennen antigener Zielstrukturen auf den Oberflächen neoplastischer Zellen.

Diese Zellen exprimieren im Verlauf ihrer malignen Entartung oft Oberflächenmoleküle, die in physiologischem Gewebe nur selten oder gar nicht vorkommen. Solche Moleküle müssen, um vom Immunsystem als fremd erkannt zu werden, sich also entweder in der Struktur oder Verteilung von den Oberflächenmolekülen normaler Zellen unterscheiden.

Im Falle gliomatöser Tumoren repräsentieren Ganglioside diese Veränderungen. Gliome zeigen auf ihren Membranoberflächen eine gegenüber normalen Gliazellen veränderte Gangliosidzusammensetzung, ein anderes Gangliosidmuster (119,14,105,36,37,39,40,144). Dieser Wechsel entspricht dem oberflächenmolekularen Ausdruck ihrer im Rahmen der neoplastischen Transformation erfahrenen Entdifferenzierung. Man beobachtet eine Umverteilung zugunsten weniger komplexer Ganglioside.

1.7.1 Immunantwort auf prinzipiell autologe Moleküle

Ganglioside sind in sehr geringen Konzentrationen physiologische Konstituenten aller Zellen des menschlichen Organismus.

Es wird vermutet, daß in so geringer Menge exprimierte Moleküle im Gesunden schlicht keine immunologische Toleranz erzeugen. Sie provozieren also keine Immunantwort - weder in Form von Duldung (Toleranz), noch in Form einer Abstoßungsreaktion.

Solche potentiellen Antigene werden für die immunologische Überwachung erst im Moment maligner zellulärer Transformation und somit zunehmender Menge apparent und als antigene Zielstrukturen angreifbar.

Die Generation von Antikörpern gegen tumorspezifische Antigene stellt im Fall von Gangliosiden als Zielstrukturen im Grunde also eine Art Autoimmunität dar. Das Immunsystem trifft im Falle maligner Entartung Abwehrmaßnahmen gegenüber physiologischerweise auf Zellen vorkommende Moleküle.

Diese immunologische Antwort soll anhand verschiedener Kriterien näher untersucht werden. Es sollen sowohl humorale als auch zelluläre Reaktionen des Immunsystems demonstriert werden.

1.7.2 die humorale Antwort

1.7.2.1 Komplement

Hierbei führt eine komplexe konzertierte Aktion verschiedener funktionell gekoppelter Proteine, des sogenannten Komplements, zur Lyse der Zielzelle.

Stimulierendes Moment zur Aktivierung der Komplementkaskade ist die vorausgegangene Bindung von Antigen und Antikörper(n), eine Ag- Ak- Komplexbildung. Als antigene Zielstrukturen sollen, wie oben erwähnt, tumorspezifische GSL-Epitope dienen.

Die Immunglobuline IgG und IgM binden antigenen Oberflächenstrukturen auf den Zielzellen, und die so entstandenen Komplexe setzen die Kaskade in Gang.

Am Ende der Komplementkaskade führt die Anlagerung der Komplementfaktoren an der Zelloberfläche zur Entstehung eines cytolytischen membranschädigenden Proteinkomplexes (MAC – membrane attack complex). Er garantiert die Auflösung der Membranintegrität und in der Folge die osmotische Lyse der angegriffenen Zelle.

Aktivierte und in den Ablauf der Komplementkaskade involvierte Komplementfaktoren wirken auch nach bzw. während ihres Abbaus am Ort der Zytolyse. Ihre Fragmente stimulieren Makrophagen (7), Mastzellen, neutrophile und basophile Granulozyten zur Phagozytose und/ oder Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Tumornekrosefaktor, die auch die Gefäßpermeabilität steigern. Man bezeichnet sie als Anaphylatoxine, da ihre Wirkung einer Anaphylaxie ähneln können.

1.7.2.2 Antikörper

Ihre Funktion in der Tumorbekämpfung als Teil der Komplementaktivierung wurde bereits angesprochen. Eine weitere Aufgabe kommt ihnen im Ablauf der Antikörperabhängigen Zellvermittelten Zytotoxizität zu. Sie findet im Abschnitt 1.7.3 „die zellvermittelte Immunantwort“ im Zusammenhang mit den jeweiligen Effektorzellen Erwähnung.

Der Ablauf einer immunologischen Antikörperantwort, d.h. B-Zellantwort erfordert neben dem spezifischen Antigenkontakt in der Regel auch den kostimulatorischen T-Zelleinfluß. Deren zytokinvermittelte Information zur Differenzierung in aktivierte B-Zellen, nämlich Plasmazellen, ermöglicht die Produktion spezifischer Immunglobuline. Sie haften den antigentragenden Zielzellen an und ermöglichen den effektiven Einsatz der Komplementfaktoren, bzw. der Effektorzellen der

antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität wie Makrophagen und NK-Zellen.

Die initiale B-Zellantwort auf einen antigenen Stimulus erfordert keinen T-Zelleinfluß. Frühe Stadien der Antikörperreaktion sind gekennzeichnet durch das Auftreten von Immunglobulinen vom Typ IgM. Erst durch Einflußnahme von T-Zellen wird die Umschaltung auf IgG-Antikörperproduktion ermöglicht.

Dieser sogenannte Isotypwechsel garantiert u.a. eine Affinitätssteigerung in der Antikörperfunktion.

Erhöhte Antikörpertiter gegen Ganglioside in Patienten mit malignem Melanom scheinen in Verbindung zu stehen mit einer verlängerten Rezidivfreiheit und einer insgesamt verlängerten Überlebenszeit (75,77,79). Ein Zusammenhang zwischen vakzininduzierter Antikörperproduktion und einer eventuell verlängerten Überlebenszeit ist daher ein zusätzlicher Aspekt in der Auswertung der erhobenen Daten.

In den auf die Behandlung maligner Melanome fokussierten Vakzinierungsstudien bestand der größte Anteil der gemessenen Antikörpertiter aus Immunglobulinen vom Typ IgM, was weitgehend einer Nichtinanspruchnahme des T-Lymphozytenweges entspricht. Argumente hierfür waren auch die kurze Dauer der Immunantwort und das Fehlen einer meßbaren IgG-Titererhöhung (79).

Ziel einer effektiven Immuntherapie muß auch die Stimulation einer IgG-Produktion sein. Sie ist von längerer Dauer und auch Zeichen der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Mit der Entwicklung der monoklonalen Antikörper eröffnete sich die Option zu deren immuntherapeutischem Einsatz und somit zur passiven Immunisierung. Die Ergebnisse dieser Ansätze in der therapeutischen Anwendung beim malignen Melanom und Glioblastom waren hinsichtlich des Einsatzes gegen Glykosphingolipide allerdings trotz einiger Remissionen insgesamt bislang nicht von zufriedenstellendem Erfolg gekrönt. Sie nährten jedoch die Hoffnung, nicht zuletzt Dank des Nachweises ihrer lytischen Potenz, Ganglioside als Antigene zum Zwecke aktiver Immunisierungen verwenden zu können (73,31,127,91,126).

1.7.3 Die zellvermittelte Immunantwort

Erstmals beschrieben wurde das Phänomen lymphoidzellulärer Infiltrate in Gliomen im Jahre 1960 von Bertrand und Mannen (8). Ridley und Cavanagh deuteten 1971 diese Erkenntnis als Beweis einer Antitumorantwort des Wirtes auf maligne intrakranielle Prozesse (107). Der Grad der zellulären (Makrophagen-, Lymphozyten-) Infiltration scheint in proportionalem Verhältnis zur Überlebenszeit zu stehen, was den immunologisch protektiven Wert dieser Erscheinung unterstreicht und nicht mit physiologischen Abbaureaktionen nekrotischen Gewebes verwechselt werden darf (18).

Dabei ist das Eindringen der Abwehrzellen als aktiver Vorgang zu werten. Man findet sie nicht nur perivaskulär, sondern auch weit ins Parenchym vordringend und Tumorzellnester umgebend (43).

Man betrachtet die zelluläre Immunantwort als die effektivere in der Bekämpfung solider tumoröser Prozesse.

Unglücklicherweise gilt genau dieser Weg der Immunabwehr in Patienten mit malignen Gliomen als supprimiert (137,4,17,140,81). Danach weisen Gliompatienten eine präoperativ reduzierte Gesamtlymphozytenzahl auf, wobei im besonderen die CD4+-Fraktion der T-Helferzellen numerisch stark geschwächt (23,9,139) und die Interleukin2-Produktion eingeschränkt (124,19) ist.

In diesem Zusammenhang wird in der Literatur über eine hohe Inzidenz einer Nichtreaktivität bei Tests von Immunreaktionen vom verzögerten Typ berichtet. Man bezeichnet diesen Zustand als Anergie und wertet ihn als Zeichen geschädigter T-Zellfunktion.

Grundlage dieser auch als Typ-IV-Reaktion bezeichneten Immunantwort ist die Funktion von CD4+ Helfer-T-Zellen.

1.7.3.1 T-Helferzellen

Sie entstehen aus naiven T-Lymphozyten nach vorangegangener Antigenpräsentation. Man bezeichnet diesen Vorgang als Sensibilisierung.

Gelangt die entsprechende antigene Determinante in das Gewebe, so wandern die sensibilisierten Gedächtnis-T-Lymphozyten aus dem Blutstrom an den Ort der Entzündung; das sogenannte Homing wird vollzogen. An der Eintrittspforte des Antigens erfahren sie durch residente Makrophagen eine erneute Aktivierung, proliferieren und medieren die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ. Es kommt zum charakteristischen Entzündungsphänomen.

Als makroskopischer Ausdruck der Entzündungsreaktion entwickelt sich am Injektionsort eine gerötete derbe Induration. Sie ist ca. 18 Stunden nach intradermaler Applikation des Antigens nachweisbar und erreicht innerhalb von 24 - 48 Stunden ihren Höhepunkt. Dieser Latenz verdankt die Überempfindlichkeitsreaktion ihre Nomenklatur als „verzögert“.

Ziel dieser Tests ist also der Nachweis einer physiologischen T-Zellantwort auf ein zuvor appliziertes Antigen. Er erlaubt demnach eine erste Beurteilung, ob das Vakzin das Immunsystem in der gewünschten Weise stimuliert. Eine positive Testung könnte somit als gesteigerte immunzelluläre Aktivität gewertet werden.

Eine genaue Ursache für die hohe Inzidenz der oben erwähnten Anergie bei Patienten mit malignem Gliom konnte bislang nicht ermittelt werden. Die potentielle Existenz eines Serum-Blocking-Factors steht jedoch im Raum und wird im Kapitel 1.5 näher besprochen.

T-Helferzellen vermitteln darüberhinaus auch die Umschaltung der Antikörperproduktion von IgM auf IgG, den sogenannten Klassenwechsel. Diese Funktion ermöglicht den Einsatz der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (1.7.3.3).

Die von den aktivierten T-Lymphozyten produzierten Lymphokine ermöglichen neben einer autokrinen Stimulation zur Proliferation und der Rekrutierung nicht antigenspezifischer T-Lymphozyten auch den Gewebeeintritt zirkulierender Leukozyten aus der Blutbahn. Es handelt sich hier zumeist um Monozyten, deren Nomenklatur sich mit ihrer Extravasation in Makrophagen wandelt (61,7). Sie können auch im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden und demnach auch von dort aus eine Aktivierung erfahren (98).

Zum einen kommt eine einfache Phagozytose der antigenträgenden Zielzelle in Betracht. Zum anderen spielt die von den aktivierten Makrophagen ausgelöste Entzündungsreaktion (146) eine Rolle – das entzündliche Infiltrat, größtenteils aus neutrophilen Granulozyten bestehend, sorgt für Lyse und Entsorgung des Antigens.

Die hauptsächliche Effektivität von Makrophagen in der Tumorbekämpfung scheint allerdings in ihrer Potenz zur Produktion und Ausschüttung lysosomaler Enzyme und Zytokine, wie TNF (132), dem Tumornekrosefaktor zu liegen. Endlich führt das zur Zerstörung der Zielzelle.

1.7.3.2 CD8+ Zytotoxische/ Suppressor- T- Zellen

Die meisten zytotoxischen T-Lymphozyten tragen das Molekül CD8+ an ihrer Oberfläche. Sie lysieren Zielzellen, die das für sie spezifische Antigen besitzen.

Voraussetzung für ihr Aktivwerden ist der direkte Kontakt mit der antigenträgenden Zelle.

Durch von Zytokinen anderer T-Zellen (CD4+ T-Helferzellen) übermittelte Informationen erfolgt die endgültige Ausdifferenzierung in funktionelle zytotoxische Effektoren und daraufhin die Lyse der zu zerstörenden Zielzelle. Von T-Helferzellen geht auch die zytokinvermittelte Steigerung der Zielzellantigenizität aus, wodurch die Effektivität der Zytotoxischen T- Zellen verbessert wird.

CD8+ Zellen scheinen über ihre direkte lytische Funktion hinausgehend auch eine stimulierende Rolle bei der Makrophagenaktivierung zu spielen.

Üben Zytotoxische T- Zellen suppressierenden Einfluß auf die Immunantwort aus, werden sie als Suppressor- T- Zellen bezeichnet.

1.7.3.3 NK- (Natürliche Killer-) Zellen

Die Gruppe der Natürlichen Killerzellen zählt man zu den Werkzeugen der natürlichen Immunität, d.h. ihre Aktivierung zur Zytolyse erfordert keinen initialen Antigenkontakt. Sie entstammen phylogenetisch der Reihe primitiver Zytotoxischer T-Lymphozyten.

Trotz des Fehlens eines spezifischen Antigenerkennungssystems ist ihr Einsatz sehr selektiv. NK-Zellen erkennen und lysieren Zielzellen, die Antikörper des

Immunglobulinisotyps G tragen. Dieser Vorgang wird daher als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität bezeichnet. Sie repräsentieren die Hauptmediatoren dieser Form der Immunität.

Am Beispiel des malignen Melanoms ist die Effektivität dieser immunologischen Antwort gut dokumentiert (46,62) und gilt als einer der Haupteffektormechanismen der Tumorattacke.

Wird ihre Aktivität durch CD4+ Zellen, bzw. deren Ausschüttung von Interleukin2 stimuliert, differenzieren sie sich zu lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK). Die Folge ist eine verbesserte Lysefähigkeit und eine erhöhte zytolytische Aktivität.

In den im Verlauf der Untersuchung erhobenen prozentualen Anteilen der NK-Zellen soll ein eventueller Einfluß erhöhter bzw. erniedrigter Zellpopulationen auf den klinischen Verlauf geprüft werden.

Eine direktere klinische Anwendung finden die dargestellten Beobachtungen im Einsatz der adoptiven Übertragung, einer Form der passiven Immunisierung.

Es existieren im wesentlichen zwei Wege der Applikation. Zum einen die direkte Inokulation autologer oder homologer immunologisch aktiver Zellen intracavitär, d.h. in das entsprechende Tumorbett und alternativ dazu die systemische Gabe.

Als Effektorzellen kommen z.B. lymphokinaktivierte Killerzellen und sensibilisierte T- Zellen in Betracht.

Bislang haben Studien, die diesen Ansatz verfolgten, allerdings nicht den erwünschten Erfolg gezeigt (145,50,101,70,67).

1.8 Vorarbeiten auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung zur Behandlung 1–22
neuroektodermaler Neoplasien. Ganglioside als Antigene

1.8 Vorarbeiten auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung zur Behandlung neuroektodermaler Neoplasien. Ganglioside als Antigene

Im Spektrum aktiver Immunisierungstherapien stehen unterschiedliche Alternativen zur Stimulation einer meßbaren Antigangliosidantikörperproduktion offen.

1.8.1 Immunisierungen mit Ganzzellpräparationen

In Immunisierungsstudien mit Vakzinen aus Lysaten ganzer Zellen, die Ganglioside exprimierten, konnte am Beispiel des malignen Melanoms eine adäquate Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Wobei allerdings das Gros der beobachteten immunologischen Antworten sich gegen Antigene auf zusätzlich in den Vakzinen enthaltene Substanzen (wie z.B. HLA- Antigene) richtete. Nur wenige immunisierte Patienten entwickelten Antikörper, primär vom IgM- Typ, gegen die eigentlichen Zielstrukturen der Untersuchung, die Ganglioside (76,125,75).

1.8.2 Purifizierte Gangliosidvakzine

Die gewonnen Erkenntnisse fanden Umsetzung in Versuchen, mit Impfstoffen aus isolierten Gangliosiden Erfolge in Form einer entsprechenden Antikörperproduktion zu erzielen. Studien, in denen purifizierte Ganglioside in Verbindung mit immunologischen Adjuvantien appliziert wurden, konnten allerdings in der Regel auch nur moderate Antikörpertiter vom IgM- Typ und kurzer Dauer etabliert werden, was auf eine weitgehend T-Zell-unabhängige Immunogenität schließen ließ (75,71). Lediglich in seltenen Fällen wurde auch eine geringfügige Antikörperreaktion vom Typ IgG beobachtet (75,74).

Bereits in dieser Phase der Impfstoffentwicklung schienen erhöhte Antikörpertiter mit verlängerten Lebenszeiten der vakzinierten Patienten zu korrelieren (75,77,79).

1.8 Vorarbeiten auf dem Gebiet der aktiven Immunisierung zur Behandlung 1–23
neuroektodermaler Neoplasien. Ganglioside als Antigene

1.8.3 Immunisierung mit strukturell ähnlichen Substanzen

Versuche, die niedrige Immunogenität der Ganglioside durch die Verwendung ähnlicher (man spricht von „Congeners“), physiologischerweise nicht auf Zelloberflächen vorkommender, Moleküle zu umgehen, waren nicht erfolgreich. Die Hoffnung, eine Kreuzreaktivität zu provozieren, konnte nicht bestätigt werden (109,108).

1.8.4 Konjugatimpfstoffe

Zur Behandlung des Malignen Melanoms wurden auf der Basis von Landsteiners und Chases Experimenten bezüglich des Transfers kutaner Sensibilität auf simple Verbindungen (68) im Zusammenhang mit Hapten/Carrier- Proteinkonjugaten im folgenden Konjugatimpfstoffe entwickelt.

Die konkrete Idee zu einer Kopplung von Glykolipid und Protein zur Steigerung der Immunogenität entstand im wesentlichen aus den wissenschaftlichen Vorarbeiten von Taketomi und Yamakawa, die Landsteiners Entdeckungen erstmals für die Konfektion von Glykolipidimpfstoffen modifizierten (127).

Prinzip dieser Vakzinherstellung ist die Kopplung eines nicht oder nur wenig immunogenen Antigens mit einem fremden, immunogenen Protein- carrier- Molekül, um eine entsprechende Antikörperproduktion auch gegen das eigentlich tolerierte Antigen, nämlich das Gangliosid, zu erzeugen.

Die klinische Anwendung bei Melanompatienten brachte entscheidende Fortschritte. Die Vakzine waren tatsächlich in der Lage, die Antikörperproduktion deutlich zu verbessern (46,62,79).

Die erzeugten Antikörpertiter setzten sich vornehmlich aus Vertretern des Immunglobulinisotyps IgM zusammen, wobei auch moderate IgG-Titer zu verzeichnen waren (46). Beide AK-Populationen waren in der Lage, eine komplementaktivierte Zytolyse der gangliosidtragenden Tumorzellen zu medieren. IgG- Antikörper vermittelten nachweislich eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (46,62).

1.9 Verwendetes Vakzin

Auf dem Boden dieser Forschungsergebnisse und tierexperimenteller Vorarbeiten am Modell des Minischweins, entwickelten Jennemann et al. (53) einen Impfstoff, der im Sinne einer aktiven Immunisierung die Produktion von Antikörpern stimulieren und den klinischen Verlauf sowie das outcome der Gliompatienten verbessern soll (eine verkürzte Übersicht zur Herstellung kann dem Anhang -9.1- entnommen werden).

1.9.1 Zusammensetzung des Konjugatvakzins

Das Impfstoffkonjugat setzt sich in funktionsorientierter Darstellung aus folgenden Bestandteilen zusammen: dem Gangliosid Gtri2, dem Carrier-Protein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) und dem immunologischen Adjuvans Monophosphoryllipid-A (MPL-A).

1.9.2 Gangliosid

Als antigene Zielstruktur auf den zu eliminierenden Tumorzellen und stellvertretend für andere typische Gliomganglioside fiel die Wahl des Glykosphingolipids auf Gtri2.

Für die Verwendung im Vakzin wird es gewonnen durch enzymatischen Abbau (β -Galaktosidase) aus dem Gangliosid Gtet2b, isoliert aus Rinderhirn.

Das Gangliosid Gtri2 ist im Organismus auf neoplastischen und reaktiven Astrozyten und demzufolge auch auf der Oberfläche von Astrozytomen und dem Glioblastoma multiforme nachweisbar (13,125,20,31). In verschiedenen Studien zur Untersuchung der Immunogenität von Melanomen sowie in bislang unveröffentlichten tierexperimentellen Evaluationen von Jennemann et al. unterstrich Gtri2 bereits seine Eignung zur Verwendung in Vakzinen. Es gilt als eines der erfolgversprechend immunogenen Ganglioside neuroektodermaler Tumoren (130,93).

1.9.3 Carrier-Protein

Als Carrier-Protein, d.h. als antigenpräsentierende Struktur, kommt ein Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) zum Einsatz. Seine Effektivität in der hier angewandten Verbindung mit Gangliosiden konnte zuvor bereits sowohl im Tiermodell als auch am Patienten bewiesen werden (53,45).

1.9.3.1 Funktion

Kohlenhydratantigene scheinen per se keine T-Zellantwort provozieren zu können (72). KLH, als immunologischer Carrier, ist genau dazu in der Lage. In Verbindung mit dem Gangliosid können so T-Helferzellen zur Zytokinproduktion animiert werden, was in der Folge einen Klassenwechsel der Immunglobulinisotypen (IgG statt IgM) ermöglicht (84,45).

Die Spezifität der Antikörper wird nicht beeinflusst.

Dieser Isotypenswitch ist von Bedeutung für die Erweiterung von Dauer und Wirkungsspektrum der immunologischen Antwort.

Immunglobuline vom Typ IgG sind über längere Zeit im Serum anzutreffen, sie besitzen eine ausgeprägte Membrangängigkeit, eine höhere Affinität und fungieren als Mediatoren der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (110).

Aus der immuntherapeutischen Behandlung von Blasen Tumoren kennt man darüber hinaus eine weitere potentielle Funktion von Keyhole Limpet Hemocyanin: Es scheint die Aktivität der Natürlichen Killerzellen steigern zu können (88).

1.9.4 Adjuvans

Ein weiterer funktioneller Bestandteil des Vakzins ist das potente Immunadjuvans Monophosphoryllipid A (102,103,54).

1.9.4.1 Funktion

MPL-A verstärkt die humorale Immunantwort (103) und scheint die Kreuzreaktivität gegenüber anderen, „vakzinfremden“ Gangliosiden zu senken (54).

1.10 Potentielle Komplikationen der Vakzinierungstherapie

Verschiedene Studien bringen die Existenz erhöhter Antigangliosidantikörpertiter in ursächlichen Zusammenhang mit dem Auftreten diverser peripherer Neuropathien wie dem Guillain- Barré Syndrom (49).

Sie scheinen eine Rolle zu spielen bei der multifokalen Motoneuropathie mit Überleitungsblock (99) sowie chronisch demyelinisierenden Neuropathien (123) und werden auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems beobachtet. Multiple Sklerose und systemischer Lupus Erythematodes seien hier beispielhaft erwähnt (29).

Kontrovers wird über die Funktion von Gangliosiden in Verbindung mit dem Auftreten experimenteller Autoimmunencephalomyelitiden berichtet. Tierexperimentelle Arbeiten geben bislang nicht hinreichend stichhaltige Informationen über tatsächliche Zusammenhänge (114).

Grundsätzlich muß in diesem Kontext ergänzt werden, daß die hier verantwortlichen Antikörper antigene Kohlenhydratepitope der Glykosphingolipide erkennen, die strukturgleich auch in anderen Molekülen, wie z.B. bakteriellen Lipopolysacchariden erkannt werden können (138).

Die dargestellte Situation läßt die Diskussion über direkte pathogenetische Zusammenhänge prinzipiell offen, zwingt aber dessen ungeachtet zu besonderer Aufmerksamkeit in der Kontrolle hinsichtlich eventueller adverser Reaktionen (64) im Rahmen von Immunisierungstherapien.

1.11 Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation sollen die Ergebnisse einer Phase-I-Studie mit immuntherapeutischem Ansatz im Sinne einer Vakzinierungsmaßnahme vorgestellt werden.

Substrat des applizierten Vakzins ist ein Gangliosidkonjugat aus dem Gangliosid Gtri2 und Keyhole Limpet Hemocyanine (KLH) zusammen mit dem immunologischen Adjuvans Monophosphoryllipid A (MPLA).

Im Anschluß an eine primär chirurgische Entfernung der mikroskopisch sichtbaren Tumormassen und einer im folgenden applizierten Strahlendosis (von in der Regel 60 Gy) soll sie die Vernichtung residueller Krebszellen ermöglichen.

Die untersuchte Fragestellung läßt sich in die folgenden Aspekte differenzieren:

Hauptkriterien sind:

- Die Beurteilung der Verträglichkeit der Therapie. Ist die Vakzinierung zur adjuvanten Therapie geeignet?
- Werden Antikörpertiter generiert?
- Ändert sich die prozentuale und absolute Verteilung der Abwehrzellen und läßt sich daraus ein Einfluß auf den klinischen Verlauf erkennen?

Nebenkriterien sind:

- Überlebenszeit
- Zeitdauer der erzielten Tumorkontrolle
- Lebensqualität

2 *Material*

2.1 *Patienten*

2.1.1 Patientenauswahl

2.1.1.1 Einschlußkriterien

Als Einschlußkriterien wurden bestimmt:

- Alter (18- 80 Jahre),
- Computertomografischer, bzw. magnetresonanztomografischer Nachweis eines Rest- oder Rezidivtumors,
- Nachweis des als Antigen fungierenden Gangliosids Gtri2 auf der Tumoroberfläche
- Befriedigender Allgemeinzustand (Karnofsky- Index > 70%),
- Einverständniserklärung des Patienten

2.1.1.2 Ausschlußkriterien

Ausschlußkriterien sind:

- Vorliegen von Neuropathien,
- Autoimmunerkrankungen oder
- Niereninsuffizienz

2.1.1.3 Diagnostik des Ausgangszustandes

Die Diagnostik des Ausgangszustandes umfaßt eine komplette neurologische Untersuchung und die immunhistochemische Feststellung des tumorspezifischen Gangliosidmusters anhand einer während der chirurgischen Resektion gewonnenen Tumorgewebeprobe, um die histologische Diagnose zu bestätigen und den Nachweis der Existenz von Gtri2 zu führen. Nur Tumoren, die in verstärktem Maße Gtri2 exprimieren, kommen für eine Immunisierung mit Gtri2-Konjugat-

2.1 Patienten

Vakzinierung in Betracht. Allein auf diese Weise kann eine Kreuzreaktivität zum Impfstoff erfolgen.

Inhalt der Untersuchung ist außerdem die initiale Bestimmung des Karnofsky-Indexes (58,129) und die des für die qualitative Beurteilung des Therapieverlaufs interessanten Barthel-Indexes (siehe Anlage).

Hierbei kommt der Erhebung des Karnofsky-Indexes als einem der drei wichtigsten prognostischen Meßinstrumente für die Prognose von Überlebenszeiten (129) lediglich die Aufgabe der Feststellung der Erfüllung der Einschlußkriterien zu. Er wird nicht zur Beurteilung der Lebensqualität, bzw. der Entwicklung funktioneller Kapazitäten seitens der behandelten Patienten verwendet.

Als hierbei überlegenes Modul findet der verbal applizierte Barthel-Index Verwendung.

Mit diesem Werkzeug zur Messung von Fähigkeiten des täglichen Lebens (Activities of Daily Living, ADL) ist eine annähernde Ermittlung der Lebensqualität, im besonderen bei Verlaufsbeobachtungen, in vergleichbarer Darstellung möglich (131).

Darüberhinaus ermöglicht er eine objektivere Beschreibung, eine weniger vom Beobachter abhängige Momentaufnahme der jeweils aktuellen Lebenssituation des Patienten (48).

2.1.1.4 Übersicht über das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfaßt 7 Personen. Sie alle teilen die pathologisch gesicherte Diagnose eines malignen intrakraniellen astrozytären Tumors.

Alle Patienten erhielten die im Rahmen ihrer Primärdiagnose übliche Standardtherapie, umfassend die mikrochirurgische Resektion der Neoplasie mit konsekutiver Radiatio und kortikosteroidaler Begleitmedikation.

3 der Patienten wurden vor Beginn der Immunisierung bereits an einem Rezidiv operiert; und einer dieser Patienten erhielt nach der Rezidivoperation aufgrund der strahlentherapeutischen Vorbelastung im Rahmen der Primärtherapie eine kombinierte Radiochemotherapie.

Innerhalb der letzten 4 Wochen vor Beginn der Immunisierung erhielt keiner der Patienten eine Strahlen-, Chemo- oder Immuntherapie.

Abbildung 1 *Patientencharakteristiken*

Patientencharakteristiken	
<i>untersuchte Patienten insgesamt</i>	7
<i>Geschlecht</i>	
männlich	4
weiblich	3
<i>Altersverteilung</i>	39 - 69 Jahre
<i>Histologische Erstdiagnose</i>	
Glioblastom	5
Anaplastisches Astrozytom	1
Oligodendrogliom	1
<i>Rezidive bis Studienbeginn</i>	
1 Rezidiv	2
2 Rezidive	1
<i>Ausmaß der chirurg. Intervention zu Studienbeginn</i>	
Biopsie	1
Teilresektion	1
makroskopische Totalresektion	6
<i>Histologische Diagnose zu Studienbeginn</i>	
Glioblastom	6
Anaplastisches Astrozytom	1

3.1 Herstellung des Vakzins: siehe Anlage

3.2 Studienplan

3 Methoden

3.1 Herstellung des Vakzins: siehe Anlage

3.2 Studienplan

Abbildung 2 Studienplan

Untersuchungs- termine	U 1	U 2	U 3	U 4	U 5	U 6	U 7	U 8	U 9	U 10
Zeitliche Abfolge der Maßnahmen in Wo- chen	1.	3.	5.	7.	8.	11.	12.	15.	16.	19.
Subkutane Injektion des Impfstoffes an wechselnden Injek- tionsorten des Rumpfes	Injektion 1	Injektion 2	Injektion 3	Injektion 4		Injektion 5		Injektion 6		
Lumbalpunktion	LP 1				LP 2			LP 3		
EKG	EKG 1					EKG 2		EKG 3		
Blutuntersuchung	zu jedem Untersuchungstermin									
Urinuntersuchung	zu jedem Untersuchungstermin									
Feststellung des Barthel - Indexes	zu jedem Untersuchungstermin und im Anschluß an U 10 monatlich bis maximal U20									

3.3 Untersuchungsparameter

Alle Patienten werden zur Beurteilung des Therapieverlaufs im Rahmen des Therapieplanes insbesondere unter folgenden Gesichtspunkten untersucht:

3.3.1 Beurteilungskriterien

1. Detektion eventueller adverser Reaktionen. Beurteilungswerkzeug ist hierbei der von der WHO zur Bemessung akuter und subakuter Toxizität empfohlene Kriterienkatalog (siehe Anlage 9.2). Ein zusätzlicher Schwerpunkt wurde auf die Diagnostik eventueller peripherer Neuropathien gelegt. Im Zusammenhang mit dem Auftreten erhöhter Antigangliosidantikörpertiter wurde, wie in Kapitel 1.10 aufgeführt, über eine erhöhte Inzidenz von Erkrankungen dieses Typs berichtet.
2. Nachweis einer Immunantwort auf das applizierte Gangliosidvakzin
 - In Form einer laborchemischen Untersuchung von Serum und Liquor cerebrospinalis hinsichtlich der Produktion von Antikörpern gegen Gtri2. Bestimmt werden Titerhöhe und Immunglobulinisotyp.
 - Durch Kontrolle des Lymphozytenpools der Patienten anhand einer jeder Blutentnahme angeschlossenen Lymphozytensubsetuntersuchung.
 - Durch die Dokumentation einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (DTS – Delayed-Type-Hypersensitivity) in Form einer Rötung und Induration um die jeweils markierte Einstichstelle.
3. Darstellung des klinischen Verlaufs mittels Bestimmung des verbal applizierten Barthel-Indexes durch den Untersucher. Ein Werkzeug zur Ermittlung der Einschlußkriterien ist darüberhinaus die Darstellung des initialen Karnofsky-Indexes. Ergänzt wird diese Form der Diagnostik durch konkrete Erhebung der jeweiligen Selbsteinschätzung in Bezug auf Faktoren der Lebensqualität.
(Barthel- Index & Karnofsky- Index siehe Anlage)

4. Detektion eines neoplastischen Rezidivs bzw. einer neu auftretenden cerebralen Raumforderung. Die Kontrolle dieses Parameters erfolgt computertomografisch im Abstand von jeweils 2 Monaten.

3.3.2 Blutuntersuchung

Bestandteil jedes Untersuchungstermins ist die venöse Blutentnahme zur Diagnostik folgender Parameter:

- **Kleines Blutbild**
- **Differentialblutbild**
- **Profil** (Na, K, Ca, Cl, GOT, GPT, AP, GGT, LDH, CK, Pankreasamylase, Lipase, PCHE, Bilirubin, Glukose, Protein, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Cholesterin, Triglyzeride, Eisen)
- **Serum-Antikörper** gegen Gtri2, Gtri1, Glac2 etc. und Titerhöhe und Immunglobulinisotyp
- **Lymphozytensubset**

3.3.3 Liquoruntersuchung

Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis entsprechend der im Therapieplan terminierten Intervalle erfolgt nach jeweils durchzuführender Lumbalpunktion.

Untersuchungsparameter ist hier der Nachweis von Antikörpern gegen das Gangliosid Gtri2.

3.3.4 Urinuntersuchung

Zusätzlich wird zum Zeitpunkt jeder Untersuchung der Urinstatus auf Proteinurie und Hämaturie überprüft (10 ml Urin). Als Untersuchungsmaterial wird hierbei Mittelstrahlurin verwendet.

3.3.5 Feststellung des neurologischen Status und Bestimmung des Barthel-Indexes

Dem Therapieplan entsprechend (3.2 oben) erfolgen diese Maßnahmen zu allen Untersuchungsterminen

U1 bis maximal U 20, d.h. 10 Monate nach der letzten Blutentnahme.

3.4 *Statistische Methoden*

Die aus den oben erwähnten Untersuchungen und Betrachtungen gewonnenen Daten bilden die Grundlage für folgende statistische Auswertungen und Darstellungen:

- Darstellung der erzielten Zeiträume einer „Tumorkontrolle“, d.h. ausbleibenden Rezidivwachstums bzw. Tumorprogresses,
- Darstellung der erzielten Überlebenszeit nach Erstdiagnose und nach Immunisierungsbeginn,
- Berechnung der medianen Überlebenszeit nach Erstdiagnose,
- Berechnung der medianen Überlebenszeit nach Immunisierungsbeginn,
- Relative Verteilung der Abwehrzellen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt,
- Darstellung der Entwicklung von NK-Zellzahlen über den Untersuchungszeitraum,
- Darstellung der Entwicklung von T-Zellzahlen über den Untersuchungszeitraum,
- Korrelation mittlerer T-Zellzahlen zur Überlebenszeit nach Immunisierungsbeginn nach Pearsons Produkt-Moment-Korrelation (147).
- Korrelation mittlerer T-Zellzahlen zur Überlebenszeit nach Diagnosestellung, ebenfalls nach Pearsons Produkt-Moment-Korrelation (147).

Bei im Rahmen der Produkt-Moment-Korrelationen nahegelegten statistisch relevanten Zusammenhängen zwischen den untersuchten Variablen erfolgt wegen des geringen Stichprobenumfanges eine Korrektur der Berechnungen nach Olkin und Pratt (113).

4 Kasuistiken, klinische Verläufe

4.1 Patientin A:

4.1.1 Kasuistik

Alter: 61 Jahre

Anamnese: Im Oktober 1995 erleidet die Patientin während der Verrichtung der Hausarbeit erstmals einen komplex-fokalen und sekundär generalisierten Krampfanfall mit Sturzereignis und Bewußtseinsverlust. Ein solches Ereignis wiederholt sich im Laufe des Tages, wobei der Bewußtseinsverlust diesmal länger andauert. Für den postictualen Zeitraum herrscht jeweils Amnesie. Zum Zeitpunkt ihrer Aufnahme in die neurochirurgische Klinik bietet sie folgenden

Aufnahmebefund: 61-jährige Patientin in gutem Allgemein- und übermäßigem Ernährungszustand. Keine neurologischen Defizite.

Bildgebende Diagnostik:

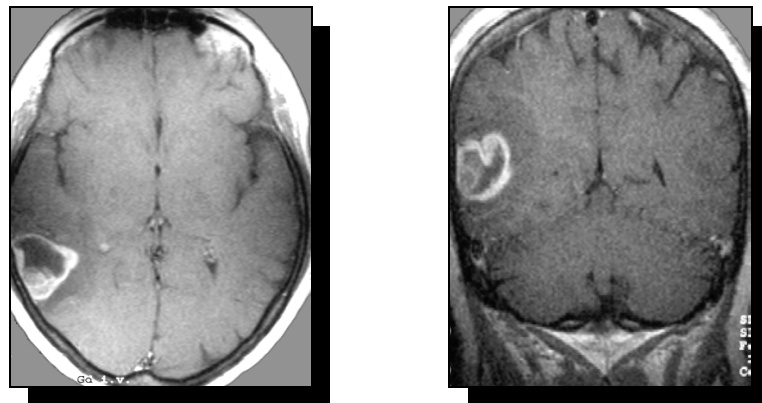


Abbildung 3 Patientin A: Erstbefund

Bildgebender Befund: Verdacht auf Glioblastoma multiforme rechts parietooccipital, bis ins Marklager reichend, Durchmesser \varnothing : ca. 3 x 3 cm.

Primärtherapie: operative Entfernung der Tumormasse am 08.11.1995 mit anschließender Radiatio (60 Gy) und kortikosteroidaler Begleitmedikation

Histologisch gesicherte Diagnose: Glioblastoma multiforme

Im Mai 1997 führt ein zunehmender nicht genau lokalisierbarer Kopfschmerz mit allgemeinem, ungerichtetem Schwindelgefühl zu erneuter bildgebender Diagnostik und der Feststellung eines Rezidivs im resezierten Tumorbett. Patientin A erlebt ihren Aktivitätsradius als deutlich eingeschränkt. Die aktuelle Symptomatik behindert sie stark in der Erhaltung einer kompletten Selbstversorgung.

Bildgebende Diagnostik:

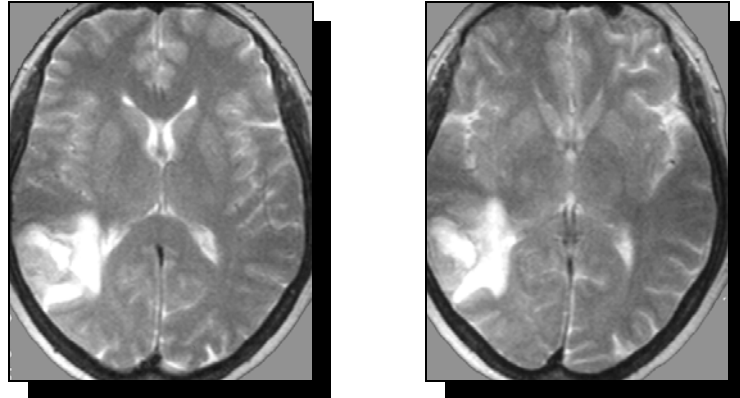


Abbildung 4 Patientin A: Erster Rezidivbefund. Ausgangsbefund vor Studienbeginn

Bildgebender Befund: Glioblastomrezidiv

Histologisch gesicherte Diagnose: Glioblastoma multiforme

Rezidiv- OP: 26.05.1997

Patientin A zeigt im Anschluß an die operative Therapie persistierend intermittierende Schwindelgefühle und Koordinationsstörungen, die in der Folge ein Laufdefizit bedingen. Ihr Antrieb ist vermindert bei jedoch wieder vollständiger Selbstversorgung.

Beginn der Immunisierungstherapie: 18.08.1997

4.1.2 Klinischer Verlauf

Patientin A erlangte im zeitlichen Rahmen der Immunisierungstherapie primär einen deutlichen Anstieg ihrer allgemeinen Leistungsfähigkeit.

Ein Einbruch im bis dahin positiven postoperativen Verlauf war ca. ab der 10. Woche nach Immunisierungsbeginn erkennbar.

Patientin A war aufgrund einer allgemeinen körperlichen Schwäche fortan auf einen Rollstuhl zur Fortbewegung angewiesen und entwickelte eine leichte Inkontinentia urinae.

Um die 12. Woche nach der ersten Immunisierung erfuhr die Patientin mehrmals eine passagere Parese der linken Körperhälfte (Kraftgrad 3-4/5) und entwickelte einen Tremor des rechten Armes.

Ihre Mobilität beschränkte sich zu diesem Zeitpunkt auf den Transfer zwischen Bett und Stuhl. Zwei Wochen später wurde im Rahmen der planmäßigen computertomographischen Untersuchungen ein Rezidiv diagnostiziert.

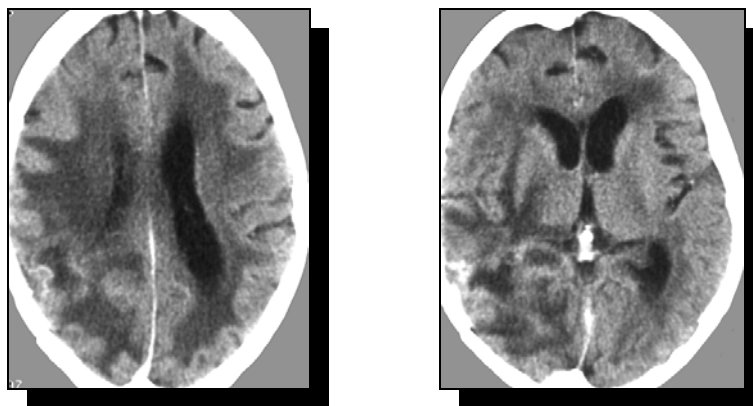
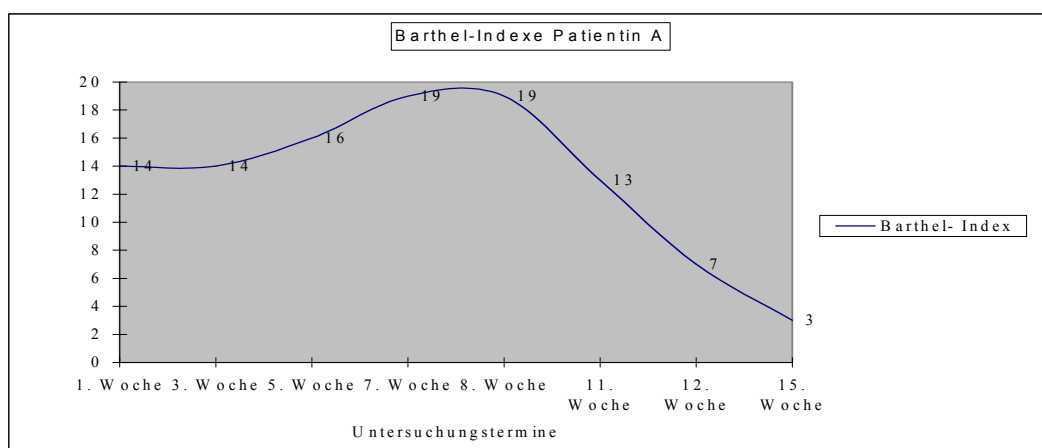


Abbildung 5 Patientin A: Rezidiv 14 Wochen nach Immunisierungsbeginn

Bis zu ihrem Ableben in der 114. Woche nach Primäroperation, der 21. nach Immunisierungsbeginn, war die Patientin nicht im eigentlichen Sinne bettlägerig und litt nicht an krankheitsbedingten Bewußtseinseinschränkungen.

Abbildung 6 Patientin A: Entwicklung des Barthel-Indexes



4.2 Patient B

4.2.1 Kasuistik

Alter: 69 Jahre

Anamnese: Im Januar 1997 erleidet Patient B erstmals einen generalisierten hirnorganischen Anfall im Sinne eines Grand mal mit postictualem Dämmerzustand. Klinikeinweisung am darauffolgenden Tag.

Aufnahmebefund: 69-jähriger Patient in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Aphasische Sprachstörung vom Broca-Typ, Apraxie der rechten Hand. Keine weiteren neurologischen Defizite.

Bildgebende Diagnostik:

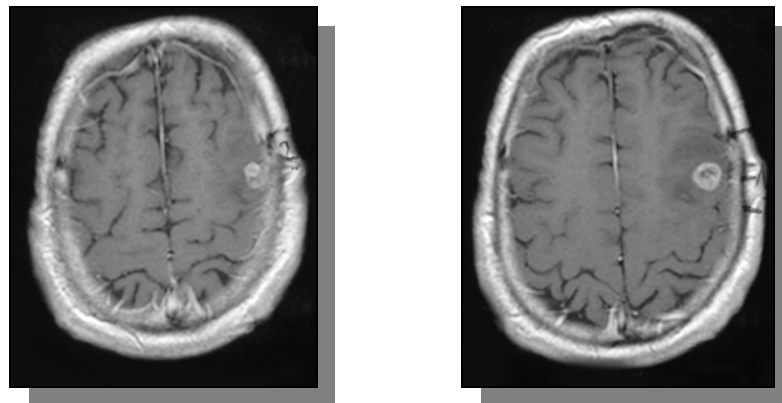


Abbildung 7 Patient B: Ausgangsbefund vor Studienbeginn

Bildgebender Befund: Verdacht auf Glioblastoma multiforme links präzentral kortikal/ subkortikal bis ins Marklager reichend, Durchmesser \varnothing ca. 1,5 cm

Primärtherapie: Tumorresektion am 16. 01. 1997, anschließend Radiatio (60 Gy) und kortikosteroidale Begleitmedikation

Histologisch gesicherte Diagnose: Glioblastoma multiforme WHO Grad IV

Beginn der Immunisierung: 03. 04. 1997

4.2.2 Klinischer Verlauf

Patient B erfuhr postoperativ eine Verschlechterung seiner initialen Symptomatik. Die von ihm im Rahmen der Erkrankung entwickelte motorische Sprachstörung

vom Broca- Typ erreichte unmittelbar nach dem Eingriff ein Maximum, besserte sich aber bis zum Entlassungstermin auf den Ausgangs-, d.h. Einweisungszustand. Vor Immunisierungsbeginn erkrankte Patient B an einer Pneumonie, die einer stationären Behandlung bedurfte und im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes ausgeheilt wurde.

Innerhalb der ersten 10 Wochen der Therapie erlitt Patient B zwei cerebrale Krampfanfälle im Abstand von ca. 8 Wochen.

Im Verlauf der Vakzinierungsstafel war eine signifikante Verbesserung der primären Symptomatik zu beobachten.

Die motorische Sprachstörung war zusehends rückläufig und die Apraxie der rechten Hand verschwand binnen kürzester Zeit fast vollständig, was subjektiv eine deutliche Steigerung der Lebensqualität erwirkte. Der Patient konnte sich nach ca. 7 Wochen nach der ersten Vakzinierung wieder selbständig ankleiden und seinem Hobby, der Gartenarbeit nachgehen.

12 Wochen nach Immunisierungsbeginn war die motorische Aphasie praktisch nicht mehr erkennbar. Feinmotorische Tätigkeiten, wie Schreiben, waren wieder möglich.

In der 23. Woche nach Primärvakzinierung kehrte die Apraxie der rechten Hand wieder zurück. Ca. einen Monat später entwickelte sich eine rechtsseitige Hemiparese. Er klagte zudem über intermittierende Schluckstörungen.

Das Computertomogramm der 32. Woche nach Primärvakzinierung ließ einen neuen Tumor erkennen.

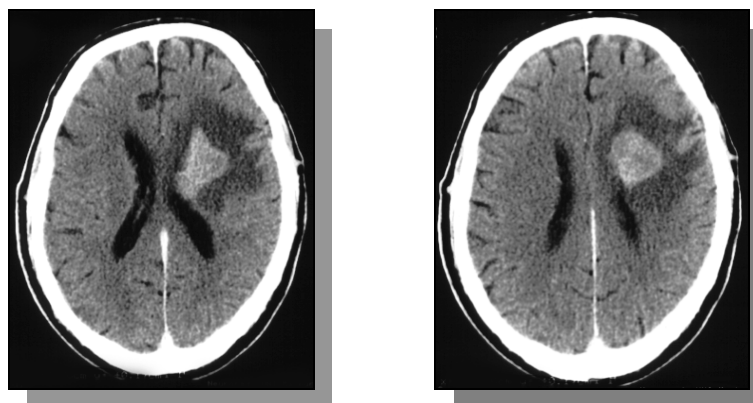
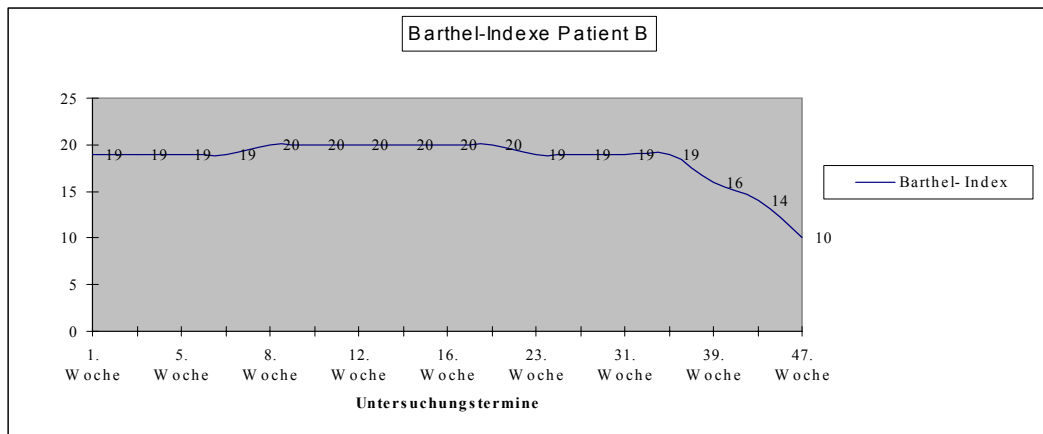


Abbildung 8 Patient B: Rezidivbefund 32. Woche nach Immunisierungsbeginn

In der 39. Woche nach Immunisierungsbeginn stellte sich der Patient mit jetzt persistierenden Schluckstörungen und einer wieder deutlichen motorischen Sprachstörung vor. Er hatte zudem eine Inkontinentia urinae entwickelt. Die Mobilität war außer einer latenten Antriebslosigkeit nicht eingeschränkt.

Eine Pneumonie führt in der 66. postoperativen Woche, der 54. nach I.-Beginn, zu einer massiven Schwächung des Patienten und in der Folge zum Tode.

Abbildung 9 Patient B: *Entwicklung des Barthel-Indexes*



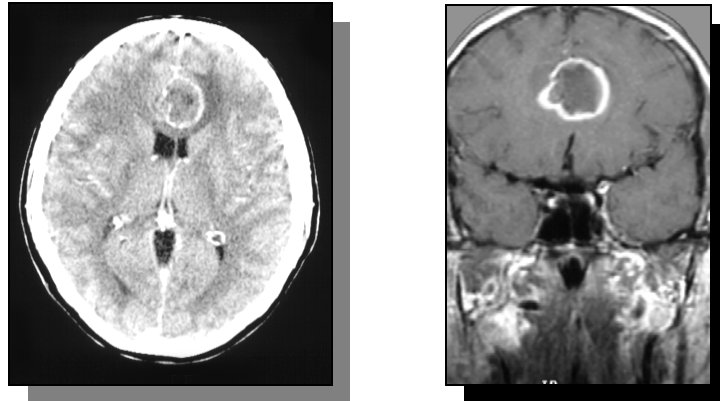
4.3 Patient C

4.3.1 Kasuistik

Alter: 39 Jahre

Anamnese: Mitte Juli 1996 erstmalig generalisierter hirnorganischer Anfall

Aufnahmebefund: 39-jähriger Patient in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Anamnestisch generalisierter hirnorganischer Krampfanfall, keinerlei neurologische Defizite.

Bildgebende Diagnostik:**Abbildung 10** Patient C: Ausgangsbefund

Bildgebender Befund: Raumforderung fronto-parietal beidseits, links betont.
Durchmesser Ø: ca. 2,5 x 3cm

Invasive Diagnostik: Stereotaktische Probebiopsie

Histologisch gesicherter Befund: Glioblastoma multiforme

Primärtherapie: mikrochirurgische Ausräumung der Tumormasse, anschließend Radiatio (60 Gy) und Kortikoidmedikation

Therapieverlauf: Erneute stationäre Aufnahme zur konservativen Therapie einer eitrigen Wunddehiszenz Ende August 1996.

Beginn der Immunisierung: 03. 09. 1996

4.3.2 Klinischer Verlauf

Patient C war kurze Zeit nach der operativen Intervention wieder arbeitsfähig.

Vor Beginn der Vakzinierungsstafel machten Wundheilungsstörungen in Form einer eitrigen Wunddehiszenz einen erneuten stationären Aufenthalt notwendig.

Neurologisch war Patient C unauffällig. Ca. 12 Wochen nach Immunisierungsbeginn erlangte er subjektiv wieder volle Belastungsfähigkeit.

6 Monate nach erster Immunisierung zeigte sich ein Rezidiv im resezierten Tumorbett:

Bildgebung:

Abbildung 11 Patient C: Rezidivdiagnose 29 Wochen nach Immunisierungsbeginn

Zwei Wochen später erfolgt aufgrund erneuter Wundheilungskomplikationen abermals eine stationäre Aufnahme und in der darauffolgenden Woche die Entfernung des Knochendeckels mit dem Verdacht auf eine beginnende Osteomyelitis. Patient C beklagte im Rahmen der Kontrolluntersuchungen progrediente Merkfähigkeitsstörungen.

1 Jahr nach der ersten Immunisierung stellte sich erstmals computertomografisch eine Größenzunahme des diagnostizierten Tumorrezidivs dar:

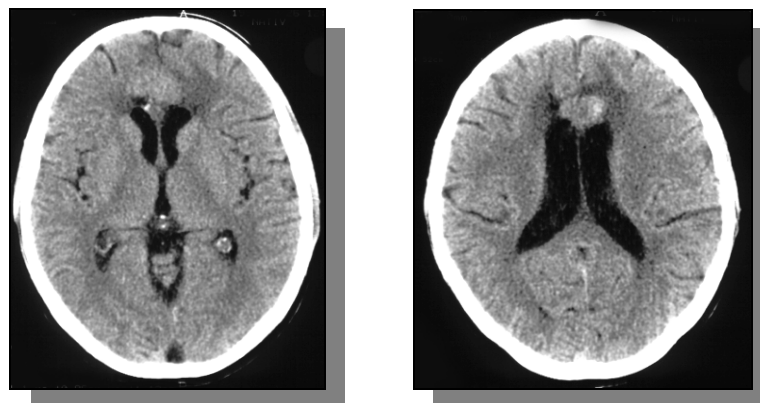


Abbildung 12 Patient C: Größenzunahme des Tumorrezidivs 26 Wochen nach Rezidivdiagnose

Es erfolgte die operative Entfernung desselben und die Anlage einer Pallasplastik zur Defektdeckung.

Im Anschluß an den in diesem Zusammenhang notwendigen stationären Aufenthalt stellte seine Lebensgefährtin einen beginnenden körperlichen und geistigen Abbau fest.

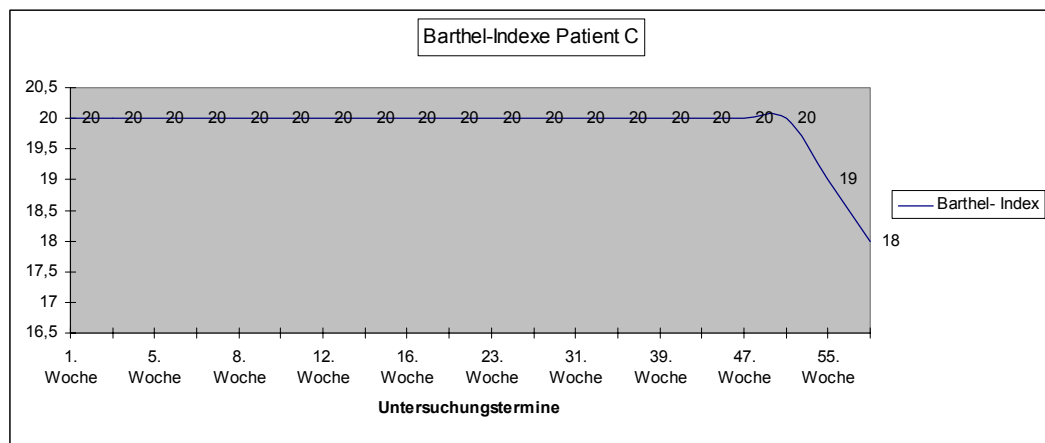
Der postoperative Verlauf war charakterisiert von Gangstörungen im Sinne einer diskreten rechtsseitigen Hemiparese.

Ca. 3 Monate im Anschluß an die erneute chirurgische Intervention litt der Patient unter fast täglichen milden generalisierten cerebralen Krampfanfällen. Eine Eigenmedikation mit Weihrauchpräparaten erstreckte sich über 3 anfallsfreie Monate. Ein darauffolgender Grand mal– Anfall führte zu einer massiven Verschlechterung der neurologischen Symptomatik und machte zur Erhaltung der Mobilität den Einsatz eines Rollstuhls erforderlich.

Eine tiefe Beinvenenthrombose führte den Patienten im folgenden wiederum in stationäre Behandlung. Daraufhin wurde Patient C bettlägerig und verlor die Fähigkeit zur Selbstversorgung.

Diese Situation, im besonderen charakterisiert durch eine ausgeprägte Somnolenz, war stabil bis zum Zeitpunkt seines Ablebens in der 98. Woche nach Primäroperation, der 91. nach I.-Beginn.

Abbildung 13 Patient C: Entwicklung des Barthel-Indexes



4.4 Patient D

4.4.1 Kasuistik

Alter: 57 Jahre

Anamnese: Ende August 1996 klagt Patient D über stechende Schmerzen im Bereich des Hinterkopfes, gelegentlich begleitet von einem ungerichteten Schwindelgefühl und Übelkeit.

Ihm fallen eine verstärkte Müdigkeit, deren Beginn er nicht genau datieren kann, auf und Gedächtnisstörungen. Die Ehefrau berichtet zusätzlich über ein gehäuftes Auftreten von Wortfindungsstörungen. Die Symptome veranlassen D zur medizinischen Abklärung.

Aufnahmebefund: 57-jähriger Patient in deutlich reduziertem Allgemein- und Ernährungszustand. Keine neurologischen Defizite objektivierbar.

Bildgebende Diagnostik:

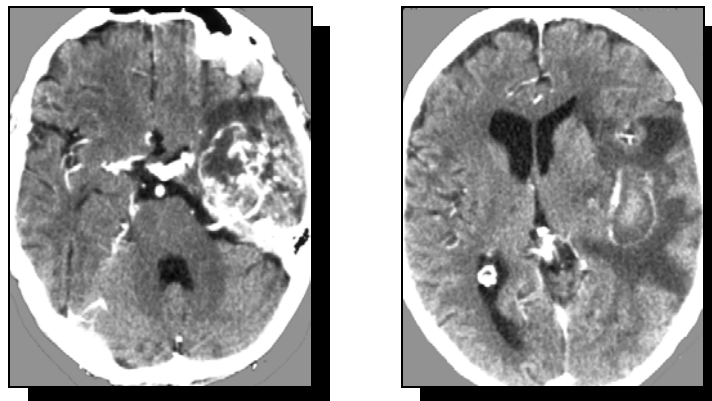


Abbildung 14 Patient D: Erstdiagnose

Bildgebender Befund: Verdacht auf Glioblastoma multiforme links temporal

Histologisch gesicherte Diagnose: Glioblastoma multiforme

Primärtherapie: Subtotale Lobektomie am 18.09.1996

Radiatio (60 Gy) und begleitende Kortisonmedikation

Therapieverlauf: Ende Oktober stationäre Behandlung einer Thrombose der rechten vena femoralis communis.

Anfang Dezember Panepidermolyse wahrscheinlich auf dem Boden einer Allergie.

Immunisierungsbeginn: 06.01.1997**4.4.2 Klinischer Verlauf**

Patient D erzielte innerhalb des Immunisierungszeitraumes eine deutlich Verbesserung seines zu Beginn der Therapie stark reduzierten Allgemein- und Ernährungszustandes.

Er gewann schnell wieder an Gewicht und berichtete in der Folge über eine merkliche Steigerung seines Antriebes und seiner Leistungsfähigkeit.

In einem Zeitraum von 10 Wochen betrug der Gewichtsszuwachs etwa 6 kg.

Im 6. Monat nach Immunisierungsbeginn erreichte seine körperliche Leistungsfähigkeit den im zeitlichen Rahmen der postoperativen Überlebenszeit erzielten Maximalwert.

Patient D war erstmals nach dem operativen Eingriff wieder in der Lage, selbstständig Spaziergänge ohne Begleitung zu unternehmen. Diese Periode der maximal erreichten Lebensqualität war für etwa 10 Wochen stabil.

Im Laufe der therapeutischen und posttherapeutischen Phase war bis dahin eine stetige Verbesserung der Mobilität erreicht worden.

Patient D und seine familiäre Umgebung berichteten über eine deutliche Steigerung der Lebensqualität im Vergleich zur Präimmunisierungsphase.

Ca. zum Zeitpunkt des 13. Untersuchungstermins, d.h. in der 31. Woche nach Immunisierungsbeginn verschlechterte sich der Antrieb des Patienten abrupt und deutlich. Es machte sich ein vermehrtes Schlafbedürfnis im Sinne einer beginnenden Somnolenz bemerkbar.

Patient D entwickelte eine Inkontinentia urinae, im weiteren Verlauf eine deutliche Einschränkung der koordinativen Leistungsfähigkeit und der Mobilität.

So konnte in der 34. Woche nach I.-Beginn ein Tumorrezidiv diagnostiziert werden: (s. nächste Seite)

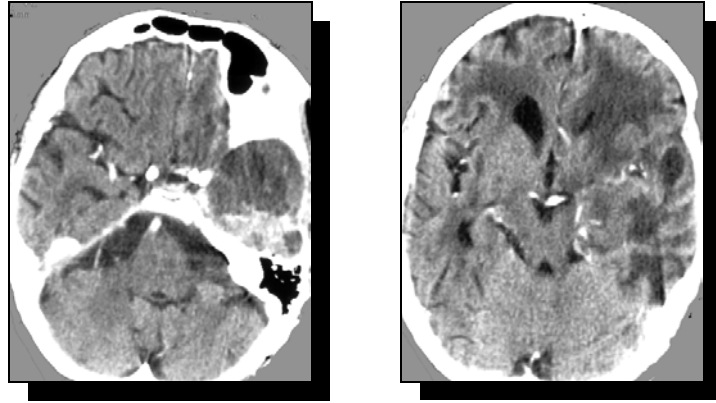
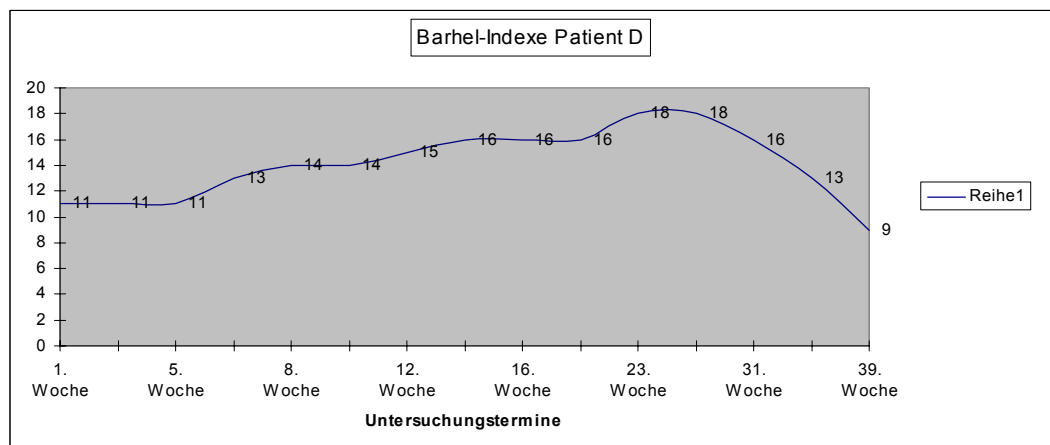


Abbildung 15 Patient D: Rezidivdiagnose 34. Woche nach Immunisierungsbeginn

Im Laufe der folgenden Wochen verschlechterte sich der Antrieb weiter bis zur vollständigen Einstellung von verbaler Kommunikation im Sinne einer stuporösen Antriebseinschränkung zwei Woche vor seinem Ableben.

In der 57. postoperativen Woche, der 40. nach Immunisierungsbeginn, verstarb der Patient

Abbildung 16 Patient D: Entwicklung des Barthel-Indexes



4.5 Patientin E

4.5.1 Kasuistik

Alter: 44 Jahre

Anamnese: Seit Juli 1993 leidet die Patientin unter langsam zunehmenden frontalen Kopfschmerzen. Sie klagt über Merkfähigkeitsstörungen und ein nicht genauer spezifizierbares Druckgefühl im Bereich des rechten Auges. Außerdem müsse sie den linken Fuß nachziehen.

Aufnahmebefund: Zur Aufnahme kommt eine 44-jährige Patientin in gutem Allgemein- und übermäßigem Ernährungszustand. Sie zeigt eine mäßiggradige Hemiparese links, Stauungspapillen beidseits, eine Facialisendastschwäche und beginnende Inkontinenz.

Bildgebende Diagnostik:

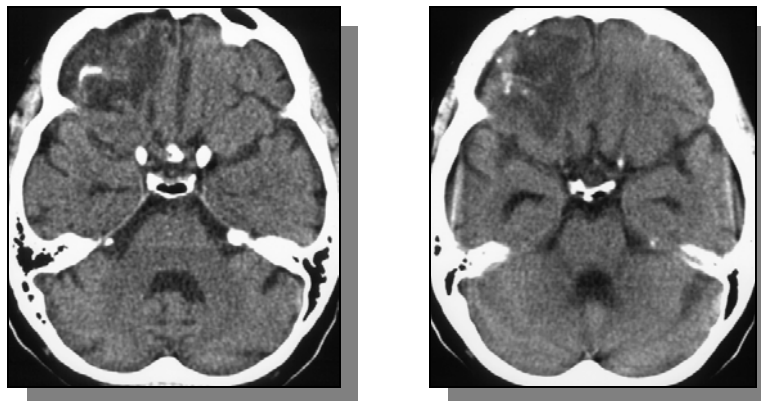


Abbildung 17 Patientin E: Erstdiagnose

Bildgebender Befund: Verdacht auf Oligodendrogliom III. Grades rechts frontal.

Durchmesser \varnothing : 6 cm

Primärtherapie: Subtotale Resektion am 05.10.1993. Im Anschluß Radiatio (60 Gy) mit begleitender Kortikoidtherapie

Histologisch gesicherte Diagnose: Oligodendrogliom WHO Grad III

Therapieverlauf: Entlassung mit persistierendem Kopfschmerz speziell beim Bücken und bei körperlicher Arbeit, keine Parese, keine Sensibilitätsstörungen. Ab Mitte 1995 zunehmende Antriebslosigkeit, gelegentlich Schwindel, unsicheres Gangbild. Nachweis eines ca. 2 x 2cm durchmessenden Tumorrezidivs. Erneute

chirurgische Intervention (subtotale Resektion) am 20.11.1995. In weiteren Verlauf Anlage eines lumboperitonealen Liquorshunts zur Drainage einer rezidivierten Liquorfistel.

Im Frühjahr 1996 beginnende Sehinderung auf dem rechten Auge „als senke sich ein Vorhang“ im Sinne einer rechtsseitigen Amaurose mit aufgehobener direkter Lichtreaktion rechts und Ausfall der indirekten Lichtreaktion links. Weiterhin lageunabhängiger Schwindel, jetzt mit Übelkeit und Erbrechen. Im Oktober 1996 erneute Klinikeinweisung.

Bildgebende Diagnostik:



Abbildung 18 Patientin E: Rezidivdiagnose. Befund vor Studienbeginn

Bildgebender Befund: rechtsfrontale Raumforderung, Durchmesser \varnothing : ca. 3,5 x 3,5cm mit Infiltration des Nervus opticus.

Therapie: Resektion der Tumormasse am 04.11.1996

Histologisch gesicherte Diagnose: Glioblastom WHO Grad IV

Beginn der Immunisierung: 23.12.1996

4.5.2 Klinischer Verlauf

Die Immunisierungsphase von Patientin E ist gekennzeichnet von einem persistierendem Antriebsverlust und einer zunehmenden Visusminderung, resultierend aus einer Tumordinfiltration des Nervus opticus.

Gegen Ende der Immunisierungsstaffel zeichnete sich eine Verbesserung der Schwindelsymptomatik ab. Ihr kraftloser Gang blieb davon unbeeinflusst. Subjektiv stellte Patientin E allerdings eine Verbesserung ihrer Lebensqualität fest.

Ca. 6 Wochen im Anschluß an die erste Vakzinierung stellt sich computertomografisch ein Rezidivwachstum dar.

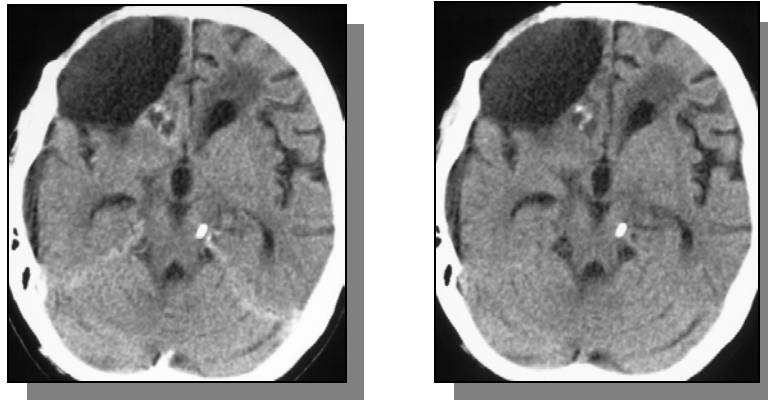


Abbildung 19 Patientin E: Rezidivbefund 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn

Etwa 6 Monate nach Immunisierungsbeginn bemerkte Patientin E eine schnell progrediente Schwäche des rechten Armes. Im CCT war eine deutliche Größenzunahme erkennbar.

Im darauffolgenden Monat kehrten die Schwindelgefühle zurück und führten zu einer starken Gangunsicherheit.

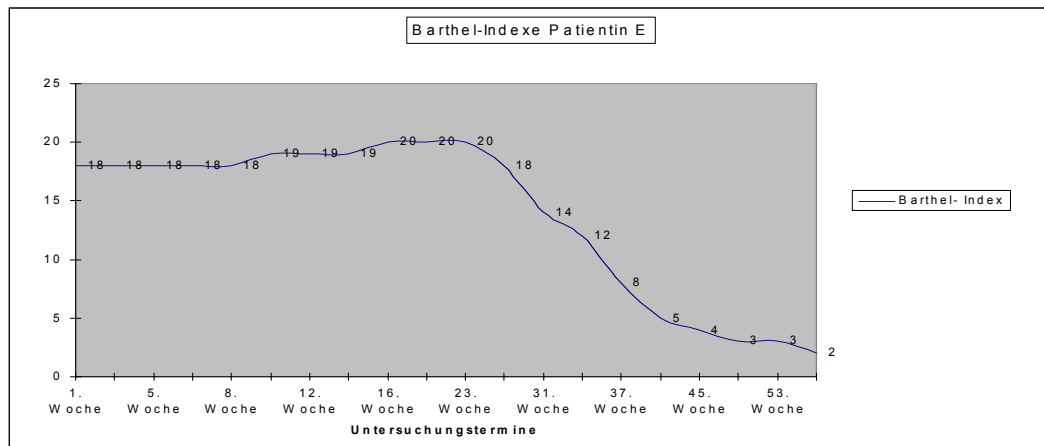
Es folgte die Ausbildung einer Inkontinentia urinae et alvi.

Der Ehegatte stellte eine massive Verschlechterung des Kurzzeitgedächtnisses fest. Patientin E sei oftmals sehr verwirrt.

Ca. 9 Monate nach Immunisierungsbeginn wurde die Patientin bettlägerig und war kaum noch in der Lage, das Bett zu verlassen.

12 Wochen später erfolgte die Anlage eines Blasenkatheters. Patientin E war nun auf Vollzeitpflege angewiesen. Die Kommunikation mit ihrer Umgebung beschränkte sich auf seltene kurze Unterhaltungen und wich bald einer stuporösen Antriebsstörung.

In der 272. Woche nach Primäroperation, der 102. nach I.-Beginn, verstarb Patientin E.

Abbildung 20 Patientin E: Entwicklung des Barthel-Indexes

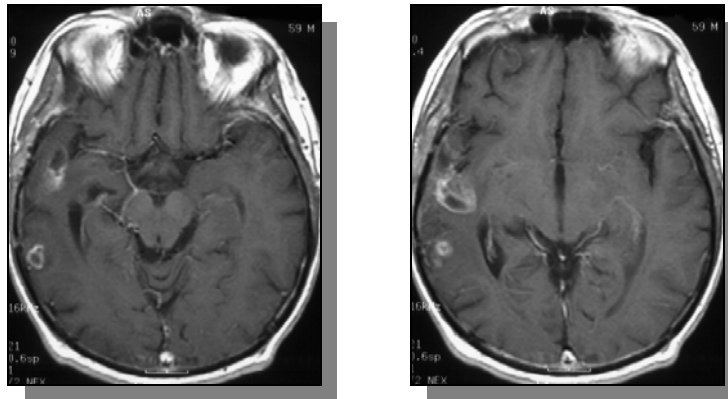
4.6 Patient F

4.6.1 Kasuistik

Alter: 60 Jahre

Anamnese: Am 28.05.1997 berichtet Patient F über seit Wochen bestehende stärkste rechtsbetonte Kopfschmerzen. Weiterhin klagt er über Schlafstörungen, eine zunehmende Vergeßlichkeit und Konzentrationsstörungen. Im Rahmen eines psychiatrischen Konsils wird ein in den letzten Wochen zunehmendes hirnorganisches Psychosyndrom diagnostiziert, wobei zuletzt ein abgeleitetes EEG mittelschwer allgemein verändert gewesen sei.

Aufnahmebefund: 60-jähriger Patient in altersentsprechendem Ernährungs- und Allgemeinzustand. Neurologisch lassen sich Stauungspapillen beidseits, beinbetonte Hemiparese links, symmetrisch lebhaftige Muskeleigenreflexe und eine läppi-sche Grundstimmung diagnostizieren.

Bildgebende Diagnostik:**Abbildung 21** Patient F: Erstdiagnose

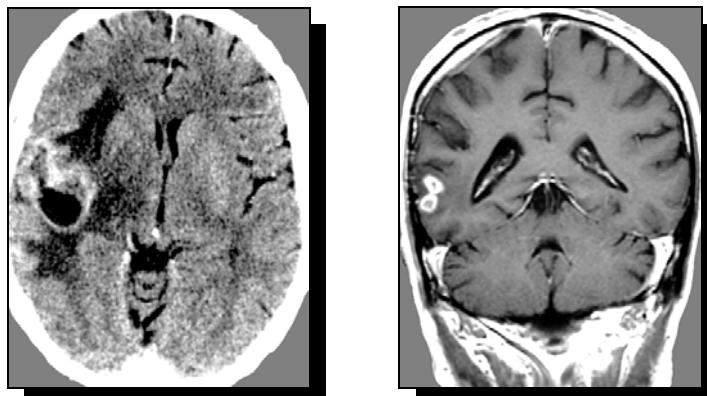
Bildgebender Befund: Verdacht auf cystisches Glioblastom beginnend temporo-polar bis temporo-medial. Durchmesser \varnothing : ca. 4 cm. Zwei Tumorendäste dorsal der Hauptzyste, zwei Zystenanteile temporal an der Oberfläche.

Primärtherapie: Mikrochirurgische Resektion der Tumormasse am 29.05.1997 mit anschließender Radiatio (60 Gy).

Histologisch gesicherte Diagnose: cystisches Glioblastom WHO Grad IV

Verlauf: Komplikationsloser postoperativer Verlauf mit Rückbildung der neurologischen Symptomatik und raschem Abklingen des erkrankungsbedingten Psychosyndroms.

Im Rahmen der radiologischen Kontrolluntersuchungen wird im November 1997 der Verdacht auf ein Rezidiv geäußert und im Februar 1998 computertomographisch und magnetresonanztomographisch konsolidiert.

**Abbildung 22** Patient F: Rezidivdiagnose. Ausgangsbefund vor Studienbeginn

Der Patient hatte im Vorfeld dieser letzten Untersuchung einen Grand Mal- Anfall erlitten, war jedoch ansonsten neurologisch nicht auffällig. Eine erneute mikrochirurgische Tumorresektion wurde am 11.02.1998 durchgeführt. Es folgte aufgrund der Vorbelastung des Patienten eine kombinierte Radiochemotherapie in Form der Applikation einer Strahlendosis entsprechend 36 Gy, begleitet von einer intravenösen Chemotherapie mittels Topotecan (in einer Dosierung von 0,5 mg/ qm, entsprechend 1,0 mg absolut), jeweils 1 Std. vor den einzelnen Bestrahlungen.

Beginn der Immunisierung: 20.05.1998

4.6.2 Klinischer Verlauf

Patient F zeigte postoperativ eine rasche Verbesserung seiner latenten Kopfschmerzsymptomatik, auch seine Leistungen bezüglich des Kurzzeitgedächtnisses besserten sich nach eigenen Angaben.

Die läppische Grundhaltung, die er zu Beginn der operativen Therapie präsentierte, wich schnell einem differenzierteren Verständnis der eigenen Erkrankung.

Im Rahmen der therapieplanmäßigen computertomographischen Untersuchungen zeigt sich in der 12. Woche nach Primärvakzinierung ein Rezidiv.

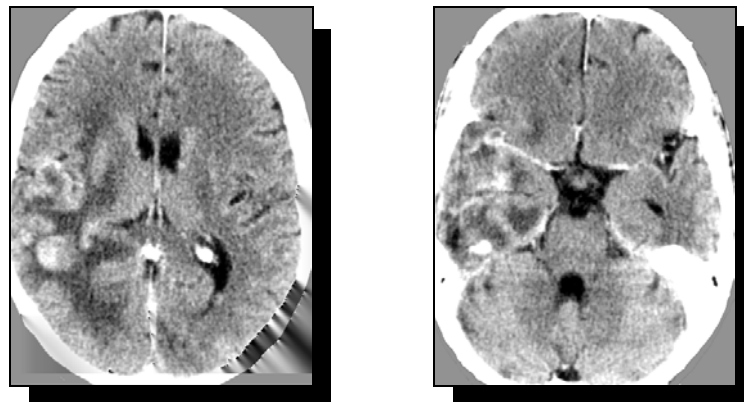


Abbildung 23 Patient F: Rezidivdiagnose 12 Wochen nach Immunisierungsbeginn

Um die 16. Woche nach Immunisierungsbeginn klagte er wiederholt über rechtsbetonte Kopfschmerzen. Im Gespräch fiel eine zunehmende Verwirrung des Patienten auf, die sich z.B. durch Wortwiederholungen bemerkbar machten.

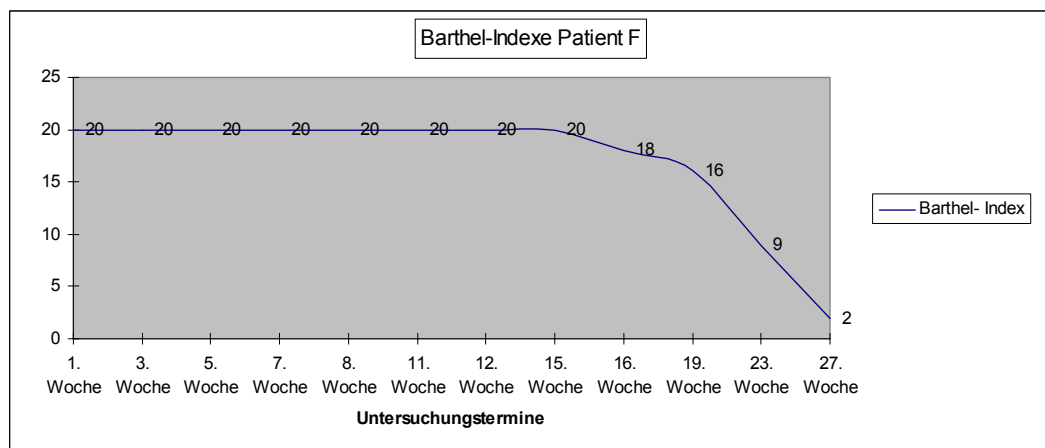
Etwa zwei Wochen später addierten sich ungerichtete Schwindelanfälle zur bestehenden Symptomatik.

Der Patient benötigte zunehmend Hilfe beim Ankleiden und in der täglichen Pflege.

Ca. 20 Wochen nach Immunisierungsbeginn war Patient F fast vollständig auf fremde Hilfe angewiesen. Er entwickelte eine Inkontinentia urinae, verließ aufgrund einer progredienten Mobilitätseinschränkung nur selten das Bett.

In der 25. Woche nach Immunisierungsbeginn, der 76. Woche nach dem ersten operativen Eingriff verstarb Patient F.

Abbildung 24 Patient F: Entwicklung des Barthel-Indexes



4.7 Patientin G

4.7.1 Kasuistik

Alter: 66 Jahre

Anamnese: Am 27.06.1996 stellt sich die Patientin vor mit einer bislang ca. 2-monatigen Beschwerdesymptomatik. Sie klagt über ein fast durchgängiges Unwohlsein und eine zunehmende Vergeßlichkeit, die vornehmlich das Kurzzeitgedächtnis betreffe. Weiterhin leide sie seit einigen Wochen an einem in immer kürzeren Intervallen auftretenden unspezifischen Wärmeempfinden, das einhergehe mit einem allgemeinen Schwächegefühl unter voller Wahrung des Bewußtseins. Anamnestisch lassen sich keine weiteren sensomotorischen Ausfälle in diesem Zusammenhang eruieren.

Aufnahmebefund: Bei Aufnahme erscheint die Patientin in allen Qualitäten orientiert, in gutem Ernährungs- und Allgemeinzustand. Es lassen sich außer der Störung im Kurzzeitgedächtnis keine neurologischen Defizite diagnostizieren. Die beschriebenen Wärmeempfindungen in Verbindung mit dem Schwächegefühl können als Symptome eines komplex partiellen Anfallsleidens gedeutet werden.

Bildgebende Diagnostik:



Abbildung 25 Patientin G: Erstdiagnose

Bildgebender Befund: große temporale Raumforderung mit perifokalem Ödem

Primärtherapie: Mikrochirurgische Resektion der Tumormasse mit konsekutiver Radiatio.

Histologisch gesicherte Diagnose eines Anaplastischen Astrozytoms WHO Grad III

Erste Immunisierung: 12.09.1996

4.7.2 Klinischer Verlauf

Patientin G verstarb am Tage nach der ersten Immunisierung. Als Ursache ihres Ablebens wird eine Lungenembolie vermutet, die nicht in ursächlichen Zusammenhang mit der Vakzinierung zu bringen ist. Eine Obduktion wurde von den Angehörigen abgelehnt.

5 Ergebnisse

5.1 Unerwünschte Medikamentenwirkungen

Zusammenfassend läßt sich für alle in die Studie integrierten Patienten sagen, daß keine unerwünschten Medikamentenwirkungen im Sinne der von der WHO für die Testung neuer Medikamente empfohlenen Richtwerte zur Bemessung akuter und subakuter Toxizität (siehe Anlage) festgestellt werden konnten.

So ergab sich kein Anhalt für eventuelle nephrotoxische Auswirkungen der Immuntherapie im Sinne von Kreatininerhöhungen, Protein- oder Hämaturien.

Elektrokardiografische Untersuchungen zeigten innerhalb des Untersuchungszeitraumes unveränderte Ergebnisse zum jeweiligen Vorbefund.

Es konnten darüber hinaus keine auf die Applikation des Vakzins zurückzuführenden Einflüsse der Behandlung auf das Blutbild beobachtet werden.

Temperaturmessungen zum Zeitpunkt der Vakzinierungen und jeweils eine Stunde im Anschluß an die Injektion ließen lediglich geringe Differenzen innerhalb eines möglichen Messfehlerintervalls und in allen Fällen unterhalb febriler Temperaturen erkennen.

Im besonderen wurden Nebenwirkungen in Form peripherer Polyneuropathien, wie dem Guillain- Barrè- Syndrom, nicht beobachtet.

Die Applikation des Konjugatvakzins war durchgängig gut verträglich und provozierte weder Übelkeit noch Erbrechen oder sonstige adverse Reaktionen, die zu einer negativen Beeinflussung des Befindens der behandelten Patienten hätten führen können.

5.2 Die Immunologische Antwort auf das Vakzin

In keinem der behandelten Patienten konnte eine meßbare Antikörperproduktion gegen den im Vakzin enthaltenen Gangliosidanteil provoziert werden.

Alle Patienten entwickelten hingegen Antikörpertiter im Bereich 1: 100.000 gegen die im Impfstoff integrierten Adjuvantien KLH und MPL-A.

Das zum Nachweis einer adäquaten T- Zellreaktion auf das Vakzin kontrollierte Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (Typ-IV-Reaktion) konnte in allen Fällen ab der zweiten Immunisierung beobachtet werden.

In der Umgebung der Einstichstelle entwickelten die immunisierten Patienten nach ca. 24 Stunden eine lokale indurierte Hautschwellung mit erythematöser Veränderung. Dieses Phänomen ließ sich auch Tage nach Entstehung noch beobachten, zum Teil bis zu einer Woche.

Abbildung 26 Erythematöse Induration um die Einstichstelle (rote Markierung)



5.3 Überlebenszeiten / Tumorkontrolle

Die Abbildungen auf den folgenden Seiten geben eine Übersicht über die erzielten Überlebenszeiten. Angaben über rezidivfreie Intervalle und Perioden der Tumorkontrolle im Anschluß an die der Immunisierung vorangegangene Operation ergänzen die Darstellungen.

Abbildung 27 Überlebenszeiten

Patient	Zeit / Wochen bis zum Auftreten eines Rezidivs **	Zeit / Wochen der erreichten Tumorkontrolle (s.u. *)	Überlebenszeit / Wochen nach Erstdiagnose	Überlebenszeit / Wochen nach Immun.-beginn
Patientin A	14	-	116	21
Patient B	32	-	66	54
Patient C	29	26	98	91
Patient D	34	-	57	40
Patientin E	6	-	272	102
Patient F	12	-	76	25
Patientin G	-	-	11	0

*Als Tumorkontrolle wird hierbei die computertomografisch gesicherte Wachstumsstagnation des Rezidivs über die Distanz mindestens eines CT-Intervalls gewertet.

**aufgeführt sind nur die ersten Rezidive *nach Immunisierungsbeginn*, nicht jedoch diejenigen nach Reoperation im Rahmen der Studie.

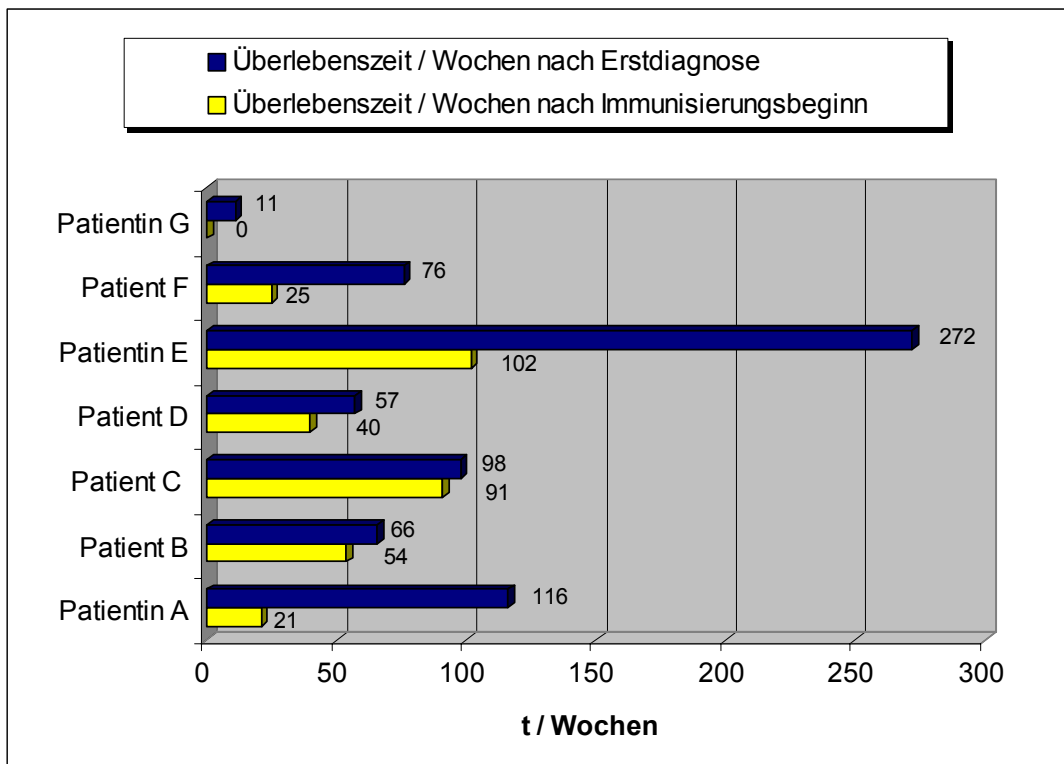


Abbildung 28 Überlebenszeiten in Wochen nach Erstdiagnose (dunkel) und nach Immunisierungsbeginn (hell)

Die aus den aufgeführten Daten errechenbaren Mittelwerte und Mediane stellen sich wie folgt dar:

Abbildung 29 *Mediane Überlebenszeiten*

Mediane Überlebenszeit <i>nach Erstdiagnose</i>	76 Wochen
Mediane Überlebenszeit <i>nach Immunisierungsbeginn</i>	40 Wochen

Im Anschluß an die Erstdiagnosestellung liegt der Überlebensmedian bei 76 Wochen, d.h. die Hälfte der behandelten Patienten überlebte nach Entdeckung der Erkrankung 76 Wochen oder länger.

Nach Immunisierungsbeginn liegt der Überlebensmedian bei 40 Wochen.

Diese 40 Wochen, ca. 10 Monate, repräsentieren also den Zeitraum, den die Hälfte der adjuvant therapierten Patienten *nach der ersten Vakzinierung* überlebte.

5.4 Stabilität der postoperativen Phase

Zur besseren Differenzierung der klinischen Entwicklung aller untersuchten Patienten bietet sich die Betrachtung der Latenzen zwischen initialer Immunisierung und Verschlechterung des postoperativ und im Rahmen der Vakzinierung erreichten klinischen Status an. Als Maß hierfür soll die Zeitspanne bis zum Auftreten des Rezidivs verwendet werden (Abbildung 30 *Latenzen zwischen initialer Vakzinierung und Auftreten des ersten Rezidivs*).

Auf diese Weise läßt sich auch der individuelle Verlauf im Anschluß an die Immunisierung beleuchten. Anhand der durch die Erhebung des Barthel-Indexes gewonnenen Daten folgt die tabellarische Übersicht der Dauer stabiler BI-Werte stellvertretend als Maß für die zeitliche Spanne einer Nichteinflußnahme eventueller krankheitsspezifischer Einschränkungen im Verlauf der protokollarischen Überwachung (Abbildung 31 *Zeitspannen stabiler Barthel-Index-Werte*).

5.4.1 Latenz Initialvakzinierung - Rezidiv

Latenzen zwischen Immunisierungsbeginn und computertomographischem Nachweis eines Rezidivs:

Abbildung 30 Latenzen zwischen initialer Vakzinierung und Auftreten des ersten Rezidivs

Patient	Zeitspanne 1. Vakzinierung – Rezidiv in Wochen
Patientin A	14
Patient B	32
Patient C	29
Patient D	34
Patientin E	6
Patient F	12

Die Abbildung muß als korrigiert bezeichnet werden. Aufgrund des frühen Ablebens von Patientin G kommt dieser Verlauf hier nicht zur Darstellung. Sie verstarb, wie oben erwähnt, am ersten Tag nach Immunisierung. Daher kann ein Rezidivwachstum ausgeschlossen werden. Sie ist deshalb auch aus der folgenden Berechnung des Medians ausgeschlossen:

Aus den dargestellten Daten läßt sich der Median der zeitlichen Latenz zwischen initialer Vakzinierung und dem Auftreten eines Rezidivs als Dauer von **21,5 Wochen** berechnen.

5.4.2 Stabilität des Barthel-Indexes

Stabilität der erhobenen Barthel-Index-Werte (Immunisierungsbeginn bis zum Nachweis einer negativen Entwicklung)

Abbildung 31 Zeitspannen stabiler Barthel-Index-Werte

Patient	Stabilität der Werte in Wochen
Patientin A	8
Patient B	35
Patient C	51
Patient D	27
Patientin E	23
Patient F	15

Auch hier ist die Darstellung aus o.g. Gründen korrigiert.

Die aus der Erhebung des Barthel-Indexes gewonnen Informationen demonstrieren eine im Median **25 Wochen** dauernde Stabilität der Lebenssituation („Aktivitäten des täglichen Lebens“) nach Immunisierungsbeginn.

5.5 Ergebnisse der Lymphozytensubsetuntersuchungen

5.5.1 T-Zellen

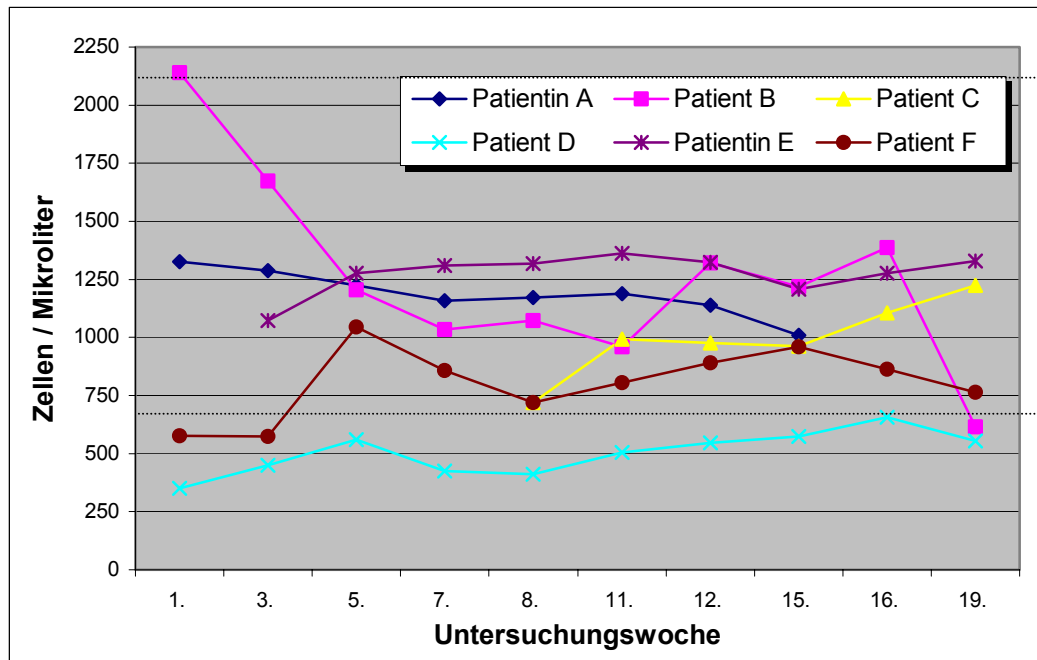


Abbildung 32 Individuelle T-Lymphozytenzahlen im zeitlichen Verlauf der Studie

Erklärung:

- Die Angaben der T-Lymphozytenzahlen (Größenachse-Y) in Abbildung verstehen sich als Zellzahlen / μl Blut.
- Die Zeitachse (X) enthält die Abfolge der Untersuchungstermine in Wochen.
- Der T-Zell-Referenzbereich liegt im hiesigen hämatologischen Untersuchungslabor zwischen 720 – 2190 T-Zellen pro Mikroliter Blut (gestrichelte Linien).
- Demnach liegt die T-Zellpopulation von *Patient D* numerisch durchgängig unter dem Referenzbereich.
- Die T-Lymphozytenzahlen der untersuchten Patienten bewegen sich innerhalb des Untersuchungsintervalls im unteren Normbereich. Sie erfahren keine signifikante Beeinflussung.

5.5.2 Natürliche Killerzellen

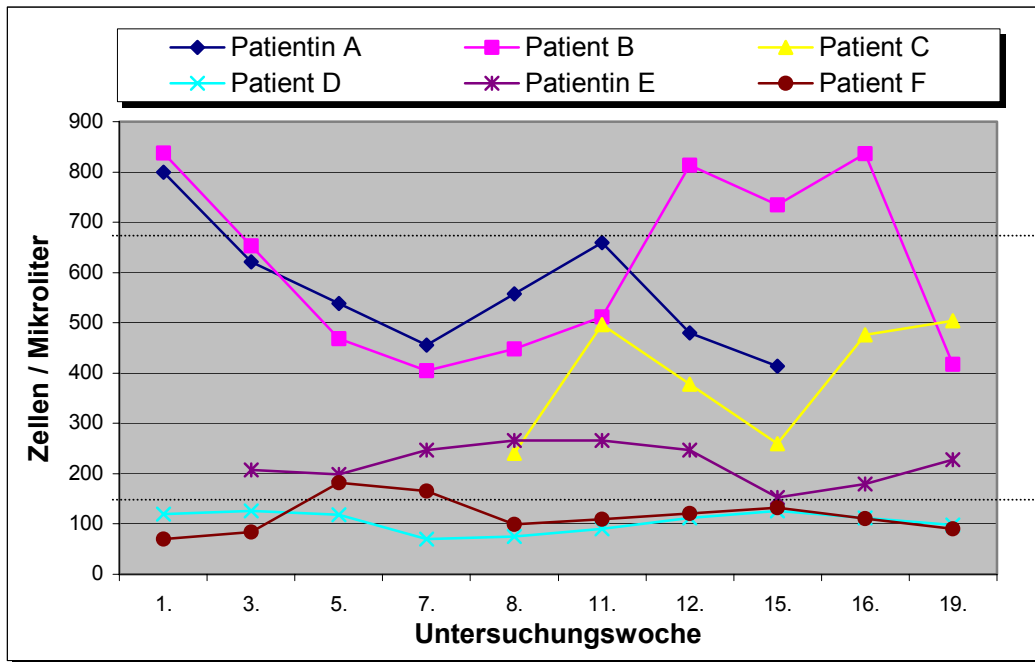


Abbildung 33 Individuelle NK-Zellzahlen im zeitlichen Verlauf der Studie

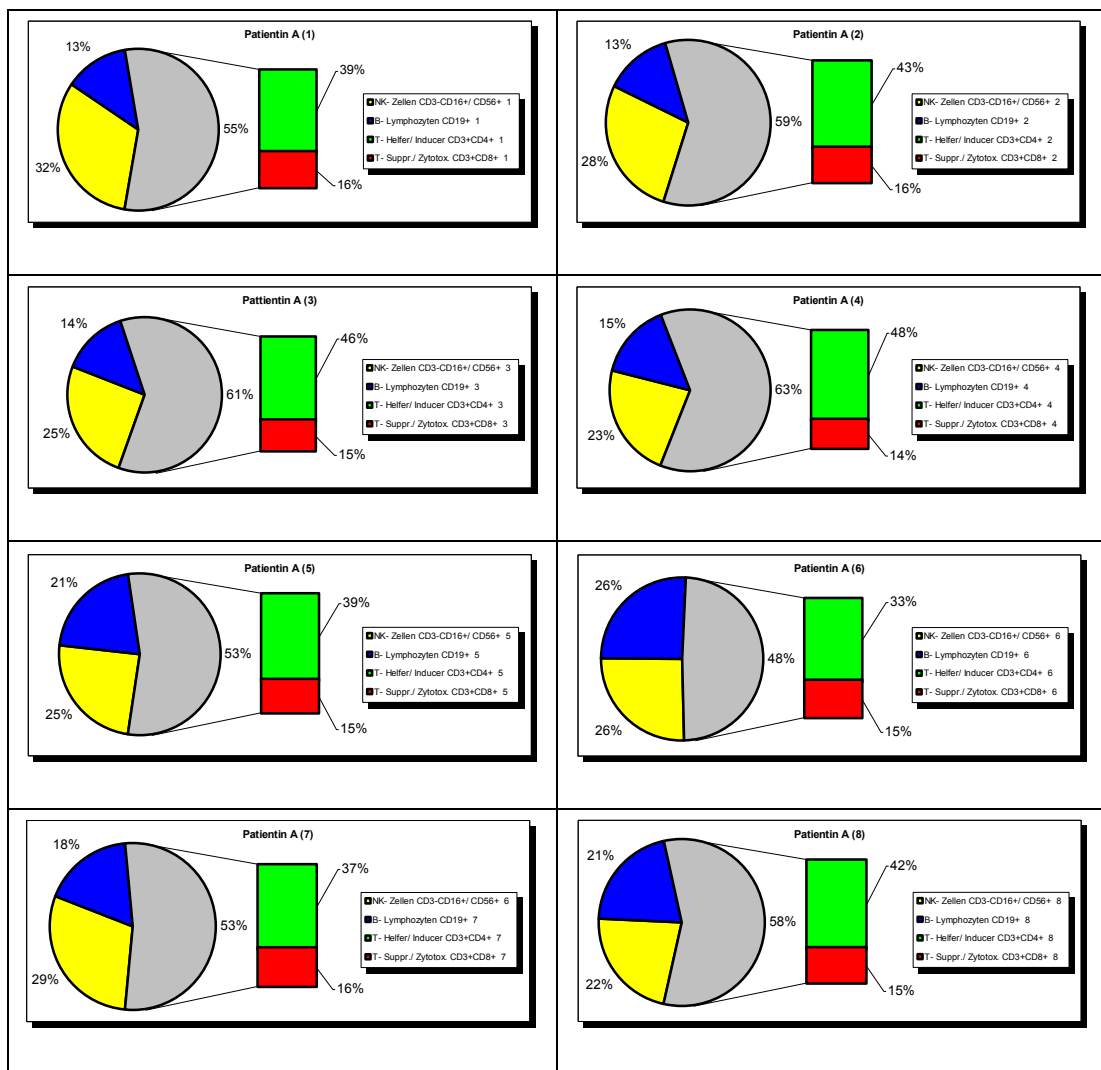
Erklärung:

- Die Angaben der NK-Zellzahlen (Größenachse-Y) in Abbildung verstehen sich als Zellzahlen / μl Blut.
- Die Zeitachse (X) enthält die Abfolge der Untersuchungstermine in Wochen
- Der NK-Zell-Referenzbereich des hiesigen hämatologischen Untersuchungs-labors liegt zwischen 140 – 670 Zellen pro Mikroliter Blut (gestrichelte Linien).
- Die NK-Zellpopulation von **Patient D** bewegt sich über den gesamten Untersuchungszeitraum unter der Normbereichsgrenze.
- Die NK-Zellzahlen von **Patient F** verhalten sich numerisch ähnlich unter-durchschnittlich, erfahren jedoch etwa um den 3. Untersuchungstermin eine leichte Anhebung.
- Ein leichter passagerer Anstieg der Populationen Natürlicher Killerzellen ist auch bei den übrigen Patienten zu verzeichnen. Er findet jeweils etwa gegen Mitte der Untersuchungsintervalls seinen Anfang. Die Steigerungen bewegen sich in den Grenzen des Referenzbereichs.

5.5.3 Relative Verteilung der Abwehrcellen

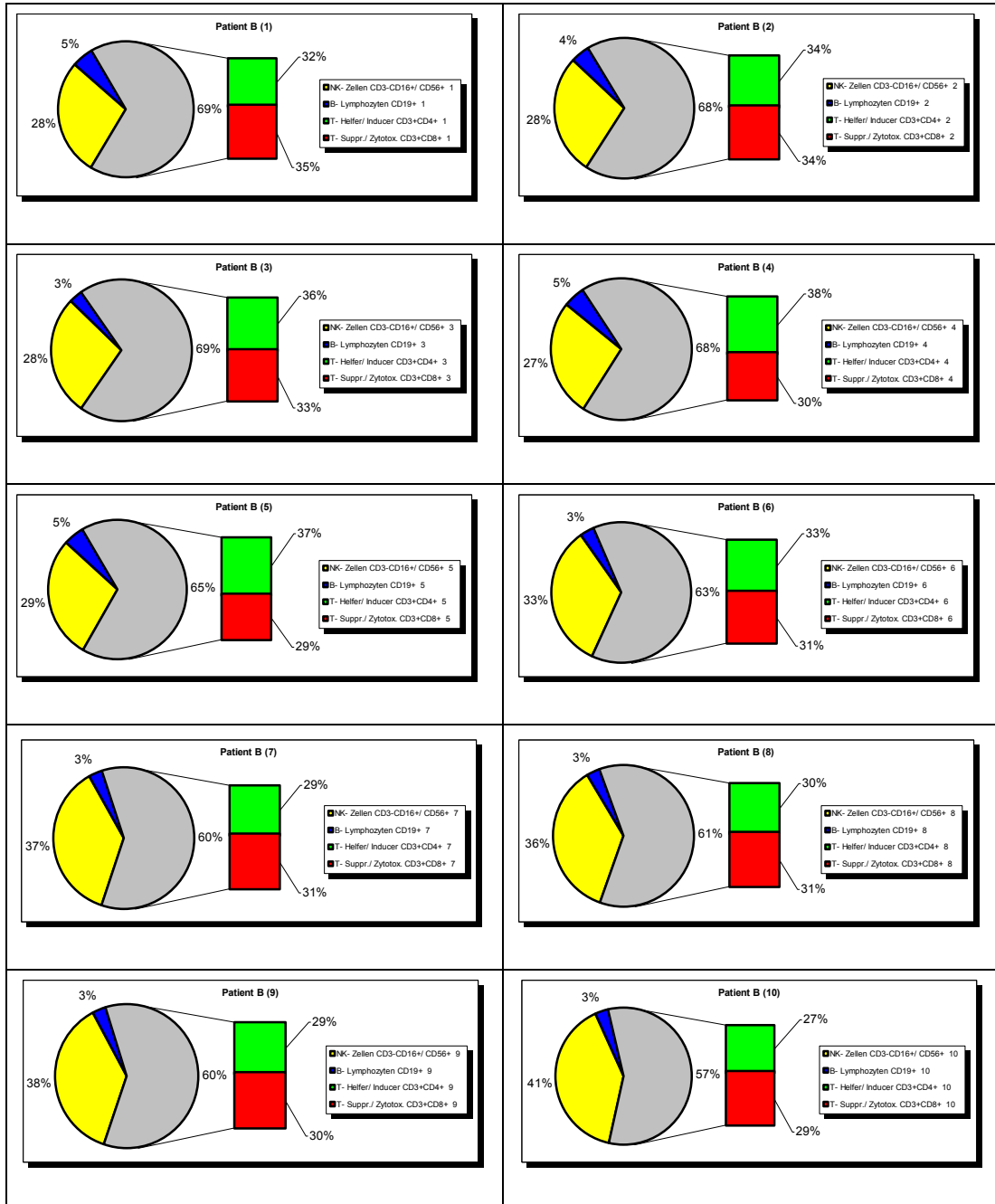
5.5.3.1 Patientin A

Abbildung 34 Patientin A : Relative Verteilung der Abwehrcellen



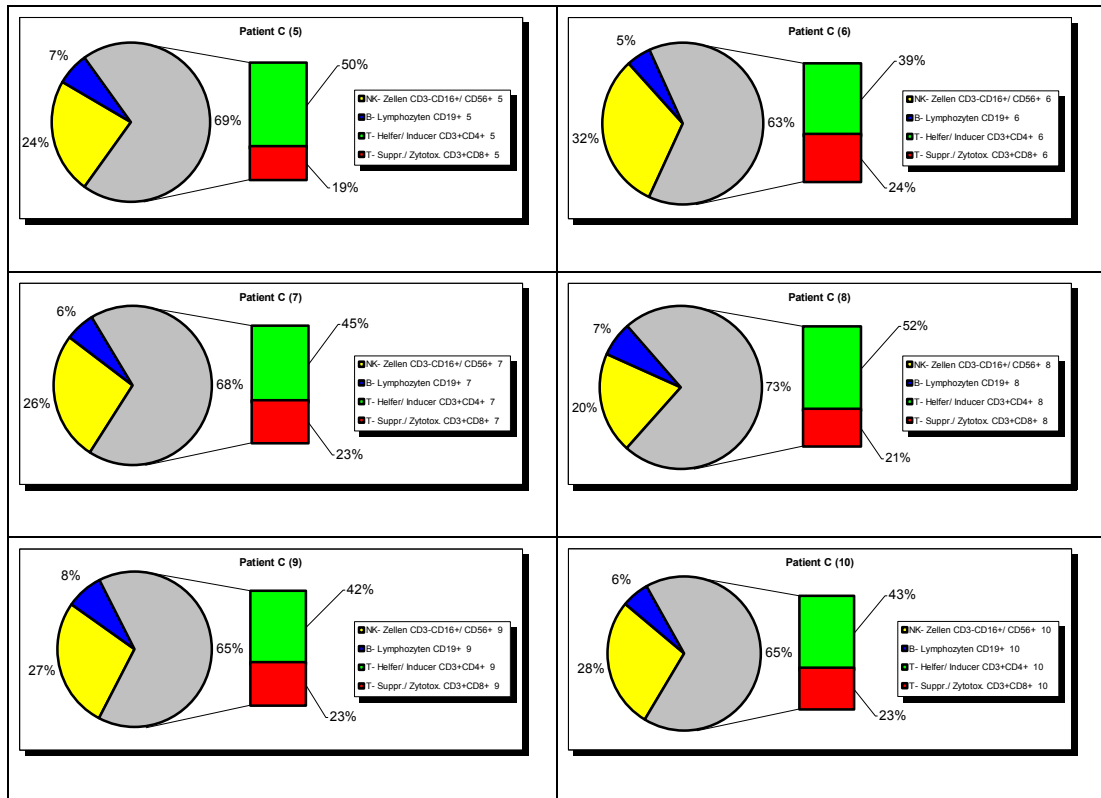
5.5.3.2 Patient B

Abbildung 35 Patient B : Relative Verteilung der Abwehrzellen



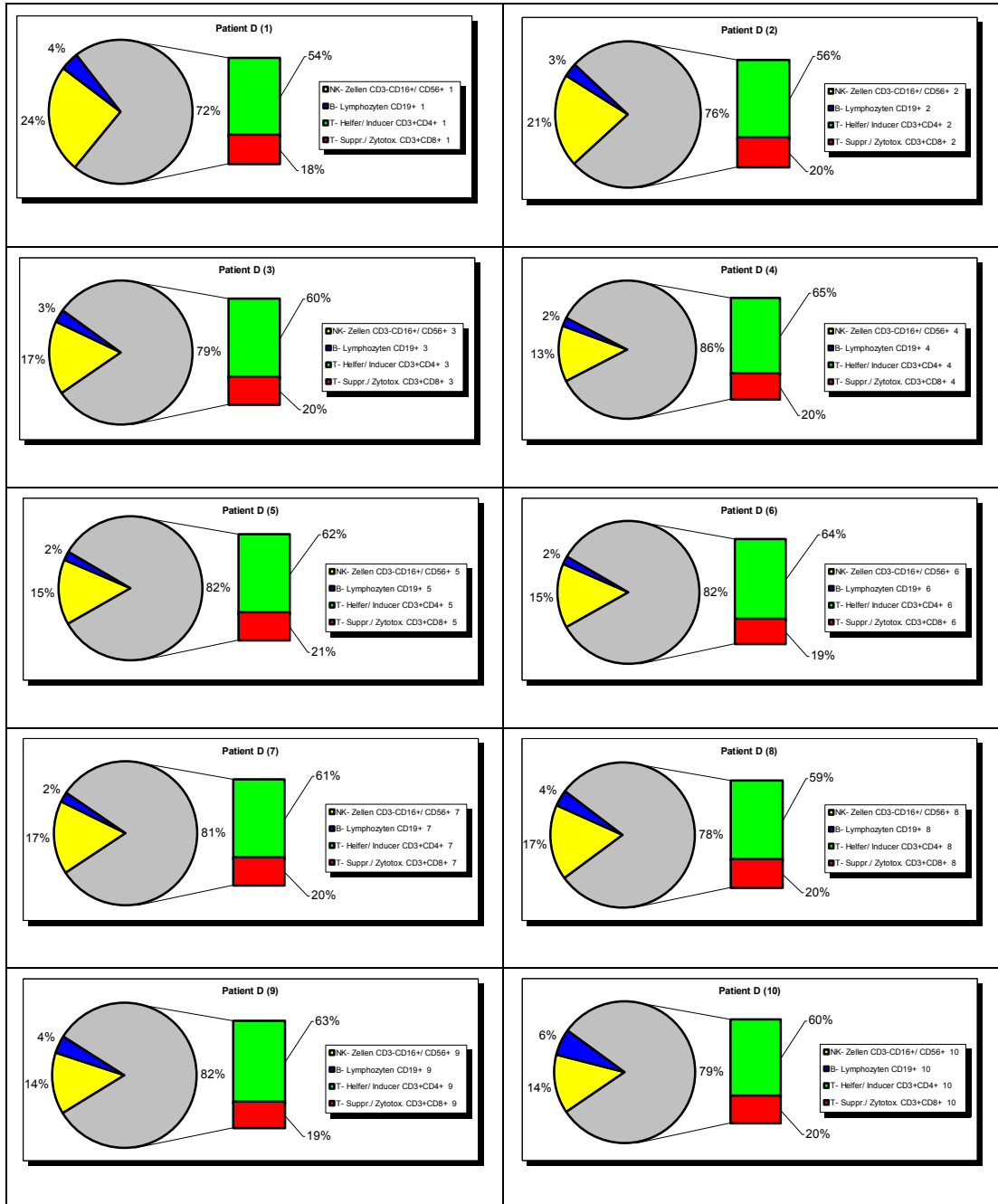
5.5.3.3 Patient C

Abbildung 36 Patient C : Relative Verteilung der Abwehrzellen



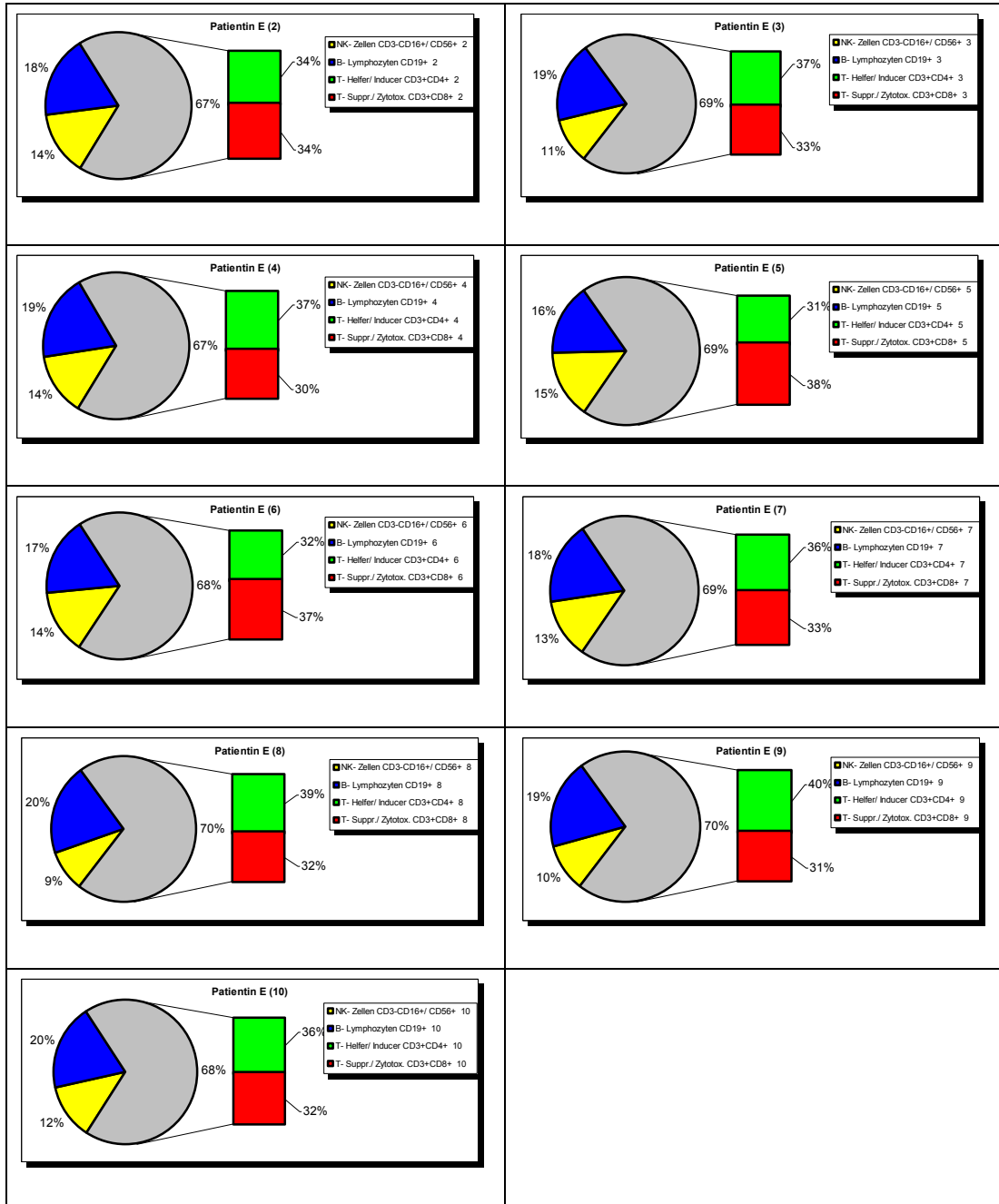
5.5.3.4 Patient D

Abbildung 37 Patient D : Relative Verteilung der Abwehrzellen



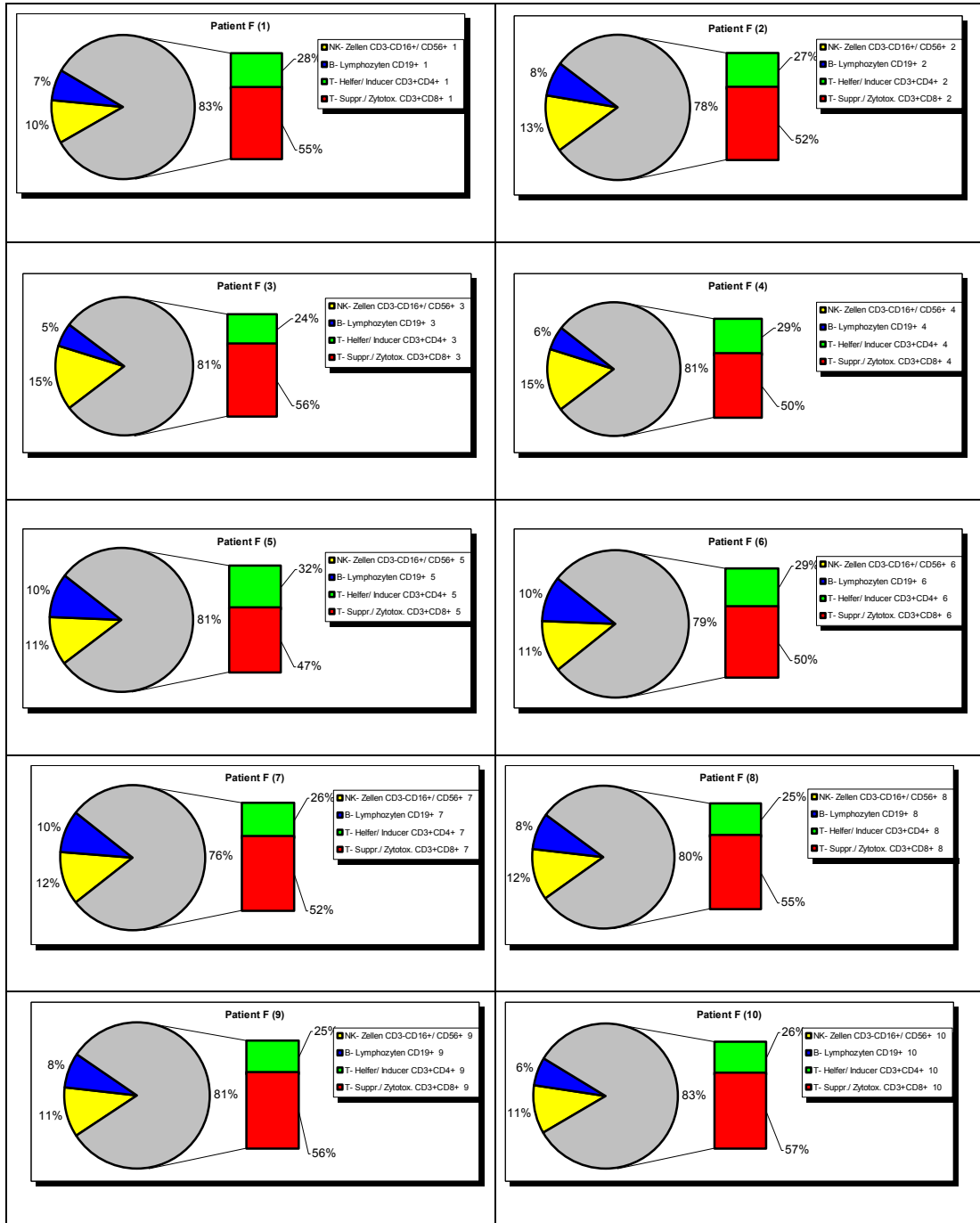
5.5.3.5 Patientin E

Abbildung 38 Patientin E: Relative Verteilung der Abwehrcellen



5.5.3.6 Patient F

Abbildung 39 Patient F: Relative Verteilung der Abwehrzellen



5.5.4 Zusammenhänge zwischen T-Zellzahlen und Überlebenszeit

Um Zusammenhänge zwischen mittleren T-Zellzahlen und Überlebenszeiten erkennen und später hinreichend diskutieren zu können, muß eine solche potentielle Korrelation unter zwei verschiedenen Perspektiven betrachtet werden:

1. Scatterdiagramm zur Darstellung mittlerer T-Zellzahlen im Untersuchungszeitraum im Verhältnis zur Überlebenszeit *nach Immunisierungsbeginn*
2. Scatterdiagramm zur Darstellung mittlerer T-Zellzahlen im Untersuchungszeitraum im Verhältnis zur ÜLZ *nach Erstdiagnosestellung*

Abbildung 40 demonstriert die unter 1. genannte Perspektive:

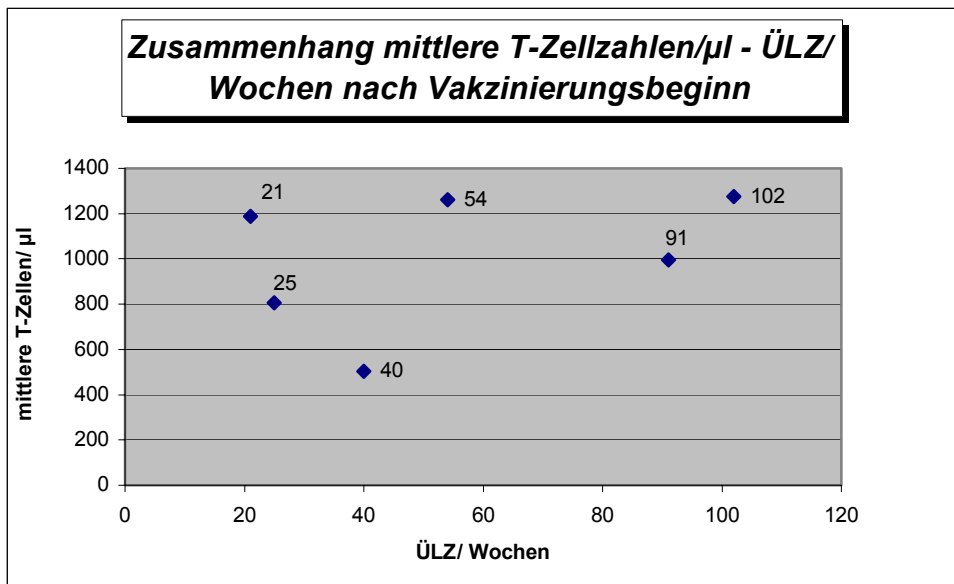


Abbildung 40 Korrelation mittlerer T-Zellzahlen zu individuellen Überlebenszeiten in Wochen nach Vakzinierungsbeginn

In **Abbildung 41** ist der Zusammenhang zwischen mittleren T-Zellzahlen im Untersuchungszeitraum zu den Überlebenszeiten nach Erstdiagnosestellung dargestellt:

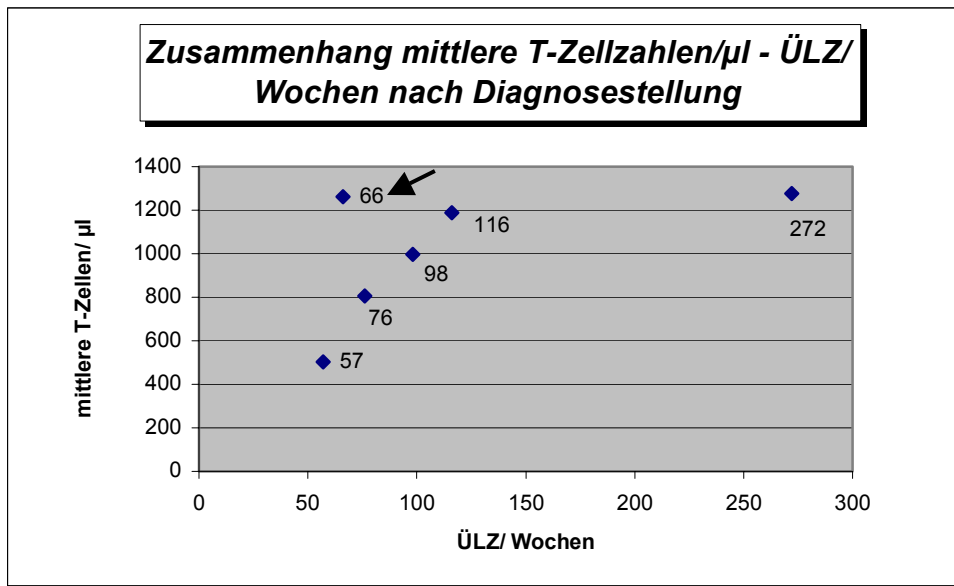


Abbildung 41 Korrelation mittlerer T-Zellzahlen mit individuellen Überlebenszeiten in Wochen nach Diagnosestellung

Um Art und Grad der Zusammenhänge weiter zu quantifizieren, empfiehlt sich die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearsons Produkt-Moment-Korrelation (147).

Eine solche Korrelation von

1. mittleren T-Zellzahlen und ÜLZ **nach Vakzinierungsbeginn** läßt keinerlei signifikante Zusammenhänge vermuten. Der Korrelationskoeffizient r liegt lediglich bei $r = 0,37$ und ist nach den üblichen Vertrauensgrenzen als nicht signifikant zu werten.

2. Im Verhältnis mittlerer T-Zellzahlen zur Überlebenszeit **nach Diagnosestellung** scheint hingegen ein funktionaler Zusammenhang zu bestehen, der auch durch den wegen des geringen Stichprobenumfanges nach Olkin und Pratt (113) korrigierten Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten von 0,60 nahegelegt wird.

So scheint im Verhältnis mittlerer T-Zellzahlen zur Überlebenszeit nach Diagnosestellung in Wochen, abgesehen von einem „Ausreißer“ (siehe Pfeil), eine lineare Abhängigkeit zu bestehen. Die niedrige Fallzahl von $n = 6$ Patienten erlaubt jedoch noch keine eindeutigen Aussagen über die Signifikanz dieser Beobachtung. Dennoch: Bei 5 von 6 behandelten Patienten gingen höhere durchschnittliche T-

Zellzahlen im Untersuchungszeitraum mit jeweils längeren Überlebenszeiten insgesamt einher.

6 *Diskussion*

Ziel der Phase-1-Studie war die Beurteilung der Verträglichkeit des applizierten Gangliosidkonjugatvakzins und der Nachweis von Antigangliosid-Antikörpern.

In der Entwicklung einer adjuvanten Immuntherapie zur Behandlung maligner Neoplasien sollten im Anschluß an den tierexperimentellen Wirkungsnachweis und vor der klinischen Beurteilung der angestrebten tumorizidalen Wirkung die grundlegenden Voraussetzungen auf dem Weg zum Heilerfolg überprüft werden.

An erster Stelle stand daher die Testung der Anwendbarkeit des verwendeten Vakzins in Form eines regelmäßigen Toxizitätsscreenings nach Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation WHO.

Ein nachweisbarer Einfluß auf die verwendete Stellgröße des manipulierten Organismus, das Immunsystem, ist von ebenso essentieller Bedeutung. Als Meßwerkzeuge kamen Untersuchungen von Serum und Liquor cerebrospinalis zum Einsatz.

6.1 *Verträglichkeit der Therapie*

Im Rahmen von Gangliosidvakzinierungsstudien zur Therapie von Krebserkrankungen wird gelegentlich über adverse Reaktionen bei der Applikation der Konjugate berichtet. Livingston, Adluri et al. beschreiben in der klinischen Evaluation eines GM2-KLH/ Qs21 – Vakzins das Auftreten von gelegentlichem Fieber, Myalgien sowie Übelkeit und Erbrechen (31).

In der Anwendung des in der vorliegenden Studie untersuchten Impfstoffes konnten diese oder ähnliche Nebenwirkungen nicht beobachtet werden.

Das Vakzin war in allen Fällen sehr gut verträglich und hatte auf die im von der WHO empfohlenen Toxizitätsscreening regelmäßig kontrollierten Untersuchungsparameter keinen nennenswerten, respektive negativen Einfluß.

6.2 Auswahl des Antigens

Ganglioside stellen als Konstituenten der äußeren Zellmembran und mit ihrem dem Extrazellularraum zugewandten Kohlenhydratanteil eine potentielle antigene Zielstruktur für die Anwendung immunologischer Interventionen dar.

In vorangegangenen Immunisierungsversuchen verschiedener Forschungsgruppen konnten Ganglioside diese Hoffnung bereits bestätigen und präsentierten sich als potente Antigene für passive sowie aktive Vakzinierungsstrategien (46,62, 71,72,75,76,79,125).

Gangliosidantikörper sind in der Lage, Funktionen wie Komplement-mediierte Zytotoxizität, Opsonifikation oder antikörperabhängige zellmedierte Zytotoxizität zu vermitteln (46,62).

Beobachtungen in der immuntherapeutischen Behandlung des malignen Melanoms und anderer Tumore neuroektodermalen Ursprungs schufen ebenso wie tierexperimentelle Studien der hiesigen Gruppe (52,53) die grundlegenden Voraussetzungen zur Durchführung dieser Studie.

6.3 Antigangliosid-Antikörperproduktion und ihr Einfluß auf den Krankheitsverlauf

Das Immunsystem von Melanompatienten produziert in auffälliger Häufigkeit monoklonale Antikörper mit einer Spezifität für Ganglioside (20,141). Solche Antigangliosidantikörper sind in der Lage, Tumorzellen, die Gangliosidantigene tragen, in Gegenwart von Komplement zu lysieren (92,135).

Grundlage der vorliegenden Untersuchung ist die Beobachtung, daß in der Therapie neuroektodermaler Tumoren ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten erhöhter Antigangliosidantikörpertiter im Rahmen einer Immunisierung und einer verbesserten Prognose hinsichtlich Rezidivfreiheit und Überlebenszeit zu existieren scheint (75,79).

Maligne intrakranielle astrozytäre Tumore exprimieren Ganglioside in tumortypischer Konstellation (13,125) und empfehlen sich daher für die Anwendung einer immunologischen Intervention.

6.3 Antigangliosid-Antikörperproduktion und ihr Einfluß auf den Krankheits-6–74 verlauf

Primär stand demnach die Induktion einer Antigangliosid-Antikörperproduktion im Vordergrund. Im Rahmen von Vakzinierungsstudien war, wie oben erwähnt, die Generation entsprechender Antikörpertiter bereits gelungen (71,76).

Erstmals demonstriert wurde der Erfolg in der Anwendung eines halbsynthetischen Gangliosidkonjugatvakzins in Vorarbeiten der neurochirurgischen Arbeitsgruppe um R. Jennemann, B.L. Bauer, H. Wiegandt et al. (53).

In diesen Untersuchungen konnte die Induktion einer Antigangliosid - Antikörperproduktion nachgewiesen und in ätiologisch-kausale Relation zu der direkten KLH - vermittelten Präsentation des Gangliosids gebracht werden. Die erzeugten Antikörpertiter setzten sich zusammen aus Konstituenten der Immunglobulinklassen IgG und IgM, erkannten aber außer den nichtderivatisierten Ganglioside der entsprechenden Vakzine auch strukturell ähnliche.

Eine weitere Verbesserung der Wirksamkeit von Konjugatvakzinen erzielten Jennemann et al. durch die chemische Kopplung mit dem Coadjuvans MPL-A. Diese Verbindung resultierte in einer, bereits von Ravindranath beschriebenen (103), Verstärkung der humoralen Immunantwort und einer signifikanten Senkung der Kreuzreaktivität (52).

Bei den 7 behandelten Patienten der vorliegenden Untersuchung konnten weder im Serum, noch im Liquor meßbare Antigangliosidantikörpertiter festgestellt werden.

Antikörper gegen das Carrier-Protein KLH hingegen erreichten Titer von reziproken Werten um 100.000, sie waren Konstituenten des Immunglobulinisotyps M und konstant nachweisbar.

In der Höhe der Anti-KLH-Antikörpertiter mag eine der potentiellen Ursachen für ein Ausbleiben meßbarer Anti-GSL-Antikörpertiter liegen. Ähnliche Ergebnisse waren auch in der Entwicklung von Konjugatimpfstoffen zur Therapie des malignen Melanoms zu verzeichnen. In einer Vakzinierungsstudie von Kitamura, Livingston et al. (62), deren Substrat ein Vakzin aus GM2-KLH/ Qs21 darstellte, zeigten Patienten mit transienten oder nicht steigerbaren Antikörpertitern gegen die Gangliosidkomponente vergleichbar hohe IgM-Titer gegen KLH. Die gemessenen Werte lagen um reziproke Werte von 10.000, also einem Zehntel der in der vorliegenden Studie demonstrierten Ak-Titer.

Möglicherweise supprimieren die hohen Anti-KLH-AK-Titer im Sinne eines negativen Feedbacks eine effektive Anti-GSL-AK-Produktion. Das Immunsystem wäre demnach mit der Antikörperproduktion gegen das immunologische Carrier-Molekül in dem Maße ausgelastet, daß eine zusätzliche Antwort auf das im Vakzin integrierte Gangliosid nicht oder nur unterhalb des Meßbereichs provoziert wird (73).

Die intendierte Funktion des Keyhole Limpet Hemocyanins bezog sich in der Verwendung im Vakzin auf die Modifikation der Immunantwort von einer T-Zell-unabhängigen zu einer Einbeziehung der T-Zell-vermittelten Abwehrstrategien. In erster Linie wäre die T-Helferzell-vermittelte Umschaltung des Immunglobulinsotyps von IgM auf das besser membrangängige und zur Vermittlung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität befähigte IgG zu nennen.

Eine Einbeziehung des T-Zellkompartimentes war beabsichtigt, im Sinne einer meßbaren Klassenwechselmediation allerdings fehlgeschlagen.

6.4 Zelluläre Immunität

Die zellmedierte Immunität gilt bei Patienten mit malignen primären intrakraniellen Tumoren allgemein als supprimiert (4,17,23,137,140).

6.4.1 T-Zellstatus

Gesamtlymphozytenzahlen sowie speziell Populationen zirkulierender T-Lymphozyten bewegen sich in Subsetanalysen numerisch in der Regel am unteren Rand der Referenzbereiche (17,81).

Die Ergebnisse der aktuellen Evaluation lassen trotz der geringen Patientenzahl eine ähnliche Tendenz zur Lymphozytopenie erkennen. Im Zeitraum der klinischen Untersuchungen zeigten alle untersuchten Patienten T-Lymphozytenpopulationen am Rande, bzw. unterhalb der numerischen Referenzwerte.

Einige Forschungsgruppen betonen darüber hinaus eine ausgesprochene Depletion im T-Helferzell-Kompartiment (9,23,139). Bei nur einem der im Rahmen der vorliegenden Studie behandelten Patienten konnte dieses Phänomen beobachtet werden (Patient F). Über die gesamte Zeit des Behandlungsintervalls zeigen die Er-

gebnisse der Lymphozytensubsetuntersuchungen hierbei eine deutliche Verschiebung der T-Zellkonstituenten zugunsten der Suppressorzellen.

Die übrigen Probanden demonstrierten innerhalb des Immunisierungszeitraumes ein relativ konstantes Verhältnis von T-Helfer- zu Suppressorzellen zugunsten der T-Helferlymphozyten.

Im Verhältnis mittlerer T-Zellzahlen zur Überlebenszeit in Wochen nach Diagnosestellung läßt sich ein Zusammenhang vermuten. Die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten erlaubt zwar naturgemäß keine Aussage über eventuelle kausale Zusammenhänge. Die Aussicht auf eine mögliche prognostische Einschätzung der Überlebenszeit nach Werten mittlerer T-Zellzahlen wäre jedoch nach den in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen näher zu untersuchen (18).

Der Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient legt mit einem wegen des geringen Stichprobenumfanges nach Olkin und Pratt korrigierten Wert von $r = 0,6$ die Existenz einer linearen Abhängigkeit nahe.

Im Zusammenhang mit supprimierten T-Helferzellzahlen und -funktionen bei malignem Gliom wurde vielfach von einer reduzierten oder aufgehobenen immunologischen Reaktivität vom verzögerten Typ (IV) berichtet (86).

Alle im Verlauf dieser Studie immunisierten Patienten zeigten allerdings positive Hautreaktionen im Sinne von Typ-IV-Immunreaktionen. Ab der zweiten Immunisierung demonstrierten sie um die jeweils wechselnde Injektionsstelle die typischen erythematösen, lokal indurierten Veränderungen. Dies ist als weiterer Beweis einer Immunantwort auf das Vakzin zu werten.

Die Ergebnisse der Antikörperkontrollen lassen hierin eine Reaktion auf die KLH-Komponente des Vakzins vermuten, eine spezifische Antwort auf den Gangliosidanteil kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

6.4.2 Relative Verteilung der Abwehrzellen

Die Auswertung der relativen Lymphozytenverteilungen läßt keine Zusammenhänge mit dem jeweiligen Krankheitsverlauf erkennen. Sie sind gekennzeichnet von einer ausgesprochenen Konstanz, unabhängig vom Ausgangsbefund und erlauben keine prognostischen Aussagen.

Ebensowenig ist hier ein immunmodulatorischer Einfluß des Vakzins innerhalb des Immunisierungszeitraumes abzulesen.

6.5 Klinischer Verlauf

6.5.1 Überlebenszeit

Etablierte Behandlungsstrategie maligner Gliome ist, wie eingangs erwähnt, die möglichst radikale chirurgische Entfernung der Tumormasse sowie eine postoperative Bestrahlungs- und / oder Chemotherapie (65,66).

Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Patienten waren vor Beginn der Untersuchung in entsprechendem Maße antherapiert. Die im Rahmen der konventionellen Therapieoptionen verfügbaren Maßnahmen waren dementsprechend bereits vollzogen.

Verschiedene Autoren berichten in ihren Untersuchungen an Patienten mit Gliomen höherer Malignität bei einer ebensolchen Ausschöpfung der momentan verfügbaren Therapiekonzepte von Überlebensmedianen zwischen 9 und 12 Monaten. Boring et al. (12) geben die mediane Überlebenszeit von Gliompatienten unter Ausschöpfung „aggressiver Behandlungsmodalitäten“ mit ca. einem Jahr, d.h. 52 Wochen, an.

Bleehen et al. (11) korrigieren diese Angaben nach unten mit den von ihnen dargestellten 9 – 12 Monaten Überlebensmedian. Auch hier basieren die Daten auf der Voraussetzung stattgehabter „intensiver Behandlung“, bestehend aus ausgedehnter chirurgischer Entfernung der Tumormasse und konsekutiver Radiotherapie. Ihre Untersuchung nimmt speziell Bezug auf die Gruppe der Patienten mit höhergradigen Gliomen, wie sie in der vorliegenden Studie behandelt wurden.

Die in dieser Studie untersuchten Patienten erreichten eine mediane Überlebenszeit von 76 Wochen, ca. 17 Monaten.

Da keine direkte immunologische Antwort auf die Gangliosidkomponente des Konjugatimpfstoffes nachweisbar war, und eine Gangliosidantikörper- vermittelte tumortoxische Wirkung somit unwahrscheinlich ist, bleibt die Ursache für die Verlängerung der medianen Überlebenszeit prinzipiell unklar.

Möglicherweise spielen die massiv erhöhten Antikörper gegen das immunologische Adjuvans KLH eine Rolle im Sinne einer generalisierten Steigerung der körpereigenen Immunität. Sie beweisen bei reziproken IgM – Werten um 100.000 eine starke Reaktion auf die Substanz.

Die immunstimulierende Wirkung des Keyhole Limpet Hemocyanin findet seit einigen Jahren erfolgreiche Verwendung in der Behandlung des In- situ- Harnblasenkarzinoms. Primärer Mechanismus der KLH-vermittelten Wirkung ist eine dort nachweisbare Verstärkung der NK-Zellaktivität. Auf diese Weise ermöglicht sein Einsatz eine Verlängerung rezidivfreier Intervalle und unregelmäßig sogar Remissionen der Erkrankung (57,88).

Ein vergleichbares Wirkprinzip (NK-Zellaktivierung und unspezifische Immunstimulation) wurde mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen, ist aber auch nicht mit Sicherheit auszuschließen.

In der Diskussion von Überlebenszeiten muß ein weiterer entscheidender Faktor Erwähnung und Beachtung finden. Es handelt sich hier um die Selektion der untersuchten Patientengruppe. Die geforderte Erfüllung der Einschlußkriterien, im besonderen eine Überschreitung des für die prognostische Beurteilung interessanten Karnofsky- Indexes [hier: > 70% (s. 2.1.1.1)], schließt Patienten mit der geringsten Lebenserwartung (21) von vornherein aus. Hieraus resultiert eine Beeinflussung der mittleren und medianen Überlebenszeiten im Verhältnis zu den erwähnten Vergleichsstudien, wodurch letztlich die hohe mediane Überlebenszeit auch zu erklären wäre.

6.5.2 Lebensqualität

Zur Bestimmung, bzw. einer möglichst genauen Beschreibung der Lebensqualität der behandelten Patienten wurde neben der Auswertung persönlicher Gespräche mit den Betroffenen und deren Angehörigen auch die Erhebung des Barthel-Indexes herangezogen.

Der BI wurde ursprünglich entwickelt für die Anwendung bei Patienten mit chronischen neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise im Anschluß an einen ischämischen zerebralen Insult (82).

Eine gute Korrelation zum Karnofsky- Index und die Möglichkeit zur sensibleren Erfassung funktioneller Veränderungen bei Patienten mit malignem Gliom (15) waren die Gründe für den Einsatz in dieser Studie.

Ebenso wie bei der Bestimmung des Karnofsky- Indexes liegt die ursprüngliche Intention der Barthel- Index- Bestimmung in der Hoffnung, präzisere prognostische Aussagen über den Krankheits- und damit Behandlungsverlauf treffen zu können (21). Der Einsatz als Hilfsmittel in der Beobachtung von Therapie und Behandlungserfolgen über einen längeren Zeitraum, d.h. über einen prä-, para- und posttherapeutischen Zeitpunkt hinaus, muß noch immer als neu bezeichnet werden. Zwar existieren bereits Studien zur Beantwortung dieser Fragestellung (21). Konkrete Ergebnisse jedoch bleiben sie bislang schuldig.

Dieser Missstand in der kontrollierten Beurteilung von Langzeitergebnissen erklärt die Problematik einer Vergleichbarkeit der Resultate bezüglich der Lebensqualität weit über den eigentlichen Behandlungszeitraum hinaus.

Die Diskussion der in diesem Zusammenhang erhobenen Daten gleicht daher im folgenden einer Darstellung.

Die Datenerhebungen demonstrieren stabile BI-Werte jeweils über den Großteil des Untersuchungszeitraumes. Im Verlauf des Immunisierungszeitraumes ist durchweg eine Verbesserung der Lebensqualität zu verzeichnen gewesen. Der Status der neurologischen Behinderung als Grundlage lebensqualitativer Einschränkung hat in allen Fällen eine positive Entwicklung erfahren.

Auch im Patientengespräch war ein deutlicher positiver Einfluß der Therapie auf den Krankheitsverlauf erkennbar. Ein psychosomatischer Aspekt darf hier nicht ausgeschlossen werden. Obwohl jeder der Patientinnen und Patienten deutlich auf den in der Regel letalen Ausgang der Erkrankung hingewiesen wurde, war in einigen Fällen eine auffallend euphorische Grundhaltung bemerkbar.

Eine doppelt blind durchgeführte Studie könnte in der Zukunft das Ausmaß eines solchen Einflusses reduzieren.

Eine weitere, bislang nicht erwähnte, Störgröße für die Beurteilung einer Studie wie dieser wird man auch in Zukunft nicht ausschließen können: Bestandteil der Untersuchung war zum Zwecke der Befund- und Datenerhebung eine über das normale Maß hinausgehende, sehr engmaschige Überwachung der Patienten.

Das impliziert eine intensivere postoperative Betreuung und eine in diesem Sinne verbesserte Rehabilitation. Die Patienten profitierten in diesem Zusammenhang auch von einer intensivierten internistischen und hausärztlichen Nachsorge, eine Konsequenz auch des engeren Kontaktes der behandelnden Ärzte untereinander. Ein über den Einfluß der adjuvanten Immuntherapie hinausgehender positiver Effekt auf den postoperativen Verlauf und damit die Lebensqualität lässt sich als zusätzlicher Einflussfaktor demnach nicht eliminieren.

6.6 Abschließende Bewertung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Phase-I-Studie sind aufgrund der fehlgeschlagenen Antigangliosid– Antikörperproduktion nicht von vornherein als negativ zu bewerten.

Die Anwendung des Konjugatvakzins war im Sinne der Verträglichkeit unproblematisch und leicht durchzuführen. Eine erhöhte Belastung des Patienten stellte sich weder durch ein Auftreten eventueller adverser Reaktionen noch durch die Entwicklung außergewöhnlicher Stresssituationen, wie sie beispielsweise während mehrtägiger Krankenhausaufenthalte beschrieben werden, ein.

Die mediane Überlebenszeit des untersuchten Patientenkollektivs lag um 5 Monate über den Angaben aktueller Gliomstudien. Irrespektive der geringen Patientenzahl ist ein solches Resultat durchaus positiv einzuordnen und eröffnet neue Perspektiven für modifizierte Vakzinierungsstrategien.

Die Erzeugung von Antiglykosphingolipid– Antikörpern ist im Rahmen der Behandlung des malignen Melanoms bereits gelungen und ihre Wirksamkeit bewiesen. Eine Übertragung dieses Systems auf die Therapie maligner Gliome liegt aufgrund der ontogenetischen Verwandtschaft beider Tumoren nahe und ist angesichts der dort erzielten Ergebnisse vielversprechend.

Unklar und damit Bestandteil zukünftiger Evaluationen ist die Frage nach der immunologisch günstigsten Auswahl des Gangliosids.

Primärer Grund für den Abbruch der Untersuchungen in diesem Stadium der klinischen Versuchsreihe war die mangelnde Spezifität des Konjugatvakzins in der vorliegenden Zusammensetzung. Eine Fortsetzung der Studie mit Gtri2 erscheint

daher nicht sinnvoll. Der Fokus einer Folgestudie wird auf die Verarbeitung eines anderen Gangliosids gerichtet werden müssen.

Darüber hinaus empfiehlt sich eine Veränderung der immunologischen Adjuvantien. Die massive Antikörperreaktion auf das Keyhole Limpet Hemocyanin läßt eine Dominanz vermuten, die möglicherweise die Effektivität des verwendeten Glykosphingolipids reduziert.

Es sich befinden sich derzeit neue immunologisch adjuvante Substanzen in der Erforschung, die schon bald in eine Phase klinischer Erprobung eintreten können (51).

7 Zusammenfassung

Einleitung: Auf der Basis tierexperimenteller Vorarbeiten und erfolgreicher Studien in der Behandlung des malignen Melanoms wurde eine aktive adjuvante Immuntherapie im Rahmen einer Phase-I-Studie zur Behandlung maligner intrakranieller astrozytärer Tumoren initiiert.

Primäre Beurteilungskriterien der vorliegenden Studie waren:

1. Verträglichkeit der Therapie
2. Immunreaktivität und Einfluß auf den klinischen Verlauf

Methoden: Nach mikrochirurgischer Tumorentfernung und konsekutiver Radiotherapie absolvierten sieben Patienten eine Staffel von sechs Immunisierungen mittels Gtri2-KLH/MPL-A – Konjugat (70 µg Gangliosid).

Als Beurteilungskriterium zur Messung eventueller adverser Reaktionen im Verlauf der Therapie fanden die von der WHO zur Bemessung akuter und subakuter Toxizität empfohlenen Richtlinien Anwendung.

Im Rahmen regelmäßiger Laboruntersuchungen wurden Antikörpertiter gegen das Gangliosid Gtri2 und die verwendeten Adjuvantien analysiert.

Der Status des Tumorwachstums wurde in Intervallen von zwei Monaten computertomografisch kontrolliert.

Ergebnisse: Alle behandelten Patienten entwickelten im Bereich der Injektionsstelle eine lokale Typ-4-Reaktion.

Antigangliosidantikörpertiter konnten nicht nachgewiesen werden. Die immunologische Antwort auf die verwendeten Adjuvantien hingegen demonstrierte Antikörpertiter um 1: 100.000.

Eine komplette Remission der Tumorerkrankung wurde nicht erzielt.

Für einen medianen Zeitraum von 21,5 Wochen (6-34 Wochen) anfänglich der initialen Immunisierung blieb die Erkrankung im Sinne einer computertomographisch konsolidierten Wachstumsstagnation stabil. Die mediane Überlebenszeit nach Immunisierungsbeginn beläuft sich auf 47 Wochen, die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung auf 76 Wochen.

Die Ergebnisse der Korrelationen zwischen mittleren T-Zellzahlen und Überlebenszeit nach Diagnosestellung lassen einen linearen Zusammenhang vermuten,

der von prognostischer Bedeutung sein kann. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges sind jedoch bislang noch keine validen Aussagen möglich.

Adverse Reaktionen im Sinne der von der WHO empfohlenen Richtlinien wurden nicht beobachtet.

Diskussion: Die aktive Immunisierung mittels Gtri2-KLH/MPL-A-Impfstoffkonjugat führte nicht zur beabsichtigten spezifischen Antikörpergeneration. Hohe Titer der antikörpervermittelten Immunreaktion auf die Immunadjuvantien jedoch demonstrieren eine Antwort auf das Vakzin.

Im Vergleich zu Studien konventioneller Therapieschemata verlängerte mediane Überlebenszeiten (mediane ÜLZ von 17 Monaten gegenüber ca. 12 Monaten in vergleichbaren Übersichten) geben Anhalt für einen immunologisch begründbaren Benefit der Patienten.

Die klinische Anwendung des Vakzins gestaltete sich problemlos und zeichnete sich durch eine gute Verträglichkeit sowie einfache Handhabung aus.

Erfolge in der Anwendung von Gangliosidkonjugatimpfstoffen in der Immuntherapie maligner Melanome sowie die gewonnenen Erkenntnisse aus tierexperimentellen Vorarbeiten sowie der vorliegenden Studie demonstrieren die Machbarkeit eines solchen Ansatzes auf dem Gebiet der Gliombehandlung und nähren die Hoffnung auf eine weitere Verbesserung der Prognose betroffener Patienten.

Ziel weitergehender Untersuchungen muß es daher sein, die Spezifität der Immunreaktion zu erhöhen und eine meßbare Antikörperreaktion speziell auf verwendete Ganglioside zu provozieren.

In diesem Sinne erscheinen perspektivisch ein Wechsel des verwendeten Gangliosides und eine Modifikation der Adjuvantien für die Anwendung in einem größeren Patientenkollektiv als sinnvoll und erfolgversprechend.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Alessandri G, De Cristan G, Ziche M et al. (1992) Growth and motility of microvascular endothelium are modulated by the relative concentration of gangliosides in the medium. *J Cell Physiol* 151: 23- 28
- 2 Ammirati M, Galicich JH, Arbit E et al. (1987) Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. *Neurosurg* 21: 607- 614
- 3 Anderson TM, Ibayashi Y, Holmes EC et al. (1987) Modification of natural killer cell activity of lymphocytes infiltrating human small lung cancers. *Cancer Immunol Immunother* 25: 65- 68
- 4 Apuzzo ML und Mitchell MS (1981) Immunological aspects of intrinsic glial tumors. *J Neurosurg* 55: 1-18
- 5 Azizi SA, Myamoto C (1998) Principles of treatment of malignant gliomas in adults: an overview. *J Neurovirol* 4: 204- 216
- 6 Barth RF, Soloway AH (1997) Boron neutron capture therapy of brain tumors - current status and future prospects. *J Neuro-Oncology* 33: 3- 7
- 7 Berry M und Butt AM (1997) Structure and function of glia in the central nervous system. In: *Greenfield's Neuropathology. Sixth Edition. Graham DI & Lantos PL, Eds. 1: 63- 83. Edition Arnold. London.*
- 8 Bertrand A, Mannen H (1960) Etude des reactions vasculaires dans les astrocytomes. *Rev Neurol* 102: 3- 19
- 9 Bhondeley MK, MehraRD, Mehra NK et al. (1988) Imbalances in T-cell subpopulations in human gliomas. *J Neurosurg* 68: 589- 593
- 10 Black PM (1991) Brain tumors (first of two parts). *N Engl J Med* 324: 1471- 1476
- 11 Bleehen NM, Stenning SP (1991) on behalf of the Medical Research Council Brain Tumour Working Party: A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer* 64: 769- 774
- 12 Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S (1994) Cancer Statistics. *Ca: a cancer J for Clinicians* 44: 7- 26
- 13 Bosslet K, Mennel HD, Rodden AF et al. (1989) Monoclonal antibodies against epitopes on ganglioside GD2 and its lactones. Markers for gliomas and neuroblastomas. *Cancer Immunol Immunother* 29: 171- 178
- 14 Brady RO, Fishman PH (1974) Biosynthesis of glycolipids in virus-transformed cells. *Biochem Biophys Acta* 355: 121- 148
- 15 Brazil L, Thomas R, Laing R et al. (1997) Verbally administered Barthel- Index as functional assessment in brain tumour patients. *J Neuro-Oncology* 34: 187- 192

- 16 Brock CS, Bower M (1997) Current perspectives in gliomas. *Med Oncol* 14: 103- 120
- 17 Brooks WH, Caldwell HD, Mortara RH (1974) Immune responses in patients with gliomas. *Surg Neurol* 2: 419- 423
- 18 Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD et al. (1978) Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumour patients. *Ann Neurol* 4: 219- 224
- 19 Brooks WH, Netsky MG, Normansell DE et al. (1990) Depressed cell- mediated immunity in patients with primary intracranial tumor. Characterization of a humoral immunosuppressive factor. *J Exp Med* 136: 1631- 1647
- 20 Cahan LD, Irie RF, Singh R et al. (1982) Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7629- 7633
- 21 Choucair AK, Scott C, Urtasun R et al. (1997) Quality of life and neuropsychological evaluation for patients with malignant astrocytomas: RTOG 91-14. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 38: 9- 20
- 22 Cox DJ, Pilkington GJ und Lantos PL (1976) The fine structure of blood vessels in ethylnitrosourea- induced tumours of the rat nervous system. With special reference to the breakdown of the blood- brain barrier. *Br J Exp Pathol* 57: 419- 430
- 23 Cserr HF, Knopf PM (1992) Cervical lymphatics, the blood- brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13: 507- 512
- 24 Deane BR und Lantos PL (1981) The vasculature of experimental brain tumours. Part 1. A sequential light and electron microscope study of angiogenesis. *J Neurol Sci* 49: 55- 66
- 25 Dische S (1991) A review of hypoxic cell radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20: 147- 152
- 26 Doll R, Kinlen L (1970) Immunosurveillance and cancer: epidemiological evidence. *British Medical Journal* 14;4: 420-422
- 27 Dreyfus H, Louis JC, Harth S, Mandel P (1980) Gangliosides in cultured neurons. *Neuroscience* 5: 1647- 1655
- 28 Duncan W (1994) An evaluation of the results of neutron therapy trials. *Acta Oncol* 33: 299- 306
- 29 Endo T, Scott DD, Stewart SS et al. (1984) Antibodies to glycosphingolipids in patients with multiple sclerosis and SLE. *J Immunol* 132: 1793- 1797
- 30 EORTC Brain Tumour Group (1983) Misonidazole in radiotherapy of supratentorial malignant brain gliomas in adult patients: a randomized double-blind study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 39- 42
- 31 Eto Y, Shinoda S (1982) Gangliosides and neutral glycosphingolipids in human brain tumors: specificity and their significance. *Adv Exp Med Biol* 152: 279- 290
- 32 Fabry Z, Raine CS, Hart MN (1994) Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 15: 218- 224

- 33 Fishman PH (1982) Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol* 69: 85- 97
- 34 Fuchs HE, Bullard DE (1988) Immunology of transplantation in the central nervous system. *Appl Neurophysiol* 51: 278- 296
- 35 Greig NH, Ries LG, Yancik R, Rapoport SI (1990) Increasing annual incidence of primary malignant brain tumors in the elderly. *J Natl Cancer Inst* 82: 1621- 1624
- 36 Hakamori S (1975) Structure and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochem Biophys Acta* 417: 55- 89
- 37 Hakamori S (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50: 733- 764
- 38 Hakamori S (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50: 733- 764
- 39 Hakamori S (1985) Aberant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 45: 2405- 2414
- 40 Hakamori S (1985) Glycosphingolipids as differentiation and tumor markers and as regulators of cell proliferation. In: *Molecular Biology of Tumor Cells*. Wahren B et al.(Editors) Raven New York pp 139-156
- 41 Hakamori S (1986) Tumor- associated glycolipid antigens, their metabolism and organization. *Chem Phys Lipids* 42: 209- 233
- 42 Hakamori S (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 265: 18713- 6
- 43 Hanwehr von RI, Hofman FM, Taylor CR et al. (1984) Mononuclear lymphoid populations infiltrating the microenvironment of primary CNS tumors. *J Neurosurg* 60: 1138- 1147
- 44 Harsh GR, Levin VA, Gutin PH et al. (1987) Reoperation for recurrent glioblastoma and anaplastic astrocytoma. *Neurosurg* 21: 615- 621
- 45 Helling F, Shang A, Calves M et al. (1994) GD3 vaccines for melanoma: Superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Research* 54: 197- 203
- 46 Helling F, Zhang S, Shang A et al. (1995) GM2-KLH-conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant Qs-21. *Cancer Res* 55: 2783- 2788
- 47 Hochberg FH, Pruitt A (1980) Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* 30: 907- 911
- 48 Hutchinson TA, Boyd NF, Feinstein AR et al. (1979) Scientific problems in clinical scales, as demonstrated in the Karnofsky index of performance status. *J Chron Dis* 32: 661- 666
- 49 Ilyas AA, Willison HJ, Quarles RH et al. (1988) Serum antibodies to gangliosides in Guillain- Barré syndrome. *Ann Neurol* 23: 440- 447

- 50 Jacobs SK, Wilson DJ, Kornblith PL et al. (1986) Interleukin2 or autologous lymphokine- activated killer cell treatment of malignant glioma: phase I trial. *Cancer Res* 46: 2101- 2104
- 51 Jennemann R, Bauer BL, Bertalanffy H, Selmer T, Wiegandt H (1999) Basolipids from *Agaricus* are novel immune adjuvants. *Immunobiology* 200: 277- 289
- 52 Jennemann R, Bauer BL, Schmidt R et al. (1996) Effects of Monophosphoryllipid- A on the immunization of mice with keyhole limpet hemocyanin- and muramyldipeptide- ganglioside Gfpt1 conjugates. *J Biochem* 119: 378-384
- 53 Jennemann R, Gwenuch C, Boßlet S, Bauer BL, Wiegandt H (1994) Specific immunization using keyhole limpet hemocyanin-ganglioside-conjugates. *J Biochem* 115: 1047- 1052
- 54 Jennemann R, Bauer BL, Schmidt R et al. (1996) Effects of monophosphoryllipid-A on the immunization of mice with keyhole limpet hemocyanin- and muramyldipeptid-ganglioside Gfpt1 conjugates. *J Biochem* 119: 378- 384
- 55 Jennemann R, Rodden A, Bauer BL, Mennel H-D, Wiegandt H (1990) Glycosphingolipids of human gliomas. *Cancer Res* 50: 7444-7449
- 56 Jerne NK (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 125C: 373- 389
- 57 Jurincic-Winkler P, Metz KA, Beuth J et al. (1995) Effect of keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bacillus calmette-guérin (BCG) instillation on carcinoma in situ of the urinary bladder. *Anticancer Research* 15: 2771- 2776
- 58 Karnofsky DA, Burchenal JH (1949) The clinical evaluation of chemotherapeutic agent in cancer. In: *Macleod CM (Editor). Evaluation of chemotherapeutic agents. Columbia University Press, New York, pp 191- 205*
- 59 Kazimer RL, Whisler RL, Stephens RE (1989) Sensitivity of glioma and fetal brain cell lines to natural killer cytotoxicity in monolayer assay. *J Neurooncol* 7: 145- 150
- 60 Kiefer R, Supler ML, Toyka KV et al. (1994) In situ detection of transforming growth factor- beta mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. *Neurosci Lett* 166: 161- 164
- 61 Kinney HC und Armstrong DD (1997) Perinatal neuropathology. In: *Greenfield's Neuropathology. Sixth Edition. Graham DI & Lantos PL, Eds. 1: 535- 599. Edition Arnold. London.*
- 62 Kitamura K, Livingston PO, Fortunato SR et al. (1995) Serological response patterns of melanoma patients immunized with a GM2 ganglioside conjugate vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2805-2809
- 63 Klein G und Klein E (1977) Immunosurveillance against virus induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2121- 2125

- 64 Koga M, Yuki N, Hirata K (1999) Antiganglioside antibody in patients with Guillain-Barré-syndrome who show bulbar palsy as an initial symptom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 513- 516
- 65 Kornblith PL, Welch WC, Bradley MK (1993) The future therapy for glioblastoma. *Surg Neurol* 39: 538- 543
- 66 Kreth FW, Warnke PC, Scheremet R et al. (1993) Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 78: 762- 766
- 67 Kruse CA, Schlitz PM, Bellgrau D et al. (1994) Intracranial administrations of single or multiple source allogeneic cytotoxic T- lymphocytes: chronic therapy for primary brain tumors. *J Neurooncol* 19: 161- 168
- 68 Landsteiner K, Chase MW (1942) Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 49: 688
- 69 Levine AL, Sheline GE, Putin PH (1989) In: *Cancer: Principles and practice of oncology*. Davity et al. (Editors) Lippincott, Philadelphia pp 1557- 1611
- 70 Lillehei KO, Mitchell DH, Johnson SD et al. (1991) Long- term follow- up of patients with recurrent malignant gliomas treated with adjuvant adoptive immunotherapy. *Neurosurgery* 28: 16- 23
- 71 Livingston PO (1995) Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside- KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 145: 147- 166
- 72 Livingston PO (1995) Augmenting the immunogenicity of carbohydrate tumor antigens. *Sem Cancer Biol* 6: 357- 366
- 73 Livingston PO, Adluri S, Helling F et al. (1994) Phase-I-trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine* 12: 1275- 1280
- 74 Livingston PO, Calves MJ, Helling F et al. (1993) GD3 proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3. *Vaccine* 11: 1199- 1204
- 75 Livingston PO, Natoli EJ, Calves MJ et al. (1987) Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2911-2915
- 76 Livingston PO, Oettgen HF, Old LJ (1982) Specific active immunotherapy in cancer therapy. In: *Mihich E (ed) Immunological aspects of cancer therapeutics*. Wiley, NY p 363
- 77 Livingston PO, Ritter G, Srivastava P et al. (1989) Characterization of IgG and IgM antibodies induced in melanoma patients by immunization with purified GM2 ganglioside. *Cancer Res* 49: 7045-7050
- 78 Livingston PO, Watanabe T, Shiku H et al. (1982) Serological response of melanoma patients receiving melanoma cell vaccines. I. Autologous cultured melanoma cells. *Int J Cancer* 30: 413- 422

- 79 Livingston PO, Wong GY, Adluri S et al. (1994) Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 12: 1036- 1044
- 80 Lo HS, Hogan EL, Koontz DA et al. (1980) Serum gangliosides in cerebral astrocytoma. *Ann Neurol* 8: 534- 538
- 81 Mahaley MS, Brooks WH, Roszman TL et al. (1977) Immunobiology of primary intracranial tumours. I. Studies of cellular and humoral general immunocompetence of brain-tumour patients. *J Neurosurg* 46: 467- 476
- 82 Mahoney F, Barthel D (1965) Functional evaluation: The Barthel Index. *Maryland State Med J* 14: 61- 65
- 83 Marcus DM, Dustira A, Diego I et al. (1987) Studies of the mechanisms by which gangliosides inhibit the proliferative response of murine splenocytes to concanavalin A. *Cell Immunol* 104: 71- 78
- 84 McLean GD, Bowen-Yacyszyn MB, Samuel J et al. (1992) Active immunization of human ovarian cancer patients against a common carcinoma (Thomsen-Friedenreich) determinant using a synthetic carbohydrate antigen. *J Immunother* 11: 292- 305
- 85 Medawar PB (1948) Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29: 58- 69
- 86 Menzies CB, Gunar M, Thomas DGT, Behan BO (1980) Impaired thymus-derived lymphocyte function in patients with malignant brain tumour. *Clin Neurol Neurosurg* 82: 157- 168
- 87 Merrill AH, Hannun YA, Bell RM (1993) Introduction: sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv Lipid Res* 25: 1- 24
- 88 Molto LM, Carballido JA, Jurincic C et al. (1991) Keyhole limpet hemocyanin can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 19 (1): 74- 78
- 89 Murphy JB, Sturm E (1923) Conditions determining transplantability of tissues to brain. *J Exp Med* 38: 183
- 90 Nakagawa Y, Hatanaka H (1997) Boron neutron capture therapy. Clinical brain tumor studies. *J Neuro-Oncology* 33: 105- 115
- 91 Nanda A, Liwnicz B, Atkinson BF et al. (1989) Monoclonal antibodies with cytotoxic reactivities against human gliomas. *J Neurosurg* 71: 892- 897
- 92 Natoli EJ Jr, Livingston PO, Cordon- Cardo C et al. (1986) A murine monoclonal antibody detecting N- acetyl and N- glucosyl GM2: Characterization of a cell surface reactivity. *Cancer Res* 46: 4116- 4120
- 93 Natoli EJ Jr, Livingston PO, Pukel CS, Lloyd KO, Wiegandt H et al. (1986) A murine monoclonal antibody detecting N-acetyl and N-glycosyl GM2: Characterization of cell surface reactivity. *Cancer Res* 46: 4116- 4120

- 94 Offner H, Thieme T, Vandenbark AA (1987) Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T- lymphocytes. *J Immunol* 139: 3295- 3305
- 95 Old LJ (1995) Immuntherapie gegen Krebs. In: *Spektrum der Wissenschaft. Spezial 5. Krebsmedizin*. Rennie J (Editor) Spektrum, Heidelberg pp 77- 84
- 96 OPCS (1988) Cancer statistics - registrations. *Series MB1 1993; no. 21 (HMSO)*
- 97 Parker J, Caldini G, Krishnamurti C et al. (1984) Binding of interleukin2 to gangliosides. *FEBS Lett* 170: 391- 395
- 98 Perry VH und Gordon S (1988) Macrophages und microglia in the nervous system. *Trends Neuroscien* 11: 273- 277
- 99 Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas AA et al. (1988) A treatable multifocal neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 24: 73- 78
- 100 Piguet V, Diserens A-C, Carrel S et al. (1985) The immunobiology of human gliomas. *Springer Semin Immunopathology* 8: 111- 127
- 101 Plautz GE, Barnett GH, Miller GW et al. (1998) Systemic T- cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg* 89: 42- 51
- 102 Qureshi N, Takayama K, Ribi E (1982) Purification and structural determination of non-toxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. *J Biol Chem* 257: 11808- 11815
- 103 Ravindranath MH, Brazeau SM, Morton DL (1994) Efficacy of tumor cell vaccine after incorporating monophosphoryl lipid A (MPL) in tumor cell membranes containing tumor-associated ganglioside. *Experimentia* 50: 648- 653
- 104 Riboni L, Malesci A, Gaini SM et al. (1984) Ganglioside pattern of normal human brain, from samples obtained at surgery. A study especially referred to alkali labile species. *J Biochem (Tokyo)* 96: 1943- 1946
- 105 Richardson CL, Baker SR Morre DJ, Keenon TW (1975) Glycosphingolipid synthesis and tumorigenesis. A role for the golgi apparatus in the origin of specific receptor molecules of the mamallian cell surface. *Biochem Biophys Acta* 417: 175- 186
- 106 Ridley A, Cavanagh JB (1969) The cellular reactions to heterologous, homologous and autologous skin implanted into brain. *J Pathol* 99: 193- 203
- 107 Ridley A, Cavanagh JB (1971) Lymphocytic infiltration in gliomas: evidence of possible host resistance. *Brain* 94: 117- 124
- 108 Ritter G, Boosfeld E, Adluri S et al. (1991) Antibody response to immunization with ganglioside GD3 and GD3 congeners (lactones, amide and gangliosidol) in patients with malignant melanoma. *Int J Cancer* 48: 379- 385
- 109 Ritter G, Boosfeld E, Calves MJ et al. (1990) Antibody response to immunization with purified ganglioside GD3, GD3 lactones, GD3 amide and GD3 gangliosidol in the mouse. *Immunobiology* 182: 32- 43

- 110 Ritter G, Livingston PO (1991) Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2: 401- 409
- 111 Robb RJ (1986) The suppressive effects of gangliosides upon IL2-dependant proliferation as a function of inhibition of IL2- receptor association. *J Immunol* 136: 971- 976
- 112 Rodden F, Wiegandt H, Bauer BL (1991) Gangliosides: the relevance of current research to neurosurgery. *J Neurosurg* 74: 606- 619
- 113 Sachs L (1997) In: *Sachs L (Editor) Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. 8. Auflage. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg pp 492- 538*
- 114 Sáez-Torres I, Díaz-Villoslada P, Martínez-Cáceres E et al. (1998) Gangliosides do not elicit autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats and SJL mice. *J Neuroimmunol* 84: 24- 29
- 115 Scheinberg LC, Edelman FL und Levy A (1964) Is the brain "an immunologically privileged site?" I. Studies based on intracerebral tumour homotransplantation and isotransplantation to sensitized hosts. *Arch neurol, Chicago* 11: 248
- 116 Scheinberg LC, Kotsilimbas DG, Karpf R et al. (1966) Is the brain "an immunologically privileged site?" III. Studies based on homologous skin grafts to the brain and subcutaneous tissues. *Arch Neurol, Chicago* 15: 62- 67
- 117 Schlote W, Riede U-N, Wiestler OD (1995) Neuroepitheliale Tumoren. In: *Riede U-N, Schäfer HE (Editors) Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart pp 1075-1090*
- 118 Schneider J, Hofman FM, Apuzzo ML et al. (1992) Cytokines and immunoregulatory molecules in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg* 77: 265- 273
- 119 Seifert H and Uhlenbruck G (1965) Über Ganglioside von Hirntumoren. *Naturwissenschaften* 52: 110
- 120 Shapiro JR, Pu PY, Mohamed AN et al. (1993) Chromosome number and carmustine sensitivity in human gliomas. *Cancer* 71: 4007- 4021
- 121 Shoenberg BS (1983) In: *Oncology of the nervous system. Walker MD (Editor) Nijhoff, Boston pp 1- 30*
- 122 Shrieve DC, Loeffler JS (1995) Advances in radiation therapy for brain tumors. *Neurol Clinics* 13: 773- 793
- 123 Simone IL, Annunziata P, Maimone D et al. (1993) Serum and CSF anti- GM1 antibodies in patients with Guillain- Barré syndrome and chronic demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci* 114: 49- 55
- 124 Tada M, De Tribolet N (1993) Recent advances in immunobiology of brain tumors. *J Neurooncol* 17: 261- 271
- 125 Tai T, Cahan LD, Tsuchida T et al. (1985) Immunogenicity of melanoma- associated gangliosides in cancer patients. *Int J Cancer* 35: 607- 612
- 126 Takahashi H, Belser PH, Atkinson BF et al. (1990) Monoclonal antibody-dependant, cell-mediated cytotoxicity against human malignant gliomas. *Neurosurgery* 27: 97- 102

- 127 Taketomi T, Yamakawa T (1963) *J Biochem* 54: 444- 451
- 128 Vick NA, Khandekar JD und Bigner DD (1977) Chemotherapy of brain tumours. The "blood- brain barrier" is not a factor. *Arch Neurol* 34: 523- 526
- 129 Walker MD, Green SB, Byar DP et al. (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303: 1323- 1329
- 130 Watanabe T, Pukel CS, Takeyama H et al. (1982) Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2. *J Exp Med* 156: 1884- 1889
- 131 Weitzner MA, Myers CA (1997) Cognitive functioning and quality of life in malignant glioma patients: a review of the literature. *Psycho-Oncology* 6: 169- 177
- 132 Weller M und Fontana A (1995) The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor- derived TGF- β , T- cell apoptosis, and the immune- privilege of the brain. *Brain Res Rev* 21: 128- 151
- 133 Weller M, Frei K, Groscurth P et al. (1994) Anti- Fas/ APO- 1 antibody- mediated apoptosis of cultured human glioma cells. *J Clin Invest* 94: 954- 964
- 134 Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ (1996) Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS- immune pathways. *Brain Pathol* 6: 275- 288
- 135 Welt S, Carswell EA, Vogel C-W et al. (1987) Immune and nonimmune effector functions of IgG3 mouse monoclonal antibody R24 detecting the disialoganglioside GD3 on the surface of melanoma cells. *Clin Immunol Immunopathol* 45: 214- 229
- 136 Wiegandt H (1985) In: *New Comprehensive Biochemistry, Vol 10. Wiegandt H (Editor) Elsevier, Amsterdam pp 199- 260*
- 137 Wikstrand CJ, Bigner DD (1980) Immunobiologic aspects of the brain and human gliomas. A review. *Am J Pathol* 98: 517-568
- 138 Willison HJ (1994) Antiglycolipid antibodies in peripheral neuropathy: fact or fiction? *J Neurol Neurosurg Psych* 57: 1303- 1307
- 139 Wood GW, Morantz RA (1982) In vitro reversal of depressed T- lymphocyte function in brain tumor patients' peripheral blood. *J Natl Cancer Inst* 68: 27- 33
- 140 Wood GW, Neff JE, Stephens R (1979) Relationship between monocytoysis and T- lymphocyte function in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 63: 587- 592
- 141 Yamaguchi H, Furukawa K, Fortunato SR et al. (1990) Human monoclonal antibody with dual GM2/GD2 specificity derived from an immunized melanoma patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3333- 3337
- 142 Yates AJ, Icard- Liepkalns C, Sirinek LP et al. (1985) Natural killer activity against cultured human neural tumor and fetal brain cells. *Cell Immunol* 90: 485- 492
- 143 Yates AJ, Stephens RE (1987) Biology of human gliomas. *Perspect Pediatr Pathol* 10: 135- 159

- 144 Yogeewaran G (1983) Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv Cancer Res* 38: 289- 350
- 145 Young H, Kaplan A und Regelson W (1977) Immunotherapy with autologous white cell infusions ("lymphocytes") in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: a preliminary report. *Cancer (Phila)* 40: 1037- 1044
- 146 Zembala M und Asherson GL (1989) Human monocytes. *Academic Press. London*

9 Anlagen

9.1 Herstellung des Vakzins

9.1.1 Ozonolyse

70 mg Gangliosid Gtri2 werden in ein Ozonolysegefäß eingewogen, in Methanol aufgenommen und in einem Ultraschallbad beschallt. Durch die Gangliosidlösung wird Ozon geleitet. Nach Beendigung der Reaktion wird Argon durch den Reaktionsansatz geleitet und im Anschluß Dimethylsulfid zugegeben. Nach Ablauf einer Standzeit bei Raumtemperatur wird das Methanol durch einen Stickstoffstrom abgedampft, anschließend in n- Hexan dispergiert und abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit Hexan reextrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet, das den Gangliosidaldehyd enthält, unter Vakuum in einem Exsikkator getrocknet.

9.1.2 Konjugation an KLH

Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, Calbiochem) wird in destilliertem Wasser gelöst und über Nacht gegen Boratpuffer dialysiert. Es folgt die Mischung von Gangliosidaldehyd und KLH. Überschüssiger Boratpuffer wird durch Dialyse des Gemisches gegen PBS entfernt.

9.1.3 Konfektion des Impfstoffes

In sterile Ampullen wird 28 µg Monophosphoryllipid A von Salmonella Minnesota Re 595 (MPL, Sigma, München), gelöst in Chloroform/ Methanol (1:1), pipettiert und das Lösungsmittel in einem sterilen Vakuumexsikkator evaporiert. Das Gtri2- KLH- Konjugat wird nach Verdünnung sterilfiltriert. In jede Ampulle erfolgt die Zugabe von 1 ml Gangliosid- KLH- Konjugat, und das offene Ende der Ampulle wird mittels Bunsenbrenner zugeschmolzen.

9.1 Herstellung des Vakzins

Das MPL wird mittels 5-minütiger Beschallung in einem auf 37°C erwärmten Ultraschallbad mit dem Gangliosid- KLH- Konjugat suspendiert.

Die sterilen Ampullen werden bis zur Verwendung bei +2 bis +6°C aufbewahrt.

Für detailliertere Darstellung siehe Jennemann R, Bauer BL et al. (1996) Effects of Monophosphoryllipid- A on the Immunization of Mice with Keyhole Limpet Hemocyanin- and Muramyldipeptide- Ganglioside Gfpt1- Conjugates. *J Biochem* 119, 378- 384

9.2 WHO-Kriterien zur Bemessung akuter und subakuter Toxizität

Abbildung 42 WHO-Toxizitätskriterien

Empfehlung für die Bemessung
von akuter und subakuter Toxizität (Erwachsene) (nach WHO)

	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Übelkeit/Erbrechen	keine	Übelkeit	vorübergehendes Erbrechen	Erbrechen erfordert Therapie	nicht beherrschbares Erbrechen
Lungenfunktion	normal	milde Symptome	Belastungsdyspnoe	Ruhedyspnoe	vollständige Bettruhe erforderlich
Infektion	keine	leichte Infektion	mäßige Infektion	schwere Infektion	schwere Infektion mit Blutdruckabfall
Diarrhoe	keine	vorübergehend < 2 Tage	tolerabel, aber > 2 Tage	intolerabel, Therapie erforderlich	haemorrhagische Dehydratation
Obstipation ²	keine	wenig	mäßig	Blähbauch	Blähbauch und Erbrechen, Ileus unerträglich
Schmerzen ³	keine	wenig	mäßig	stark	
Mundschleimhaut	normal	Wundsein/Erytheme	Erytheme, Ulcerationen, feste Ernährung noch möglich	Ulcerationen erfordern flüssige Ernährung	Nahrungsaufnahme ist nicht möglich
Periphere Neurotoxizität	keine	Parästhesie und/oder verringerte Sehreflexe	schwere Parästhesie und/oder Muskelschwäche	intolerable Parästhesie und/oder motorische Paresen	Paralyse
Haematurie	keine	mikroskopisch	makroskopisch	makroskopisch + Blutgerinnsel	obstruktive Uropathie
Fieber	kein	Fieber < 38°C	Fieber 30°C - 40°C	Fieber > 40°C	Fieber mit Hypotension
Haut	normal	Erytheme	trockene Abschuppung, Bläschenbildung, Pruritus	feuchte Abschuppung, Ulceration	exfoliative Dermatitis, Nekrosen, die chir. Eingriff erfordern
Haarverlust	kein	minimal	ungleichmäßige Alopezie	komplette Alopezie, aber reversibel	komplette, irreversible Alopezie
Ototoxizität	keine	wenig	mäßig	stark	taub
Nephrotoxizität	keine Kreatinin-erhöhung	leichte Kreatinin-erhöhung	mäßige	starke	dialysepflichtige
Leukozytopenie (1.000/mm ³)	> 4.0	3.0 - 3.9	2.0 - 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
Thrombozytopenie (1.000/mm ³)	> 100	75 - 99	50 - 75	25 - 49	< 25
Haemoglobin (g/100ml)	> 11.0	9.5 - 10.9	8.0 - 9.4	6.5 - 7.9	< 6.5
Granulozyten (1.000/mm ³)	> 2.0	1.5 - 1.9	1.0 - 1.4	0.5 - 0.9	< 0.5
Haemorrhagie	keine	Petechien	wenig Blutverlust	hoher Blutverlust	Blutverlust führt zu Körperschwäche
Bilirubin	< 1.25 x N ¹	1.26 - 2.5 x N	2.6 - 5 x N	5.1 - 10 x N	10 x N
SGOT/SGPT	< 1.25 x N	1.26 - 2.5 x N	2.6 - 5 x N	5.1 - 10 x N	10 x N
Alkalische Phosphatase	< 1.25 x N	1.26 - 2.5 x N	2.6 - 5 x N	5.1 - 10 x N	10 x N
Blutharnstoff	1.25 x N	1.26 - 2.5 x N	2.6 - 5 x N	5.1 - 10 x N	> 10 x N
Kreatinin	1.25 x N	1.26 - 2.5 x N	2.6 - 5 x N	5.1 - 10 x N	> 10 x N
Proteinurie	keine	< 3 g/l	3,1 - 10 g/l	> 10 g/l	nephrotisches Syndrom
Allergie	keine	Oedeme	Bronchospasmen, keine parenterale Therapie erforderlich	Bronchospasmen, parenterale Therapie erforderlich	anaphylaktische Reaktion
Kardiale Arrhythmien	keine	Sinus-Tachykardie > 110 in Ruhe	monotope VES, atriale Arrhythmien	polytope VES	ventrikuläre Tachykardie
Herzfunktion	normal	asymptomatisch, aber pathologischer Befund	vorübergehende symptomatische Dysfunktion, keine Therapie erforderlich	symptomatische Dysfunktion, spricht auf Therapie an	symptomatische Dysfunktion, spricht auf Therapie nicht an
Perikarditis	keine	asymptomatischer Erguß	symptomatisch, Punktion nicht erforderlich	Tamponade, Punktion erforderlich	Tamponade, chir. Eingriff erforderlich
Bewußtsein	wach	vorübergehende Lethargie	Somnolenz < 50% der Wachzeit	Somnolenz > 50% der Wachzeit	Koma

¹ N = obere Grenze des Normalwertes

² = ohne Obstipation durch Narkotika

³ = Nur behandlungsbedingter Schmerz, nicht krankheitsbedingter Schmerz

9.3 Der Barthel – Index

Abbildung 43 Der Barthel-Index

Funktionssystem	Status	Bewertung
Darm	inkontinent	0
	gelegentlicher Stuhlabgang	1
	kontinent	2
Blase	inkontinent / katheterisiert	0
	gelegentlicher Urinabgang	1
	kontinent	2
Körperpflege	benötigt Hilfe	0
	unabhängig	1
Toilettengebrauch	abhängig	0
	benötigt Hilfe	1
	unabhängig	2
Ernährung	unfähig	0
	benötigt Hilfe	1
	unabhängig	2
Transfer Stuhl - Bett	unfähig - keine Balance im Sitzen	0
	ausgeprägte Hilfsbedürftigkeit (1-2 Personen)	1
	geringe Hilfsbedürftigkeit (verbal oder physisch)	2
	unabhängig	3
Mobilität	immobil	0
	Rollstuhl notwendig	1
	Gehen mit Hilfe einer weiteren Person	2
Ankleiden	abhängig	0
	benötigt Hilfe	1
	unabhängig	2
Treppensteigen	unfähig	0
	benötigt Hilfe	1
	unabhängig	2
Baden	abhängig	0
	unabhängig	1
Gesamtpunktzahl		Max. 20

10 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1</i> Patientencharakteristiken _____	2–30
<i>Abbildung 2</i> Studienplan _____	3–31
<i>Abbildung 3</i> Patientin A: Erstbefund _____	4–35
<i>Abbildung 4</i> Patientin A: Erster Rezidivbefund. Ausgangsbefund vor Studienbeginn _____	4–36
<i>Abbildung 5</i> Patientin A: Rezidiv 14 Wochen nach Immunisierungsbeginn _____	4–37
<i>Abbildung 6</i> Patientin A: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–37
<i>Abbildung 7</i> Patient B: Ausgangsbefund vor Studienbeginn _____	4–38
<i>Abbildung 8</i> Patient B: Rezidivbefund 32. Woche nach Immunisierungsbeginn _____	4–39
<i>Abbildung 9</i> Patient B: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–40
<i>Abbildung 10</i> Patient C: Ausgangsbefund _____	4–41
<i>Abbildung 11</i> Patient C: Rezidivdiagnose 29 Wochen nach Immunisierungsbeginn _____	4–42
<i>Abbildung 12</i> Patient C: Größenzunahme des Tumorrezidivs 26 Wochen nach Rezidivdiagnose _____	4–42
<i>Abbildung 13</i> Patient C: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–43
<i>Abbildung 14</i> Patient D: Erstdiagnose _____	4–44
<i>Abbildung 15</i> Patient D: Rezidivdiagnose 34. Woche nach Immunisierungsbeginn _____	4–46
<i>Abbildung 16</i> Patient D: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–46
<i>Abbildung 17</i> Patientin E: Erstdiagnose _____	4–47
<i>Abbildung 18</i> Patientin E: Rezidivdiagnose. Befund vor Studienbeginn _____	4–48
<i>Abbildung 19</i> Patientin E: Rezidivbefund 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn _____	4–49
<i>Abbildung 20</i> Patientin E: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–50
<i>Abbildung 21</i> Patient F: Erstdiagnose _____	4–51
<i>Abbildung 22</i> Patient F: Rezidivdiagnose. Ausgangsbefund vor Studienbeginn _____	4–51
<i>Abbildung 23</i> Patient F: Rezidivdiagnose 12 Wochen nach Immunisierungsbeginn _____	4–52
<i>Abbildung 24</i> Patient F: Entwicklung des Barthel-Indexes _____	4–53
<i>Abbildung 25</i> Patientin G: Erstdiagnose _____	4–54
<i>Abbildung 26</i> Erythematöse Induration um die Einstichstelle (rote Markierung) _____	5–56
<i>Abbildung 27</i> Überlebenszeiten _____	5–57
<i>Abbildung 28</i> Überlebenszeiten in Wochen nach Erstdiagnose (dunkel) und nach Immunisierungsbeginn (hell) _____	5–57
<i>Abbildung 29</i> Mediane Überlebenszeiten _____	5–58
<i>Abbildung 30</i> Latenzen zwischen initialer Vakzinierung und Auftreten des ersten Rezidivs _____	5–59
<i>Abbildung 31</i> Zeitspannen stabiler Barthel-Index-Werte _____	5–60
<i>Abbildung 32</i> Individuelle T-Lymphozytenzahlen im zeitlichen Verlauf der Studie _____	5–61
<i>Abbildung 33</i> Individuelle NK-Zellzahlen im zeitlichen Verlauf der Studie _____	5–62
<i>Abbildung 34</i> Patientin A : Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–63
<i>Abbildung 35</i> Patient B : Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–64
<i>Abbildung 36</i> Patient C : Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–65
<i>Abbildung 37</i> Patient D : Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–66
<i>Abbildung 38</i> Patientin E: Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–67
<i>Abbildung 39</i> Patient F: Relative Verteilung der Abwehrzellen _____	5–68
<i>Abbildung 40</i> Korrelation mittlerer T-Zellzahlen zu individuellen Überlebenszeiten in Wochen nach Vakzinierungsbeginn _____	5–69
<i>Abbildung 41</i> Korrelation mittlerer T-Zellzahlen mit individuellen Überlebenszeiten in Wochen nach Diagnosestellung _____	5–70
<i>Abbildung 42</i> WHO-Toxizitätskriterien _____	9–96
<i>Abbildung 43</i> Der Barthel-Index _____	9–97

11 Anhang**11.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer**

Arnold	Griss	Krause	Schneider
Aumüller	Gröne	Kretschmer	Schüffel
Barth	Grothe	Kußmann	Schulz
Basler	Grzeschik	Lange	Schwerk
Bauer	Habermehl	Lautenbacher	Seitz
Berger	Happle	Lennartz	Seyberth
Bertalanffy	Havemann	Lorenz	Siegrist
Bien	Hellwig	Maisch	Slenzka
Brilla	Hielscher	Mennel	Steinmetz
Dauch	Hoffmann	Mönnikes	Stempel
Engenhardt-Cabilic	Joseph	Moosdorf	Thomas
Ernst	Kaelble	Mutters	Umstadt
Eschenbach	Kaffarnik	Oertel	Voigt
Fruhstorfer	Kern	Pfab	Wagner
Fuhrmann	Klein	Podszus	Werner
Geus	Klenk	Remschmidt	Westermann
Goke	Klose	Rothmund	Wichert von
Görke	Koolmann	Schachtschabel	Wiegand
Gotzen	Koop	Schäfer	Wiegandt
Gressner	Krieg	Schmidt	Wilke
Grimm	Kroll	Schmitz-Rohde	Wolf

11.2 Danksagung

Für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Studie sowie die notwendige Geduld und Energie, Hilfestellung bei der Lösung immer neu auftretender Fragen und Probleme auf dem Wege der Verschriftlichung zu leisten, danke ich dem Betreuer der vorliegenden Dissertation, Herrn Dr. med. Ralf Becker, leitender Oberarzt der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg.

Dank gilt ebenfalls meinen Lehrern Herrn Prof. em. Dr. med. B. L. Bauer, unter dessen Leitung die Arbeit begonnen wurde sowie Herrn Prof. Dr. med. H. Bertalanffy, der die Fortführung der Untersuchung ermöglichte und durch sein Interesse am Thema zusätzlichen Ansporn lieferte.

Herrn Prof. Dr. med. H.D. Mennel, Leiter der Abteilung für Neuropathologie der Universitätskliniken Marburg, danke ich für die freundliche Überlassung der histopathologischen Befunde.

Ebenso gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. em. H. Wiegand sowie Richard Jenemann und Tanja Greif für die stets freundliche und tatkräftige Unterstützung in der Bereitstellung der Glykosphingolipiddaten als auch für die freundschaftliche Atmosphäre unserer Zusammenarbeit.