

Aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss des Immunisierungszeitpunktes und der Tumorlast
bei der Immuntherapie des Mammakarzinoms mit Anti-
Idiotypen-Antikörpern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sascha Thilo Schmidt-Nicolai aus Bonn-Bad Godesberg
Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 10.06.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: **Prof. Dr. med. Matthias Rothmund**

Referent: **Prof. Dr. med. Uwe Wagner**

1. Korreferent: **Prof. Dr. med. Peter Barth**

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1	Allgemeine Einführung	7
1.2	Tumorimmunologie	7
1.2.1	Tumorantigene	7
1.2.2	Tumorimmunität	8
1.2.3	Tumorinvasion	9
1.3	Tumorimmuntherapie	11
1.3.1	Rolle der monoklonalen Antikörper bei der Immuntherapie.....	13
1.4	Idiotypennetzwerk	15
1.4.1	Netzwerktheorie von Nils Jerne	15
1.4.2	Das Idiotypennetzwerk der 2. Generation	16
1.5	Erfahrungen mit CA 125 beim Ovarialkarzinom	18
1.6	Mammakarzinom.....	19
1.6.1	Epidemiologie.....	19
1.6.2	Ätiologie	20
1.6.3	Histologie.....	20
1.6.3.1	Nicht invasive Karzinome	20
1.6.3.2	Invasive Karzinome	21
1.6.3.3	Einteilung der Mammakarzinome durch die WHO (1981) in zwei histologische Gruppen:	21
1.6.4	Pathologie und Ausbreitung	22
1.6.4.1	Grading	23
1.6.5	Diagnose	25
1.6.6	Therapie	27
1.6.6.1	Primärtherapie	28
1.6.6.2	Adjuvante systemische Therapie	29
1.6.6.3	Grenzen der Therapie	32
1.7	Das tumorassoziierte Antigen CA14C5 und seine Interaktion mit MAk 14C5	33

1.7.1	Das 14C5 Molekül.....	33
1.7.2	Der monoklonale Antikörper MAk 14C5.....	35
1.7.2.1	Ergebnisse der Zell-Adhäsions-Inhibitions-Experimente	35
1.7.3	Zusammenfassung	36
1.8	Anti-Idiotypen-Antikörper für 14C5	37
1.8.1	Herstellung und Charakterisierung.....	37
1.8.1.1	Produktion eines monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpers	37
1.8.1.2	Herausfiltern von Idiotyp-bindenden Antikörpern (Ak2)	37
1.8.1.3	Anti-Idiotyp Inhibitionssassay.....	38
1.8.1.4	In-vitro Produktion und Reinigung des anti-idiotypischen Antikörpers ACA14C5.....	39
2	Zielsetzung.....	40
2.1	Versuch I - Etablierte Tumore- Hohe Tumorlast.....	40
2.2	Versuch II - Prophylaktische Immunisierung.....	40
3	Experimenteller Ansatz	42
3.1	Tierversuchsbeschreibung	42
3.1.1	Verwendete Materialien	42
3.1.1.1	Der Antikörper MAkACA14C5-1 aus dem Hybridomaklon 5C.....	42
3.1.1.2	Das Maus-Immunglobulin.....	42
3.1.1.3	Die Zelllinie HH-16 Klon 2/1.....	42
3.1.1.4	Versuchstiere	44
3.2	Versuchsplan	44
3.2.1	Versuchsplanung	44
3.2.1.1	Tumor-Last Versuch (TL)	44
3.2.1.2	Prophylaktische Immunisierung (PI).....	44
3.3	Versuchsdurchführung:	45
3.3.1	Tumorimplantation	45
3.3.1.1	TL Gruppe	45
3.3.1.2	PI Gruppe.....	45
3.3.2	Immunisierungen	45
3.3.2.1	TL Gruppe	46
3.3.2.2	PI-Gruppe	46

3.3.3	Datenerfassung:	46
3.3.3.1	Erläuterung zur Auswertung der Ergebnisse:	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Einleitung in die Ergebnisse	48
4.2	Einzelfallanalyse.....	49
4.2.1	Versuch TLC	49
4.2.1.1	Gruppe A (n=7)	49
4.2.1.2	Gruppe B (n=7).....	51
4.2.1.3	Gruppe C (n=4).....	52
4.2.1.4	Erkrankungszustände am Versuchsende:	53
4.2.2	Versuch PI	54
4.2.2.1	5 Millionen Tumorzellen	54
4.2.2.2	10 Millionen Tumorzellen	55
4.2.2.3	25 Millionen Tumorzellen	57
4.2.2.4	Erkrankungszustände am Versuchsende:	59
4.3	Gruppenanalyse	61
4.3.1	Versuch TLC	61
4.3.1.1	Allgemeine statistische Beobachtung	61
4.3.1.2	Endpunktbeobachtung.....	62
4.3.1.3	Beobachtung des Kurvenverlaufs	62
4.3.2	Versuch PI	63
4.3.2.1	Allgemeine statistische Beobachtung.....	63
4.3.2.2	Endpunktbeobachtung.....	63
4.3.2.3	Beobachtung des Kurvenverlaufs	64
5	Diskussion	67
5.1	Tumorimmuntherapie	67
5.2	Anti-Idiotypen zur Immuntherapie	70
5.3	Bewertung der Versuchsergebnisse	72
5.3.1	TLC-Versuch	72
5.3.2	PI-Versuch	74
5.4	Ausblick zur klinischen Anwendung und Bedeutung des Anti-Idiotypen Antikörpers.....	77

5.5	Überlegung zur generellen Anwendung einer Immuntherapie in der Onkologie.....	78
6	Zusammenfassung	80
7	Abkürzungsverzeichnis	83
8	Literaturverzeichnis	84
9	Summary/Abstract	96
10	Verzeichnis akademischer Lehrer:	97
11	Danksagung	97
12	Anhang.....	98
12.1	Versuch I TLC:	98
12.2	Versuch II PI.....	107

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die Immuntherapie ist in den letzten Jahren immer mehr zu einem Hauptgegenstand der onkologischen Forschung geworden. Sie beschreitet neue Wege in der Therapie onkologischer Erkrankungen, indem sie in das patienteneigene, individuelle Immunsystem mit seinem zum Teil noch unüberschaubaren Potential eingreift. Durch eine Modulation dieses Immunsystems kann der Patient selbst auf vielfältige Art und Weise gegen seine Tumorzellen aktiv werden. Bislang ist die Immuntherapie nicht als eigenständige Therapie der ersten Wahl etabliert. Die meisten immuntherapeutischen Ansätze werden additiv angewendet nach Stabilisierung der Erkrankung mit etablierten konventionellen onkologischen Therapien. (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1994; Beverley, 1995; Herlyn et al., 1996). Mit Trastuzumab (Herceptin®) ist der erste Antikörper im September 2000 in der Behandlung des Mammakarzinomes zugelassen worden. Es steht zu erwarten, dass sich in den nächsten Jahren noch weitere immuntherapeutische Ansätze in der Therapie onkologischer Erkrankungen etablieren werden.

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Tumorantigene

Tumorzellen besitzen an ihrer Oberfläche Antigene, die tumorassoziierte Antigene (TAA) genannt werden. Man unterscheidet unterschiedliche Arten von TAA's. Neoantigene sind TAA's, die diese Zellen noch nie besessen haben. Onkofetalantigene sind Antigene, die schon einmal in der Fetalperiode exprimiert worden sind (Riede et al., 1995). Die TAA's können nach Wettendorff et al. (1990) in drei Klassen eingeteilt werden: Klasse-I TAA's werden nur auf einem individuellen Tumor und nicht auf anderen Tumoren desselben histologischen Typs oder normalen Zellen exprimiert. Klasse-II TAA's können von allen Tumoren eines histologischen Typs bei verschiedenen Individuen, nicht aber bei normalen Zellen exprimiert werden. Klasse-III TAA's werden sowohl bei normalen als auch bei Tumorzellen exprimiert, jedoch

ist die Dichte bei den Tumorzellen wesentlich höher. Die TAA's ermöglichen nun dem Immunsystem, die Tumorzelle als solche zu erkennen und anzugreifen.

In vivo mutierende somatische Zellen können im Regelfall vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden. Ist das Immunsystem geschwächt, wie zum Beispiel durch eine HIV-Infektion oder medikamentöse Immunsuppression, so findet man bei diesen Patienten eine erhöhte Tumorzinzidenz (Janeway et al.; 1995). Entziehen sich Tumorzellen einer Detektion durch das Immunsystem oder erschweren sie diese, so kann sich ein Tumor bilden. In histologischen Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass die Mehrzahl der Tumoren mit inflammatorischen Zellen infiltriert ist (Beverly, 1995). Es lassen sich sowohl zellgebundene als auch humorale Immunreaktionen nachweisen. Zu den humoralen Reaktionen führen Antikörper, die gegen die TAAs gerichtet sind. Sie lösen entweder durch ihre Bindung eine Komplementreaktion aus oder aktivieren Killerzellen, natürliche Killerzellen und armierte Makrophagen. Bei der zellulären Immunantwort kommt der T-Zell-Reaktion eine zentrale Rolle zu. Nach Erkennung der TAAs wird der Zelltod durch die Freisetzung von zytotoxischen Substanzen herbeigeführt. Tumorwachstum und Immunologie des Organismus beeinflussen sich gegenseitig.

Ein funktionierendes Immunsystem ist somit eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche körpereigene Tumorbekämpfung.

1.2.2 Tumormunität

Tumorzellen besitzen die Möglichkeit, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen.

Hierbei gibt es mehrere Möglichkeiten:

Tumore können eine geringe Immunogenität ausprägen. Sie besitzen dann keine spezifischen antigenen Peptide, oder es fehlen die Adhäsions- oder costimulierenden Moleküle, die zum Auslösen einer T-Zell-Antwort nötig sind.

Tritt das Immunsystem in Kraft und greift Antigene auf der Tumoroberfläche an, kann es zu einer antigenen Modulation kommen, indem die mit Antikörpern besetzten Oberflächenantigene von der Zelle aufgenommen werden und dadurch keine immunologische Wirkung mehr haben. Es findet somit eine Antigenselektion statt.

Tumorzellen können Faktoren sezernieren, die zum einen die T-Zellen direkt hemmen oder über die Aktivierung von T-Suppressorzellen wirken.

Langsam wachsende Tumore können stetig eine geringe Menge von TAA ins Blut abgeben und somit das Immunsystem nach dem Prinzip der Desensibilisierung tolerant machen (Janeway et al.; 1995). Ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren der Immunmodulation bestimmt in der Regel die Wachstumstendenz des malignen Tumors im Organismus.

1.2.3 Tumorinvasion

In malignen Tumoren finden verschiedene Veränderungen statt, die es ihnen ermöglichen, den Zellverband zu verlassen und in versprengter Lokalisation weiter zu wachsen. Diese Veränderungen bestimmen invasives Wachstum und Metastasierung. Man beobachtet sodann Einwandern (Infiltration) in das sie umgebende Gewebe und Einbrechen in Lymph- und Blutgefäße (Invasion). Hierbei wird das umliegende Gewebe zerstört. Es wird von einigen Autoren angenommen, dass manche Tumorzellen die Möglichkeit besitzen, umliegende Zellen dahingehend zu beeinflussen, dass diese maligne Eigenschaften entwickeln. (Coene et al., 1997).

Durch Veränderungen der Genstruktur in der Mutation verlieren die Tumorzellen basisbiologische Hemmmechanismen, die ein unkontrolliertes Wachstum im Zellverband verhindern sollen. Dies ist der Verlust der Kontaktinhibition. Hierbei ist die Signalkette von Transmembranproteinen, membranständigen Zytoskelettverankerungsproteinen und Zytoskelettsignalen gestört. So können die Zelladhäsionsmoleküle keinen Proliferationsstopp mehr vermitteln. Viele bösartige Tumorzellen besitzen auch eine erhöhte negative Ladung, erzeugt durch die Carboxylgruppen der Sialinsäure, die dazu führt, dass abstoßende Kräfte unter den Zellen entstehen und sie sich leicht aus dem Zellverband lösen können. Veränderte Zelladhäsionsmoleküle tragen auch noch zu einem erhöhten zellulären Kohäsionsverlust (Zytodiskohäsivität) bei (Bannasch et al., 1982; Grundmann 1981; Klaunig und Ruch, 1990; Liotta et al., 1983, Riede et al., 1995).

Um aktiv einen Zellverband invadieren zu können, benutzen die Tumorzellen extrazellulär wirksame Proteasen und Hyaluronidasen, die die extrazelluläre Matrix angreifen und ihnen die Migration ermöglichen (Barsky et al, 1983, Liotta et al. 1983).

Gegen normale Zellen können sie zytoaktive Substanzen bilden, die die Nachbarzellen zur Apoptose treiben oder direkt zytotoxisch wirken. Sie können auch mit ihren Nachbarzellen verschmelzen und so ihre malignen Eigenschaften an gesunde Zellen weitergeben.

Die Metastasierungstendenz der verschiedenen Tumoren wird durch diese multimodalen Zelleigenschaften patientenindividuell mitbestimmt.

.

1.3 Tumorimmuntherapie

Die Mechanismen, deren sich das Immunsystem bedient, um Infektionen und Tumorwachstum zu bekämpfen, sind sehr vielfältig. Es existieren diverse wissenschaftliche Ansätze zur Beeinflussung immunogener Abläufe im Organismus zum Zwecke der Tumorerkennung und Bekämpfung. Tabelle 1 stellt die grundsätzlichen Ansätze, das Immunsystem in diese Richtung zu beeinflussen, dar.

Erste Versuche, mit einer aktiven unspezifischen Immuntherapie das Immunsystem generell zu aktivieren und so eine verbesserte Immunantwort zu induzieren, sind leider nur bei wenigen Tumorarten und -lokalisationen erfolgreich. Die intraläsionale Verabreichung beim Melanom und die intravesikale Instillation von BCG bei Blasen Tumoren sind anerkannte Verfahren (Huland et al. 2006). Levamisol ist eine halbsynthetische niedermolekulare Substanz, die die Funktion von T-Lymphozyten,

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Ansätze der Immuntherapie von Tumoren (modifiziert nach Beatty, 1992 und Beverley, 1995)

Aktiv	<i>Unspezifisch</i>	Immunstimulation mit adjuvanten Agenzien wie BCG, Corynebacterium parvum, Levamisol
	<i>Spezifisch</i>	Präventive Vakzine aus Tumorzellen, Zellextrakten, gereinigten oder rekombinanten Antigenen oder Idiotypen (z.B. wird ein nichtspezifisches Immunadjuvans mit einem TAA kombiniert, so daß sich eine tumorspezifische Immunität entwickeln kann); Monoklonale Antikörper (Ak2)
Passiv	<i>Unspezifisch</i>	Adaptive Immuntherapie (= Immuntherapie mit Zellen des Immunsystems) z.B. mit LAK-Zellen; Biologische „Response Modifier“ (regulatorische Polypeptide) = Zytokine
	<i>Spezifisch</i>	Monoklonale Antikörper allein (Akl) oder als Immunkonjugat mit Wirkstoffen, Wirkstoffvorstufen, Toxinen, Enzymen oder Radioisotopen gekoppelt; Bispezifische Antikörper, T-Zellen (TIL-Zellen)
	<i>Kombiniert</i>	LAK-Zellen und bispezifische Antikörper; response modifier und monoklonale Antikörper; Radioimmuntherapie und Immunotoxine

Makrophagen und Neutophilen steigern kann und mit Erfolg bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms angewandt wird (Beatty, 1992).

Bei der aktiven spezifischen Immuntherapie werden, wie bei den bekannten aktiven Impfungen, Tumorantigene, wie z. B. Tumorzellen oder Zellextrakte, mit spezifischen Immunadjuvantien kombiniert, injiziert. Diese sollen dann eine spezifische Antikörperproduktion (Ak1) gegen den Tumor induzieren (Beatty 1992; Reinartz et al. 2006). So kombinierten Hanna et al. (1987) enzymatische dissoziierte autologe Karzinomzellen mit BCG zu einer Vakzine.

Bei der passiven unspezifischen Immuntherapie versucht man die Eigenschaften der zytotoxischen Substanzen des Immunsystems zu nutzen. Es werden modifizierte Zellen des Immunsystems eingesetzt oder Zytokine direkt verabreicht. Inkubiert man monoklonale Zellen des peripheren Bluts mit IL-2, so bekommen sie hoch zytotoxische Eigenschaften hinsichtlich einer Vielzahl von Tumorzielstrukturen. Doch ist die direkte Gabe von IL-2 sehr toxisch, was die in vivo Anwendung stark einschränkt. Es gibt allerdings auch noch Erfolg versprechende Ansätze mit Interferon- α/γ und Tumornekrosefaktor- α . In einem neueren Versuchsansatz wird die Wirkung von Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Tierversuch getestet (Beverley, 1995; Herlyn et al.; 1996; Eiermann, 1998).

Die passive spezifische Immuntherapie entspricht wieder dem Prinzip der passiven Impfung. Oft werden die monoklonalen Antikörper (Mak) mit Pharmaka, Toxinen oder Enzymen kombiniert, um an der entsprechenden Tumorzelle an zu binden und somit den Wirkstoff direkt am gewünschten Wirkungsort zu plazieren. Mit diesem „Immuntargeting“ können die Nebenwirkungen im Vergleich zur systemischen Gabe reduziert werden. (Takahashi et al., 1988; Schneck et al. , 1990, Senter at al, 1990). Mit radioaktiv markierten Mak's können mit Hilfe nuklearmedizinischer Detektionsmethoden unterschiedliche Karzinome lokalisiert werden. Beatty et. al., (1992) wandten dieses Verfahren zuerst beim kolorektalen Karzinom an. Durch zwei andere Arbeitsgruppen um Bast et al., 1981 und Thor et al., 1987 wurde das Ovarialkarzinom detektiert.

1.3.1 Rolle der monoklonalen Antikörper bei der Immuntherapie

Viele Therapieansätze versuchen, die Immuntoleranz des Körpers gegenüber seinem Tumorgeschehen aufzuheben und bedienen sich dabei oben erwähnter Ansätze. Der bisher auf breiter Basis Erfolg versprechendste Ansatz scheint die Therapie mit Mak's zu sein. Die Gründe hierfür liegen in folgenden Grundüberlegungen:

- 1) Die Herstellung aus Hybridomazellen ist standardisiert und das Reagenz ist bei entsprechender Produktionsnormierung garantiert viren- und toxinfrei.
- 2) Die Applikation beinhaltet nicht das Risiko, dass es zu induzierten Krankheitsverläufen oder klassischen „Impfzwischenfällen“ wie bei attenuierten Viren oder Bakterien kommen kann.
- 3) Durch einen spezifischen Ansatzpunkt bleiben gravierende systemische Nebenwirkungen, wie bei der Gabe von allgemein stimulierenden Substanzen wie Interleukin, in der Regel aus.

Monoklonale Antikörper führen zu einer Induktion des humoralen und zellulären Immunsystems. Dies kann deutlich positive Effekte auf Tumorwachstum und Überlebenszeit haben. (Wagner et al., 1994)

Mit als erste wurden die Auswirkungen des Mak gegen das karzinogene Antigen (CEA) TAG-72 und CO17-1A des kolorektalen Karzinoms untersucht (Beatty, 1992; Foon et al., 1995; Herlyn et al., 1996; Pervin et al., 1997). Die Ergebnisse waren so beeindruckend, dass die Firma Glaxo Wellcome 1194 MoAB17-1A unter dem Namen „Panorex®“ auf den Markt brachte. Die Zulassungsstudie von Riethmüller et al. belegte, dass mit dieser passiven spezifischen Immuntherapie bei Patienten mit reseziertem kolorektalen Karzinom im Stadium Dukes C bei einer medianen follow-up-Zeit von 5 Jahren die Gesamttodesrate um 30% und die Rezidivrate um 27% reduziert werden konnten.

Auch im Bereich des Mammakarzinoms gibt es erfolgreiche Ansätze mit Mak's. 1998 konnte die adjuvante passive Immuntherapie mit Anti-HER2-Antikörpern (Trastuzumab) in den USA zugelassen werden. Das Antigen HER2/neu ist ein Transmembranprotein mit struktureller Verwandtschaft zur Familie der Epidermal-Groth-Factor-Rezeptoren mit erhöhter Expressionsrate bei 20-30% der Mammakarzinomfälle (Baselga et al., 1998; Press et al. 1993). Trastuzumab inhibiert die Proliferation von HER2/neu überexprimierenden Tumorzellen und wird als

adjuvante Therapie nach Chemotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel angewendet. Die Inhibition konnte bisher durch den Nachweis einer Antikörper abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) erklärt werden (Hotaling et al., 1996 Pegram et al., 1997). Weitere synergistische Effekte sowohl in vitro als auch in vivo konnten Pigram et al. (1997) aber auch in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika nachweisen.

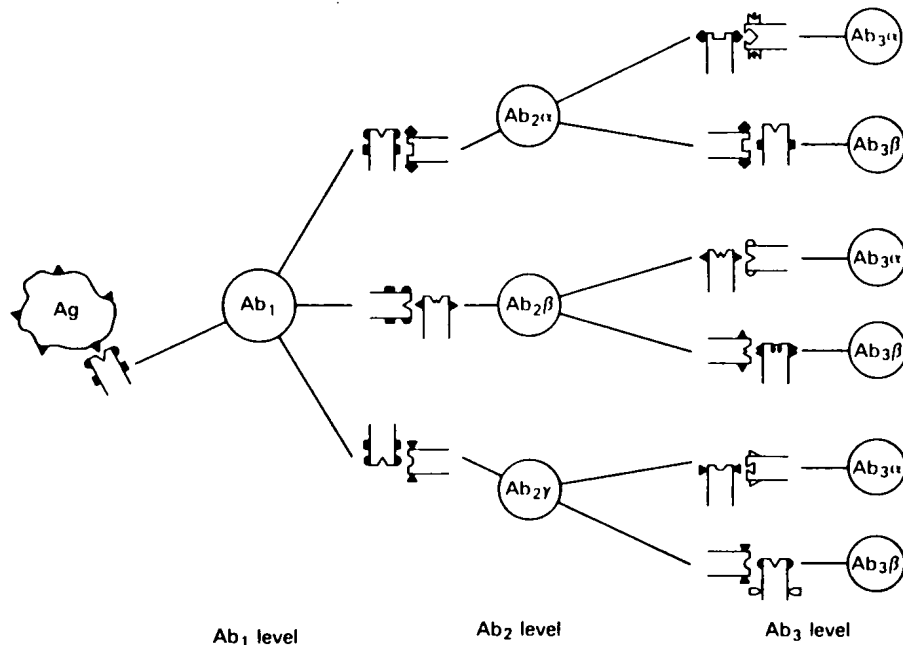
Auf dem Gebiet der Immuntherapie mit anti-idiotypischen Antikörpern wurden bisher beim malignen Melanom mit dem Einsatz von anti-HMW-MAA (HMW-MAA= human high molecular weight melanoma-associated antigen) eine humorale Immunreaktion erreicht und eine Verlängerung der Überlebenszeit festgestellt (Bender et al., 1997; Mittelman et al., 1992). In Tierversuchen wurden von Uemura et al. (1994) bei dem Einsatz von antiidiotypischen Mak's bei Nierenzellkarzinomen und von Chakraborty et al (1995) gegen Mammakarzinom von assoziierten Antigenen deutliche Anti-Tumoreffekte erzielt.

Das Ziel, das Abwehrsystems des Karzinomträgers zu aktivieren und ihm zu ermöglichen, aktiv gegen einen Tumor vorzugehen, kann mit Hilfe der anti-idiotypischen und auch der einfachen MAK's erreicht werden. Die genauen Mechanismen der Wirkungsweise von Mak's sind bisher noch nicht genau erforscht, da die Einflüsse der einzelnen Komponenten des Immunsystems sehr unterschiedlich sind. Niels Jerne hat allerdings eine Theorie entworfen, die einen Einblick in die Möglichkeiten der Interaktion der einzelnen Komponenten gibt. Diese wird im Folgenden näher erläutert.

1.4 Idiotypennetzwerk

1.4.1 Netzwerktheorie von Nils Jerne

Um effektiv in das Immunsystem eingreifen zu können, muss man seine Wirkungs- und Regulationsmechanismen kennen. 1974 stellte Nils Jerne die Theorie des Idiotypennetzwerkes vor, die den Grundstein des heutigen Verständnisses bildet. Jerne postuliert, dass jeder Ak eine Doppelfunktion hat. Er stellt zum einen mit einem Paratop auf der variablen Region einen ein spezifisches AG bindenden Bereich dar, und zum anderen stellt er mit mehreren Epitopen, die sich ebenfalls auf der variablen



Ein fremdes Epitop (Dreieck) induziert eine Immunantwort über die Produktion von Ab1 Antikörpern. Ab1 erzeugt eine anti-idiotypische Antwort (Ab2), die aus drei Untergruppen besteht: Ab2 α erkennt einen nicht paratopischen Idiotypen auf Ab1, der fern des Antigenbindenden-Abschnitts liegt (quadrat). Ab2 γ erkennt einen nicht paratopischen Idiotypen auf Ab1, der paratop nah liegt und mit dem Antigenbindenden-Abschnitt in Verbindung steht (Halbkreis). Ab2 β präsentiert das interne Abbild des ursprünglichen Antigenepitops und ist somit paratopisch. Jede Untergruppe von Ab2 kann nun wiederum eine anti-anti-idiotypische Reaktion hervorrufen (Ab3). Die Ab3 Antwort ist relativ komplex und hängt sehr von der Art des induzierenden Ab2 AK ab. Hier sind nur einige Untergruppen dargestellt.

Ab3 β präsentiert das interne Abbild von dem Epitop einschließlich des korrespondierenden Ab2, die Untergruppen von Ab3 β AK, die von Ab2 α oder Ab2 γ induziert wurden, entsprechen Ab1. Ab3 α AK sind gegen die Idiotypen verschiedener Ab2 Antikörper gerichtet. Ab3 α AK, die gegen Ab2 β gerichtet sind, haben dieselbe Antigen-bindende Stelle wie Ab1. Für jeden Antikörper ist eine V-Region dargestellt.

Abbildung 1: Idiotypische Netzwerk Kaskade (nach Cerney und Hiernaux, 1990)

Region befinden und in ihrer Gesamtheit einen Idiotypen bilden, selbst ein Antigen dar, das wiederum von anderen Ak detektiert und gebunden werden kann. Den bindenden AK nennt man Antiidiotypischen-Antikörper. Durch diese Eigenschaften ist eine folgendermaßen ablaufende Eigenregulation möglich: Das Paratop des AK (Ab1) ist gegen ein fremdes Antigen E gerichtet und gegen einen Idiotyp eines anderen AK. Dieser AK (Ab2) besitzt das „internal image“ des AG. Gegen den Idiotypen des AK2 richtet sich das Paratop eines weiteren AK (Ab3). Dieser ähnelt nun dem Ab1. Abbildung 1 stellt den Ablauf einer solchen idiotypischen Netzwerkkaskade genauer dar.

Die Regulation erfolgt nach Jerne hauptsächlich durch Suppression. Dadurch kann die unkontrollierte Proliferation einzelner Klone verhindert werden. Durch die Präsenz von Ab2 kann sowohl die Bildung von Ab1 als auch Ab3 supprimiert werden, um so einen spezifischen regulatorischen Feedback-Mechanismus innerhalb des Immunsystems zu erhalten. Die Immunreaktion auf ein Antigen wird aber nicht signifikant supprimiert (Jerne, 1974; Pollock, B.A. et al.; 1984), sondern es wird wieder ein Gleichgewicht hergestellt, das die Verteilung des Repertoires erhält und eine ungewünschte Selektion verhindert. Somit könnte man postulieren, dass die Funktion des Netzwerks, die beim adulten Organismus überwiegend über Suppression gesteuert wird, dazu dient, die Vielfalt der Antikörper zu erhalten. Das Immunsystem hat somit eine Kontrollmöglichkeit über die Rezeptorverteilung. Die in großer Zahl vorhandenen Rezeptoren werden supprimiert, die unterrepräsentierten können sich ungehindert vermehren (Janeway et al., 1995).

1.4.2 Das Idiotypennetzwerk der 2. Generation

Das Netzwerkmodell Jernes beschränkte sich leider auf die B-Lymphozyten und wurde in letzter Zeit durch ergänzende Modelle erweitert. Es wurde versucht, auch das T-Zellsystem in die Netzwerktheorie mit einzubeziehen. Es konnte gezeigt werden, dass der T-Zell-Rezeptor (TCR) Regionen besitzt, die zahlreiche idiotypische Determinanten exprimieren und somit als idiotypische und antiidiotypische Lymphozyten miteinander reagieren können. (Cerney und Hiernaux, 1990; Roit, 1993; Varela und Coutinho, 1991).

Im Tierversuch konnte eine T-Zell-Antwort erzeugt werden, wenn man Mäuse mit synergem monoklonalem Immunglobulin immunisiert, welches einen definierten Idiotypen besitzt, der von der T-Zelle erkannt wird. Somit können Anti-idiotypische - Zellen durch Immunisierung mit Idiotyp-Molekülen aktiviert werden, was sie als wichtige Zellen der Immunantwort in das Netzwerk einbindet (Cerny und Hiernaux, 1990).

Eine Netzwerkkaskade auf der Basis dieser Erkenntnisse könnte folgendermaßen aussehen.:

Ein Ak1 induziert die Bildung von Ak2 Immunglobulin durch einen B2-Lymphozyten. Der Ak2 ist gegen die variable Region von Ak1 gerichtet und imitiert das ursprüngliche Antigen. Antigen-präsentierende Zellen (APC) verarbeiten die Ak1 und Ak2 als Idiopeptide und präsentieren sie mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Dieser Komplex kann eine spezifische T-Zell-Antwort induzieren, indem die TH2- bzw. TH3-Zellen zur weiteren Aktivierung von B2- bzw. B3-Lymphozyten führen, die dann Ak2 bzw. Ak3 produzieren oder T-Suppressorzellen aktivieren. Eine unabhängige Aktivierung der Idiotyp-reaktiven-Th1/2/3-Zellen ermöglicht die selbständige Verarbeitung der Antigene und Assoziation zum MHC-Komplex durch B-Zellen.

1.5 Erfahrungen mit CA 125 beim Ovarialkarzinom

CA 125 ist ein TAA auf Ovarialkarzinomzellen, mit dem Wagner et al. immuntherapeutische Versuche durchführten. Die Arbeitsgruppe begann mit einer retrospektiven Studie mit 12 Patientinnen, die an einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom litten. Sie erhielten aus diagnostischen Gründen den monoklonalen Antikörper OC125 (Mak OC125= Ab1), der gegen das tumorassoziierte Antigen (TAA) CA125 gerichtet ist. Bei fünf von diesen zwölf Patientinnen konnte eine Produktion von spezifischen anti-idiotypischen (Ab2) Antikörpern festgestellt werden, welche das Ca125 imitierten. Bei diesen anti-idiotyp positiven Patientinnen konnte ein verlängertes Gesamtüberleben festgestellt werden, welches von der Arbeitsgruppe auf eine eventuell veränderte Immunitätslage zurückgeführt wurde (Wagner 1993,1995; Wagner et al. 1994a). Durch die Anwesenheit eines dem TAA gleichen Antigens in einer anderen Umgebung und generischen Form, diese dann in Form eines antiidiotypischen Antikörpers, könnte eine zelluläre und humorale Immunreaktion induziert worden sein (Wagner, 1993).

Es wurde die Vakzination mit Mak OC 125 in einer prospektiven Studie untersucht. Die Ergebnisse waren ermutigend: Patientinnen, die eine starke Bildung von Ab2 zeigten (high-reponder), besaßen eine erhöhte Überlebensrate, auch zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der Applikationen (Schmolling et al., 1995). Patientinnen mit drei oder mehr Applikationen überlebten signifikant länger als Patientinnen mit weniger als drei Applikationen (Wagner, 1995). Leukozyten-Migrations-Inhibitorstest und die Plasmakonzentrationen der immunologischen Markerparameter IL-6, sCD8- und sIL-2-Rezeptoren bei den Patientinnen weisen auf eine verbesserte Immunitätslage hin (Wagner et al.1993a, 1993b).

Daraufhin wurde in Laborversuchen ein muriner antiidiotypischer Antikörper ACA 125 (Ab2) generiert und im Tiermodell getestet. Dieser imitiert das TAA CA125 funktionell und stellt somit einen internal-image-Antikörper dar. Nach der Applikation der F(ab)² Fragments des ACA 125 konnte die Produktion von IgG- und IgM-Antikörpern, die sowohl an ACA 125 als auch an CA 125 binden, nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es im Tiermodell eine zellspezifische Immunreaktion gegen CA 125-exprimierende Tumorzellen gibt. Es

wurden eine nicht-MHC-restringierte zellvermittelte Zytotoxizität, eine komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) und eine antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) nachgewiesen (Schlebusch et al., 1995; Wagner, 1995, Wagner et al., 1994b).

Es folgte in einer Phase-I-Studie die klinische Prüfung des ACA125 bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom. Unter anderem wurden hier die Nebenwirkungen und die immunologischen Reaktionen untersucht. Nur bei einer Patientin konnten Nebenwirkungen festgestellt werden. Diese traten in Form von Bauchschmerzen 2-3 Tage nach Immunisierung auf (Wagner 1995). Die Bindung des Antikörpers an wichtige Organstrukturen konnte durch Ganzkörperszintigraphie bei radioaktiver Markierung des Antikörpers mit Jod 123 ausgeschlossen werden (Wagner, 1997).

Zusammenfassend konnte folgende immunologische Reaktion gezeigt werden:

Neun von sechzehn Patientinnen bildeten anti-ACA125-Antikörper, die an gereinigtes CA125 banden. Bei diesen neun Patientinnen konnte eine Lyse der CA125-tragenden Tumorzellen durch periphere Blutlymphozyten (PBL) nachgewiesen werden. Gerade diese Patientinnen hatten das größte klinische Benefit. Bei drei Patientinnen war zusätzlich ein erhöhter Interferon- γ -Spiegel festzustellen.

Es wurde bei allen Patientinnen mit Ab3-Produktion ein längeres tumorfreies Intervall, sowie eine längere Überlebenszeit festgestellt. In zwei Fällen konnte sogar eine Regression solider Tumormassen nachgewiesen werden. Die Fallzahlen waren allerdings zu klein, um signifikante Ergebnisse zu liefern (Wagner et al., 1997).

Diese Ergebnisse sind sehr ermutigend und werden nun auch bei der Entwicklung eines immunologischen Therapiekonzepts beim Mammakarzinom, mit dem sich diese Dissertation beschäftigt, verwandt.

.

1.6 Mammakarzinom

1.6.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist bei Frauen bei weitem die häufigste Krebstodesursache. In der Altersgruppe zwischen dem 39. und 58. Lebensjahr ist das Mammakarzinom sogar in der Einzeltodesstatistik führend. Der Anteil an der Gesamtmortalität beträgt in

Deutschland im Jahre 1995 19,6% ; an zweiter Stelle steht Darmkrebs mit 14.25%. Seit Ende der 80er Jahre deutet sich eine Stagnation auf diesem hohen Niveau an. Die Inzidenz beträgt 100/100000. Der Altersmedian liegt bei 57 Jahren, wobei die Inzidenzrate mit steigendem Lebensalter zunimmt. Der Altersgipfel liegt in der 7. Lebensdekade, mehr als jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und über 3% aller Frauen sterben an dieser Erkrankung. (Bastert et al. 1994; Becker et al., 1997; Gause et al. 1994).

1.6.2 Ätiologie

Die Ursache des Mammakarzinoms ist unbekannt. Es gibt jedoch epidemiologische Beobachtungen, die gewisse Risikofaktoren als gesichert ansehen lassen. Dazu gehören eine frühe Menarche und eine späte Menopause. Kinderlosigkeit und eine erstmalige Schwangerschaft mit über 35 Jahren erhöhen das Risiko ebenfalls. Auch die Anwendung von oralen Kontrazeptiva sowie postmenopausaler Hormonsubstitution erhöhen das Risiko leicht. Die Verminderung des Risikos an anderen Krebsarten zu erkranken darf hierbei aber nicht unberücksichtigt bleiben. Die Existenz von genetischen Faktoren, die zu sog. Brustkrebsfamilien führen, ist schon lange bekannt. Man geht heute davon aus, dass 4-9% aller Brustkrebsfälle erblich bedingt sind. Der Nachweis des BRCA 1 Gens (17q21) geht mit einem >60%igem Brustkrebsrisiko vor dem 50. Lebensjahr einher. Als exogene Faktoren können nur eine erhöhte Strahlenexposition und ein erhöhter Nahrungsfettgehalt als gesichert angesehen werden (Bastert et al. 1994; Possinger 1997).

1.6.3 Histologie

Lebeau et al. beschreiben die derzeit gültige histologische Klassifikation der Mammakarzinome als Modifikation der WHO-Klassifikation (1991) durch Rosen und Obermann (1992) wie folgt:

1.6.3.1 Nicht invasive Karzinome

- Intraduktales Karzinom (CDIS)
mit Paget-Erkrankung der Brustwarze
- Lobuläres Carcinoma in Situ (CLIS)

1.6.3.2 *Invasive Karzinome*

- invasives duktales Karzinom mit Paget-Erkrankung der Brustwarze
- invasives duktales Karzinom mit prädominierender intraduktaler Komponente
- invasives lobuläres Karzinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom
- invasives papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- sekretorisches (juveniles) Karzinom
- apokrines Karzinom
- Karzinom mit Metaplasie
- Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
- Zystisch-hypersekretorisches Karzinom mit Invasion
- Karzinom mit endokriner Differenzierung
- glycogenreiches Karzinom
- lipidreiches (lipidbildendes) Karzinom
- invasives kribriiformes Karzinom

Mammakarzinome sind maligne Proliferationen des Drüsengewebes der Mamma. Man unterscheidet duktale und lobuläre Karzinome, wobei man annimmt, dass 85% aller Mammakarzinome aus den terminalen Duktusepithelien hervorgehen. In den meisten Fällen halten sich die Karzinome zunächst an die natürlichen Grenzen, die durch die Milchgänge oder Drüsenläppchen gebildet werden. (Gause 1994; Schmidt-Matthiesen 1995; Riedel et al. 1993).

1.6.3.3 *Einteilung der Mammakarzinome durch die WHO (1981) in zwei histologische Gruppen:*

- Nicht invasiv:
Die prämaligen Veränderungen sind ihrem Ursprung nach ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt: das Carcinoma ductale in situ (CDIS) und das Carcinoma lobulare in situ CLIS. Nach einigen Autoren stellt hierbei nur das CDIS eine echte

Präkanzerose dar, da sich nur aus einem Drittel der (CLIS) Fälle innerhalb von 20 Jahren ein invasives Karzinom entwickelt.

- **invasiv:**

An erster Stelle ist hier das invasive duktales Karzinom zu nennen, gefolgt vom invasiven lobulären Karzinom. Diese beiden machen den Großteil (80%) der invasiven Mammakarzinome aus. Des Weiteren gehören in diese Gruppe: das muzinöse, medulläre, papilläre, tubuläre, adenoid-zystische, sekretorische (juvenile); apokrine metaplastische und andere seltene Karzinome sowie der Morbus Paget der Mamille (Possinger 1997; Schmidt-Matthiesen 1995; Riedel et al. 1993). Als prognostisch günstig gelten das tubuläre, das papilläre und das muzinöse Karzinom mit 5-Jahresüberlebensraten von ca. 95% sowie das rein kribriforme Karzinom mit 93% (Bässler, 1997; Lebeau et al. 1998).

1.6.4 Pathologie und Ausbreitung

Als Symptome treten an erster Stelle spürbare Knoten auf, im weiteren Verlauf kann es zur sog. Orangenhaut und zur Vergrößerung der supraclaviculären und axillären Lymphknoten oder auch zur Einziehung der Mamille kommen. Am häufigsten findet sich das Mammakarzinom im oberen äußeren Quadranten (40-50%). Im unteren inneren Quadranten liegt die Häufigkeit bei nur 5-7%, die Prognose ist hier aber am schlechtesten. In den beiden anderen Quadranten ist die Häufigkeit ungefähr gleich (12-18%). Gelegentlich tritt es auch multifokal oder beidseitig auf. Das Mammakarzinom breitet sich frühzeitig intraductal, lymphogen und hämatogen aus. Die Symptome sind von der Ausbreitungsrichtung abhängig.

Man unterscheidet die:

Vertikale Ausbreitung: Fortgeschrittene Stadien der inneren Quadranten wachsen in die Tiefe und infiltrieren die Pectoralmuskulatur. Zur Mamillenretraktion kann es bei zentral gelegenen Karzinomen kommen.

Horizontale Ausbreitung: Zu panzerartigen Thoraxeinschnürungen kommt es durch flächenhafte Ausbreitung in den Lymphgefäßen. Werden Talgdrüsen infiltriert und

kommt es durch subepidermale flächenhafte Tumorausbreitung zu einem epidermalen Lymphstau, so ergibt dies das Bild einer großporigen Hautveränderung (Orangenhaut).

Die Karzinome des äußeren Quadranten können auch durch die Haut nach außen brechen und zu Krebsgeschwüren führen.

Bei der Ausbreitung über das Lymphgefäßsystem werden als erstes die regionären Lymphknoten, d.h. die axillären, infraclaviculären und parasternalen in Abhängigkeit der Tumorlokalisation befallen. Über 50% der Mammakarzinome zeigen eine Infiltration der regionären Lymphknoten. Alle anderen als die regionären Lymphknoten gelten als Fernmetastasen.

Die hämatogene Metastasierung kann zeitgleich oder später erfolgen. Beim Mammakarzinom kommen sowohl Knochen- als Weichteilmetastasen vor. Hier ist ein Zusammenhang zwischen Absiedelungsort und Hormonrezeptorstatus zu erkennen. Bei Knochenmetastasen sind die Tumore meist östrogenrezeptor-positiv, bei Weichteilmetastasen sind sie negativ. Mit einer Häufigkeit von 70% siedeln sich die Tumorzellen in der Schädelkalotte, Wirbelkörpern und Becken an. Die Weichteilmetastasen entstehen überwiegend in Lunge (60%), Leber (50%) und Gehirn. Ein gleichzeitiges Vorkommen in mehreren Organen ist häufig. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die pTNM-Klassifikation.

1.6.4.1 Grading

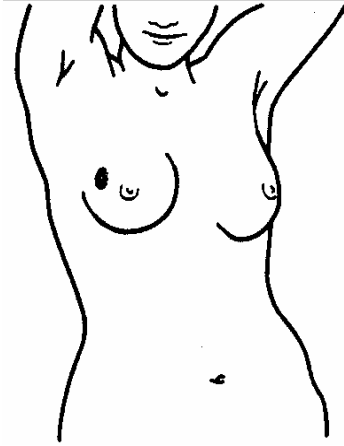
Das histopathologische Grading zur Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome aller histopathologischer Typen erfolgt nach einer Modifikation des von Bloom und Richardson vorgeschlagenen Gradings entsprechend Elston und Ellis (1991).

Das Grading korreliert eng mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, dem Nodalstatus, dem Rezeptorstatus, der Frequenz von Rezidiven und der Mortalität. Tabelle 3 gibt die Kriterien des modifizierten Gradings nach Bässler wieder. (Bässler et al., 1992; Elston und Ellis 1991).

Abbildung 2 stellt die TNM-Klassifikation der Mammatumore dar. Es ist eine international gültige Stadieneinteilung von malignen Tumoren. Hierbei beschreibt das T für die Art und Ausdehnung des Primärtumors, das N definiert den Lymphknotenstatus und das M gibt die Existenz von Fernmetastasen an.

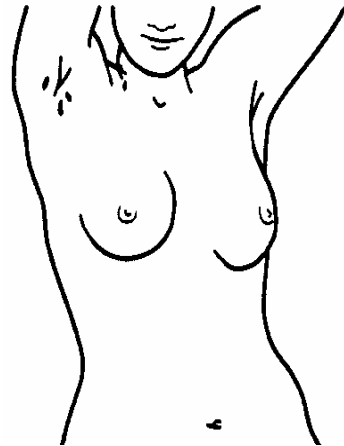
T Primärtumor

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Hinweis für Primärtumor in der Brust
Tis	Carcinoma in situ: intraduktales Karzinom, lobuläres Carcinoma in situ, oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor bis 2 cm
T1a	Tumor bis 0,5 cm
T1b	Tumor > 0,5 cm, aber nicht > 1 cm
T1c	Tumor > 1 cm, aber nicht > 2 cm
T2	Tumor > 2 cm, aber nicht > 5 cm
T2a	ohne Fixation an Pektoralisfaszie oder Muskel
T2b	mit Fixation an Pektoralisfaszie und/oder Muskel
T3	Tumor > 5 cm
T3a	ohne Fixation an Pektoralisfaszie oder Muskel
T3b	mit Fixation an Pektoralisfaszie und/oder Muskel
T4	Primärtumor jeder Größe mit Infiltration in die Brustwand oder I
T4a	Infiltration in die Brustwand
T4b	mit Ödem, mit Infiltration oder Ulzeration der Haut, oder Satelliten Knoten derselben Haut
T4c	T4a und T4b kombiniert
T4d	inflammatorisches Mammakarzinom



N* regionäre Lymphknoten

NO	kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	Befall beweglicher ipsilateraler axillärer Lymphknoten
N1a	Mikrometastasen < 0,2 cm in einem oder mehreren Lymphknoten
N1b	Makrometastasen in einem oder mehreren Lymphknoten
N2	Befall ipsilateraler axillärer fixierter Lymphknoten
N3	Befall ipsilateraler Thoracica-interna-Lymphknoten



M** Metastasen

MO	keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen vorhanden, einschließlich Metastasen in ipsilaterale supraklavikuläre Lymphknoten
*	Tumoren der lateralen Quadranten metastasieren zunächst in die axillären Lymphknoten, Tumoren der medialen Quadranten in die Lymphknoten entlang der A. thoracica interna.
**	am häufigsten befallene Organe sind: Knochen, Haut, Pleura; Lunge, Leber, Gehirn.

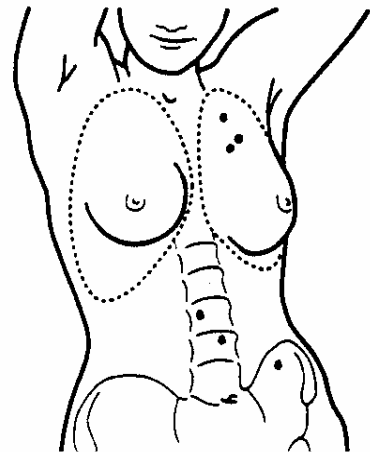


Abbildung 2 nach Gause et al 1994

1.6.5 Diagnose

In den letzten Jahren hat sich die Diagnostik in der Senologie stark weiterentwickelt. Als diagnostische Maßnahme steht nun neben der Inspektion und palpatorischen Untersuchung schon seit langem die Mammographie zur Verfügung. Die Mammographie ist das Standardscreeningverfahren zur Früherkennung. Neben der Mammographie dient die Galaktographie zur Diagnosefindung bei Mamillenabsonderungen und –einziehungen. In den letzten Jahren hat die Sonographie der Brust an Bedeutung zugenommen. Sie dient zur Differenzierung von zystischen und soliden Knoten. Durch Weiterentwicklung von hochauflösenden Schallköpfen und computergesteuerter Technik hat der Stellenwert der Sonographie als praktische Methode zugenommen. So empfehlen die S-3-Leitlinien (1. Aktualisierung 2008) bei auffälligem klinischem Untersuchungsbefund für Patientinnen bis 40 Jahren zur Abklärung die Sonographie. Erst bei Patientinnen über 40 Jahren wird als erstes eine Mammographie empfohlen. Es gibt auch die Möglichkeit, eine Kernspinn-Mammographie mit Gadolinium-Kontrastierung durchzuführen. Man hat hierbei gute Ergebnisse bei prämenopausalen Frauen mit mastopatischer, dichter Mamma erzielt. Auch ist der Einsatz des Kernspinntomogramms bei bestimmter Histologie, wie dem Lobulären Ca, nach neuester Leitlinie indiziert, da es den anderen diagnostischen Methoden hier überlegen ist. Es können Mammakarzinome von einer Größe $< 5\text{mm}$ dargestellt werden. Als Standardmethode zur Detektion hat sich der Kernspin aber nicht durchsetzen können. Als invasive diagnostische Maßnahmen stehen die Feinnadelbiopsie (FNP) und die Stanzbiopsie zur Verfügung, die als Diagnoseverfahren zum Einsatz kommen, deren histologische Ergebnisse die primäre operative Therapie konkretisieren können. Dieses Vorgehen empfehlen die Leitlinien bei BI-RADS IV und V. Das Breast Imaging and Reporting Data System (BI-RADS) ist eine Klassifikation des American College of Radiology (ACR) in der Befundung von Mammographien.

Tabelle 2: BI-RADS-Kategorien

BI-RADS Kategorie	Bedeutung
0	Die mammographische Untersuchung ist unvollständig. Weitere Bildgebung oder Vergleichsmammographien werden benötigt.
1	Negativ
2	Gutartiger Befund, z. B. kalzifizierte Fibroadenome, verkalkte Sekretgänge, Ölzysten, Lipome, Galaktozelen, Hamartoöme, Lymphknoten oder auch Implantate 3
3	Vermutlich gutartiger Befund. Weniger als 2% Malignomwahrscheinlichkeit. Kontrolluntersuchung in 6 Monaten empfohlen.
4	Verdächtiger Befund. Eine Biopsie sollte in Erwägung gezogen werden.
5	Hochverdächtig auf Malignität. Mehr als 95% Malignomwahrscheinlichkeit. Histologische Sicherung notwendig.
6	Biopsie durchgeführt, Malignität nachgewiesen, Dokumentation vordefinitiver Therapie.

S3 Leitlinien Mammakarzinom; Juni 2004 <http://leitlinien.net>

Biopsien werden mikroskopisch untersucht und klassifiziert. Der Malignitätsgrad kann anhand des Summenscores eingeschätzt werden.

Tabelle 3: Grading des Mammakarzinoms nach Bässler et al. (1992)

Merkmale	Kriterien	Scorewerte	
Tubulusausbildung	>75%	1	
	10-75%	2	
	<10%	3	
Kernpolymorphie	gering	1	
	mittelgradig	2	
	stark	3	
Mitoserate	0-5/10HPF	1	
	6-11/10HPF	2	
	≥10/10 HPF	3	
Summenscore: 3-9			
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	gut differenziert
6,7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8,9	hoch	G3	schlecht differenziert
*HPF = high power field (= 400-fache Vergrößerung im Mikroskop) nach Elston und Ellis (1991) bzw. Biesterfeld (1997)			

1.6.6 Therapie

Zum Diagnosezeitpunkt befinden sich 80-90% der Patientinnen in einem operablen und 5-10% in einem lokal weit fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium. Die Therapiemöglichkeiten sind beim Mammakarzinom grundsätzlich multimodal und individuell angepasst. Mit dem S3-Leitlinien-Konzept von 2004 gibt es erstmals eine grundsätzliche Therapieempfehlung, die auf nahezu alle Formen der Brustkrebserkrankungen der Frau anzuwenden ist. Prätherapeutisch sollte bei diagnostizierten Mammakarzinomen ein Staging mit folgenden Untersuchungen durchgeführt werden: Röntgen-Torax, Leber-sonographie, Skelettszintigraphie (Statement 3).

1.6.6.1 Primärtherapie

Die Primärtherapie des Mammakarzinoms ist in der Regel operativ. Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Operationsansätze, zum einen auf Basis der brusterhaltenden Therapie (BET), zum anderen nach der modifizierten radikalen Mastektomie (MRM). Ziel der operativen Therapie ist die Brusterhaltung (Statement 8). Eine BET ist heute in 60–70 % der Erkrankungsfälle möglich, wenn die Relation zwischen der Tumorgröße und dem Brustvolumen günstig und der Tumor noch nicht in die Muskulatur oder Haut (DCIS, LCIS) eingebrochen ist (Janni W. et al; 2005). Eine BET kann auch bei invasiven Karzinomen mit intraduktaler Begleitkomponente angewandt werden, solange die Resektionsränder im Gesunden verlaufen. Um ein kosmetisch ansprechendes Ergebnis zu erhalten, wird bei größerer Gewebeentfernung vor allem aus beiden unteren Quadranten die sogenannte intramammäre Verschiebeplastik vorgenommen. Dabei wird die Brustdrüse ganz oder teilweise von Haut und Muskulatur gelöst und so verschoben, dass nach der Operation trotz des fehlenden Gewebes eine ausgeglichene Brustform zurück bleibt. Eine postoperative Bestrahlung nach BET mit 50-60Gy ist obligat.

Die Ablatio mammae wird bei größeren, multizentrischen Tumoren oder Tumoren mit diffus ausgedehnter Kalzifikation oder inflammatorischen Tumoren empfohlen. Sollte aber bereits eine Fernmetastasierung nachweisbar sein, so ist sie wegen der größeren Belastung nicht mehr das Mittel der Wahl.

Eine standardisierte Axillarausräumung (Level I und II) als Standardmaßnahme bei beiden Vorgehensweisen, in der mindestens 10 Lymphknoten entnommen werden sollen, ist durch die Einführung der sentinel node biopsy (SNB) abgelöst und in ihrer Indikation differenziert worden. Hierbei wird nur der Lymphknoten entfernt, der als erster auf dem Lymphabflußweg der Brust in der Axilla liegt. Dieser wird histologisch auf das Vorliegen von Ca-Zellen untersucht. Liegt eine Metastasierung vor, so wird eine konventionelle Axilladissektion angeschlossen, die das Staging ergänzt. Die Sensitivität der SNB liegt über 95%. Der Lymphknotenstatus ist für die Entscheidung des weiteren therapeutischen Vorgehens entscheidend (Peter J. Tanis et al. 2001).

Die primäre Chemotherapie bleibt dem inflammatorischen Mammakarzinom oder primär inoperablen Tumoren vorbehalten. Bei allen anderen Karzinomen ist der Erfolg

noch nicht endgültig belegt (Bastert et al., 1994; Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 1996).

Klinische Situation	Therapeutisches Vorgehen
T0, 1 < 2cm	Tumorexzision im Gesunden + Entfernung der axillären Lymphknoten + additive Strahlentherapie
T2 2-5 cm	Totale Mastektomie +Entfernung der axillären Lymphknoten
T3 > 5cm	Wie T2 evtl. Additive Strahlentherapie
T4	Präoperative Chemotherapie, dann wie T2
N3	Wie bei T4

1.6.6.2 Adjuvante systemische Therapie

Bei der Therapie des invasiven Mammakarzinoms bei Frauen jeder Altersgruppe sollte eine adjuvante systematische Therapie in Erwägung gezogen werden, da sowohl das rezidivfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben unabhängig vom Nodalstatus durch die Metaanalyse der early Breast Cancer Trialist Cooperative Group (EBCTCG) bestätigt werden konnte. Nur bei Frauen, die der Gruppe mit niedrigem Risiko angehören, kann auf eine adjuvante systemische Therapie verzichtet werden.

Voraussetzungen hierfür sind:

- ≥ 35 Jahre
- Tumordurchmesser $< 2\text{cm}$
- grading I
- positiver Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor
- tumorfreie Lymphknoten in der Axilla (N 0).

- **Endokrine Therapie**

Es wird eine 5-Jahres-Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen 20mg/Tag empfohlen. Auch kann bei prämenopausalen Frauen mit hormonempfindlichen Tumoren die Ausschaltung der Ovarialfunktion mit GnRH-Analoga über mindestens 2 Jahre die Krankheit günstig beeinflussen (AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 33/34).

- **Adjuvante Chemotherapie**

Durch die adjuvante Chemotherapie lassen sich Rezidiv- und Sterberate am stärksten bei Frauen unter 50 Jahren senken. Aber auch bei postmenopausalen Frauen hat sie noch durchaus positive Effekte.

Standardchemotherapie ist heutzutage eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie in Dreierkombinationen (z. B. FAC/FEC) in adäquater Dosierung und gleicher Zykluszahl (6 Zyklen). Sie hat das bisherige Regime weitgehend abgelöst. Änderungen in Anzahl der Präparat-Zyklen, oder -Kombinationen zeigten keine besseren Ergebnisse gegenüber CMF (AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 39).

- **Neoadjuvante Chemotherapie**

Mittlerweile ist eine primäre (präoperative) systemische Therapie bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen eine Standardbehandlung. Auch wenn Patientinnen sich bei Indikation für eine brusterhaltende Operation entscheiden, stellt die neoadjuvante Chemotherapie eine alternative Behandlungsmöglichkeit dar, wobei der Erfolg bei hormonrezeptornegativen Karzinomen am größten ist (AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 44/45).

- **Adjuvante Strahlentherapie**

Die postoperative Strahlentherapie ist häufig indiziert, da sie im Gegensatz zur systemischen Therapie einen direkten Einfluss auf das lokale/lokoregionale Tumorwachstum hat und somit durch die Verhinderung eines Lokalrezidivs die Überlebensrate steigert. Dies kann auch die Lebensqualität von Patientinnen mit schon vorhandenen Fernmetastasen erheblich verbessern.

- **Strahlentherapie nach BET eines invasiven Mammakarzinoms**

Die Strahlentherapie ist nach brusterhaltender Operation immer inzidiert. Bei Behandlung des invasiven Mammakarzinoms ist die positive Wirkung einer Bestrahlung mit 50gy in einer konventionellen Fraktionierung (1,8 – 2,0gy) eindeutig belegt (AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 23/24).

- **Strahlentherapie des Mammakarzinoms nach Mastektomie (MRM)**

Die postoperative Radiatio vermindert das Risiko eines lokalen Rezidivs (Statement 25).

Indikationen hierfür sind:

- nicht ausreichende Resektion im Gesunden (R1 – R2)
- axillärer Lymphknotenbefall von ≥ 4 Lymphknoten
- pT3/T4 – Karzinome

(AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 26).

Das inflammatorische Mammakarzinom wird standardmäßig nach primärer Chemotherapie, erfolgter Mastektomie postoperativ bestrahlt. Bei ungenügender Remission durch die Chemotherapie kann die Bestrahlung auch präoperativ mit einer Dosisaufsättigung der Brust auf ca. 60gy erfolgen.

Dagegen hat Nachbestrahlung bei einem DCIS mit günstigem Risiko nur einen minimalen Effekt, deshalb kann bei einer Tumorgöße $< 2\text{cm}$ low grad und Sicherheitsabstand $> 10\text{mm}$ auf eine Bestrahlung verzichtet werden (AWMF S-3 Leitlinie, 2004 Statement 22).

1.6.6.3 Grenzen der Therapie

Im Gegensatz zu anderen Karzinomarten kann man beim Mammakarzinom nach einigen Jahren Rezidivfreiheit nicht von einer Heilung sprechen. Man spricht hier nur von Überlebenszeit. Problematisch sind beim Mammakarzinom sowohl die frühe Metastasierung, die die Prognose radikal verschlechtert, als auch die große Tendenz zur späten Fernmetastasierung, bis zu 10 Jahren nach Erstdiagnose. Ein metastasiertes Mammakarzinom ist als nicht heilbare Krankheit anzusehen. Somit kann das Ziel der Behandlung eines metastasierten Mammakarzinoms nur eine Verlängerung der Überlebenszeit und die Verbesserung bzw. Erhaltung der Lebensqualität der Patientinnen sein. Das Therapiekonzept ist auf die individuellen Gegebenheiten der einzelnen Patientinnen abzustimmen. Es kommt an erster Stelle die Hormonbehandlung zum Einsatz, da sie im Vergleich nebenwirkungsarm und ebenso effektiv ist wie die Chemotherapie. Aber auch Radiotherapie und Chemotherapie werden angewendet, vor allem bei schnell progredienten Verläufen mit Lungen-, Knochen- und Hirnmetastasen (Kuhn et al., 1998).

Ziel beim Kampf gegen das Mammakarzinom sollte also die Vermeidung der Metastasierung sein. Dies ist momentan noch nicht ausreichend gelungen. Es geht hier um eine systemische Therapie, die den Organismus wenig belastet und alle Karzinomzellen erreicht, so dass keine Zelle im Körper verbleibt, die auch noch Jahre später zu einem Rezidiv führen kann. Die Therapie mit antiidiotypen-Antikörpern, die einen neuen Weg der Tumorbekämpfung beschreitet, bietet hier eine interessante und viel versprechende Möglichkeit.

1.7 Das tumorassoziierte Antigen CA14C5 und seine Interaktion mit MAk 14C5

Viele Brustkrebszellen exprimieren ein Molekül, das von De Potter et al. (1994) und Coene et al. (1997) als ein Adhäsionsmolekül identifiziert wurde, das für die Ausbreitung von Karzinomzellen bedeutend ist. Sie generierten einen Antikörper, der an der extrazellulären Domäne dieses Plasmamembranmoleküls bindet und die Invasionseigenschaften so negativ beeinflusst.

1.7.1 Das 14C5 Molekül

Das 14C5 Molekül gehört zu der Familie der Adhäsionsmoleküle und besitzt eine Größe von 90kDa. Es kommt auf verschiedenen menschlichen Tumor- und Normalgeweben vor. Coene et al. (1997) untersuchten die Anwesenheit des 14C5 Moleküls in verschiedenen Tumorgeweben. Tabelle 5 zeigt die Expressionsraten bei den einzelnen Tumoren. Es wurden das Tumorepithel als auch das umgebende Stroma auf die Expression von 14C5 hin untersucht.

Tabelle 5 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bei menschlichen Malignomen und ihrem umgebenden Stroma auf die Expression von 14C5 Molekülen (Coene et al.; 1997)				
	Epithel		Stroma	
	+	-	+	-
Adenokarzinome der Mamma				
Invasives ductales Ca.(n=33)	21(64%)	12(36%)	31(94%)	2(6%)
Invasives lobuläres Ca (n=2)	0(0%)	2(100%)	2(100%)	0(0%)
Carcinoma ductale in situ(n=15)	15(100%)	0(0%)	0(0%)	15(100%)
Adenokarzinome anderer Herkunft (n=9)	1(11%)	8(89%)	4(44%)	5(56%)
Invasive Spinaliome (n=7)	7(100%)	0(0%)	6(75%)	1(25%)
Invasive Basaliome				
oberflächlicher Typ (n=2)	2 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (100 %)
nodulärer Typ(n=3)	0 (0%)	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)

Auch normales Gewebe wurde auf die Anwesenheit von 14C5 untersucht. Negativ waren: Haut, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Darm, Magen, Lunge, Uterus, Ovar, Ureter, Urethra, Lymphknoten, Nervengewebe, Knorpelgewebe und Knochen.

Lediglich in myoepithelialen Zellen von Brustgewebe und Tubuluszellen der Niere konnte eine low-level Färbung beobachtet werden. Das Stromagewebe von Normalgewebe war immer negativ. Ebenso zeigte das Stromagewebe um CDIS keine Anfärbung. Interessanterweise exprimieren normale Fibroblasten, die in der Nachbarschaft von invasiven duktalem Mammakarzinomen und invasiven Spinaliomen der Haut liegen, ausgesprochen häufig das 14C5 Molekül an ihrer Zellmembran (94% und 75%). Bei Basaliomen der Haut vom oberflächlichen Typ, die ja ein begrenztes Invasionsvermögen zeigen, werden nur die Tumorzellmembranen angefärbt, die umgebenden Fibroblasten nicht. Bei Basaliomen vom nodulären Typ, die ausgesprochen invasiv wachsen, aber nicht metastasieren, lassen sich die Tumorzellmembranen nur begrenzt oder gar nicht anfärben, während die umgebenden Fibroblasten das 14C5 Molekül exprimieren (Coene et al., 1997). Dies legt den Schluss nah, dass das 14C5 Molekül im direkten Zusammenhang mit der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen steht. An dem Invasionsprozeß von Tumorzellen nehmen extrazelluläre Matrix- proteine (ECM-Proteine) und ihre Rezeptoren teil, da die Zell-Substrat-Adhäsion die Voraussetzung für dieses Ereignis ist. Dabei heften sich Tumorzellen an die umgebende ECM und werden von den ECM-Proteinen durch das Normalgewebe geleitet. Die Rezeptoren für die ECM-Proteine sind eng verwandt mit den glykosilierten transmembranären Proteinen (=Adhäsionsmoleküle), die aus den Integrinen, den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, den Selektinen und den Cadherinen gebildet werden (Albeda, 1993). Albeda (1993) zeigte die Verteilung der Integrine bei einer Vielzahl von Malignomen in verschiedenen Stadien der Tumorzellausbreitung. Es wurde deutlich, dass ein vermehrtes Expressieren von Integrinen auf der Tumorzellmembran die Implantation fördert und die Metastasenbildung unterstützt (Albeda et al., 1990; Chan et al., 1991; McGregor et al., 1989).

Ein weiteres Beispiel für einen ECM-Protein-Rezeptor ist das CD44-Glycoprotein der Zelloberflächen. Es existieren zahlreiche Varianten, die das invasive Potential der Tumorzellen fördern (Asplund und Heldin, 1994; Gunthert et al., 1991; Santos et al., 1995; Seiter et al., 1993; Sy et al., 1991, 1992). Sie binden an Hyaluron (ECM) und entarten dieses Gewebe (Culty et al., 1992, 1994).

Eine andere Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen wird von den Cadherinen gebildet. Auch sie spielen eine Rolle bei der Tumorzellausbreitung. Frixen et al. (1991) zeigten, dass die E-cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion die Invasivität von Karzinomzellen supprimiert. Karzinomzellen, die mit E-cadherin cDNA transfiziert wurden, zeigten eine verminderte Invasivität, was somit einen direkten Beweis für ihre Bedeutung in der Tumorausbreitung liefert (Frixen et al., 1991). Auch Navarro et al. (1991) fanden heraus, dass eine inverse Korrelation zwischen der Menge des E-cadherin Proteins und der Malignität von Tumorzelllinien besteht. Ohne sie funktioniert folglich die Kontaktinhibition nicht ausreichend.

Dies verdeutlicht, dass das 14C5 Molekül ein ähnliches Verhalten und eine ähnliche Expression wie die Integrine und die CD44-Varianten zeigt. Obwohl es noch nicht sequenziert werden konnte, vermuten Coene et al. (1997) nach Zell-Adhäsions-Inhibitions-Experimenten, dass es sich um ein EZM-Proteinrezeptor handelt und De Potter et al. (1994) würden ihn am ehesten in die Familie der Integrine einordnen.

1.7.2 Der monoklonale Antikörper MAk 14C5

De Potter et al. (1994) und Coene et al. (1997) entwickelten einen monoklonalen Antikörper (Ab1), der an ein extrazelluläres Epitop eines Plasmamembranantigens von SK-BR-3 und MCF-7 menschlichen Brustkrebszellen bindet und in der Lage ist, die Tumorzellinvasion von Brustkrebszellen in das Normalgewebe zu inhibieren. So kann deren Invasion und Metastasierung erfolgreich verhindert werden. Hergestellt wurde er in der Hybridomatechnik.

1.7.2.1 Ergebnisse der Zell-Adhäsions-Inhibitions-Experimente

Adhäsions-Inhibitions-Experimente mit den SK-BR-3 Zellen und den MAk 14C5 wurden von Coene et al. (1997) unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Im Adhäsions-Inhibitions-Experiment auf künstlichem Substrat wurden die SK-BR-3 Zellen auf Mikrowellplatten ausgesät und nach 24 Stunden wurden die schwimmenden Zellen gegen die anheftenden Zellen ausgezählt. Beim ersten Ansatz wurden die Zellen mit MAk 14C5 vorinkubiert, beim zweiten nach dem Aussäen mit dem Antikörper nachinkubiert.

In beiden Fällen war der MAk 14C5 in der Lage, die Zell-Substrat-Adhäsion zu inhibieren. Das zeigt, dass der Antikörper sowohl schwimmende Zellen vom Anheften

und Verbreiten auf dem Boden der Mikrowellplatte abhält als auch schon haftende Zellen durch seine Bindung aktiv lösen kann.

Im Adhäsions-Inhibitions Experiment auf lebendem Substrat wurden für einen Konfrontations Assay die SK-BR-3 Tumorzellen zusammen mit vorbehandelten Hühnerherzfragmenten (PHF) mit und ohne Anwesenheit von MAk 14C5 inkubiert.

Die Tumorzellen hefteten sich ohne Anwesenheit von MAk 14C5 schon nach einem Tag an die PHF an, nach einem weiteren Tag waren die PHF eingekreist und am zehnten Tag begannen die Tumorzellen die PHF zu invadieren.

Bei Anwesenheit von MAk 14C5 zeigte sich lediglich am vierten und zehnten Tag eine leichte Anheftung, aber keinerlei Invasion.

1.7.3 Zusammenfassung

Das Antigen 14C5 wird auf den Epithelien von invasiven duktalem Mammakarzinomen mit einer Häufigkeit von 64% exprimiert, auch bei duktalem Carcinoma in Situ zeigt es eine erhöhte Dichte. Hingegen kommt es nahezu bei keinem Normalgewebe vor. Versuche mit SK-BR-3-Zellen haben gezeigt, dass Tumorzellen die Eigenschaft zur Invasion verlieren, wenn der 14C5 Rezeptor durch MAk 14C5 blockiert wird. Die Invasionsfähigkeit erhält die Zelle durch die Ähnlichkeit des 14C5-Moleküls mit seiner ähnlichen Verteilung und ähnlichen Eigenschaften wie das CD44-Protein oder wie einige Integrine (Coene et al., 1997).

Mit diesen Erkenntnissen und den ermutigenden Ergebnissen bei den Studien mit anti-idiotypischen Antikörpern gegen ACA125 beim Ovarialkarzinom versuchen wir jetzt ein ähnliches Konzept bei der Therapie des Mammakarzinoms mit Ab2 Antikörpern zu entwickeln und im Tiermodell zu überprüfen.

1.8 Anti-Idiotypen-Antikörper für 14C5

1.8.1 Herstellung und Charakterisierung

Es wurden nun monoklonale murine anti-idiotypische Antikörper (Ak2) MAk ACA14C5 mit der Kompetenz zur Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen das Mammakarzinom hergestellt. Dazu sollten die Antikörper gegen den Idiotypen des Akl-MAk 14C5 gerichtet sein und somit das tumorassoziierte Antigen 14C5 imitieren. Die Herstellung erfolgte durch die Mitarbeiter des zellbiologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Bonn nach Peters und Baumgarten (1990).

1.8.1.1 Produktion eines monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpers

Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden mit dem monoklonalen Antikörper MAk 14C5 immunisiert. Dazu wurden die F(ab')₂-Fragmente dieses MAk 14C5 an KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) gekoppelt und mit kompletten Freund-Adjuvans (CFA) emulgiert. Die Tiere erhielten am Tag Null 100µg des Antikörpers intraperitoneal (i.p.) verabreicht und drei weitere Injektionen mit jeweils 50µg Antikörper in IFA (inkomplettes Freund-Adjuvans) im Abstand von vier Wochen. Vier Tage vor der Fusion wurden die Tiere mit 50µg Antikörper in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) i.p. geboostert. Die Maus, die das beste Antiserum produzierte, wurde für die Fusion ausgewählt. Deren Milzzellen wurden mit Zellen der Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 unter Standardbedingungen fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridomazellen wurden in RPMI 1640 Medium (Fa. Cytogen, Lohmar) mit FCS (Fa. Biochrom IEG, Berlin) und HECS kultiviert.

1.8.1.2 Herausfiltern von Idiotyp-bindenden Antikörpern (Ak2)

14C5 F(ab')₂-Fragmente wurden an Microtiter Platten („Maxi-Sorp“, Nunc, Dänemark) gebunden und der Kulturüberstand der Hybridomazellen wurde zugefügt. Die Detektion von spezifischen Bindungen erfolgte mit POD-markierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern (FC-spezifisch). Positive Hybridomazellen wurden drei weitere Male geklont und mit einem Inhibitionsassay getestet.

1.8.1.3 Anti-Idiotyp Inhibitionssassay

Die 14C5 F(ab')₂-Fragmente wurden an Microtiter Platten gebunden; es wurden konstante Volumen von Kulturüberständen mit ansteigenden Mengen des CA 14C5 in die Platten zusammengefügt. Die Bindung wurde mit POD-markierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern detektiert (FC-spezifisch).

Die prozentuale Inhibition wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{\text{OD(P)}-B}{\text{OD(A)}-B} \times 100$$

OD = Optische Dichte

OD(P) = Wellenlänge 405 nm in Anwesenheit von CA 14C5

OD(A) = Wellenlänge 490 nm bei Standardreaktion in Abwesenheit von CA 14C5

B = (Blank) Wellenlänge 405 nm und Kavität mit Puffer anstatt mit Kulturüberstand gefüllt.

Der Hybridomaklon, der als Klon ACA14C5 bezeichnet wird, sekretiert einen IgG1K (Kappa-Leichtkette) Antikörper. Die Bindung dieses Antikörpers an den MAk 14C5 kann durch das CA14C5 Antigen inhibiert werden (siehe Abbildung 3).

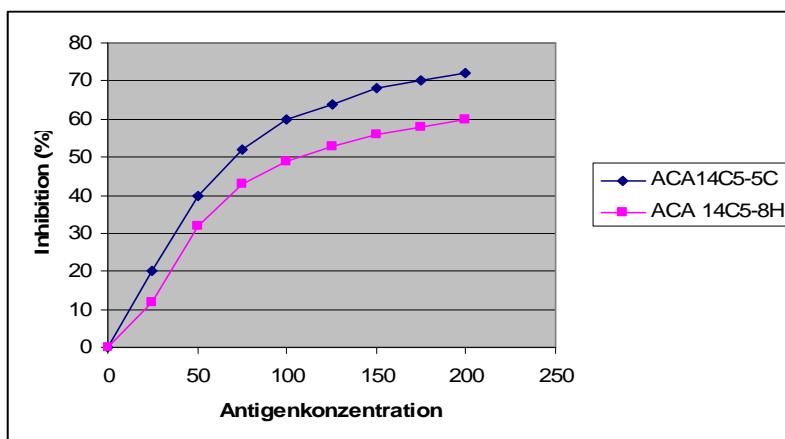


Abb. 3: Inhibition des ACA14C5/14C5 (Ab₂/Ab₁) - Immunkomplexes durch das originäre Antigen CA14C5.

1.8.1.4 In-vitro Produktion und Reinigung des anti-idiotypischen Antikörpers ACA14C5

Der Klon ACA14C5 wurde unter Standardbedingungen mit 10 % FCS (Fa. Biochrom, Berlin) kultiviert und schrittweise an serum-freies Medium („Ultroser HY“, IBF Biotechnics, Frankreich) adaptiert. Die Hybridomazellen wurden in ein Hohlfaser-Membran-Zell-Kultur-System („Tecomouse“, Integra Biosciences, Deutschland) überführt und gemäß den Angaben des Herstellers kultiviert. Die Reinigung des Antikörpers erfolgte über Protein G Sepharose Affinitäts-Chromatographie („MAB Trap G columns“ Pharmacia LKB Biotechnology AB, Schweden) und die Reinheit wurde mit SDS-PAGE („PHAST System“, Pharmacia Biotech, Schweden) überprüft.

2 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist zweigeteilt. Sie orientiert sich hierbei an technischen Anforderungen an Therapieprinzipien im medizinischen Alltag. Im ersten Versuch (im weiteren Verlauf Versuch I oder Tumor Load Challenge, TLC-Versuch genannt) wird der Immunisierungszeitpunkt und damit die Tumorgröße und seine Einbindung in den umgebenden Zellverband variiert. So simulieren sie die unterschiedlichen Ausgangssituationen in Bezug auf das Tumorstadium bei Therapiebeginn in Praxi. Im zweiten Versuch (im weiteren Verlauf Versuch II oder Prophylactic Immunisation, PI-Versuch, genannt) wird die implantierte Tumorzellzahl bei prophylaktischer Immunisierung mit ACA14C5 variiert, womit die Wirksamkeit einer prophylaktischen Immunisierung untersucht werden soll.

2.1 Versuch I - Etablierte Tumore- Hohe Tumorlast

Nach abgeschlossenen Praktikabilitäts-Vorversuche soll in dieser Versuchsanordnung der ACA14C5 auf seine Wirksamkeit bei im Zellverband etablierten Tumoren getestet werden. Es gilt zu untersuchen, ob die durch ACA14C5 (Ab2) induzierte humorale und zelluläre Antwort, die über die Produktion von Ab3 abläuft, die dem originären Mab 14C5 (Ab1) gleichen, imstande ist, eine größere Ansammlung von Tumorzellen, die sich schon fest im Gewebeverband etabliert hat, erfolgreich zu lysieren und ihre weitere Ausbreitung zu verhindern. Wie die In-vitro-Versuche mit Mab 14C5 gezeigt haben, kann eine Invasion erfolgreich unterbunden werden, doch stellt sich hier die Frage, ob dies in vivo ausreichend, ist eine solide etablierte Tumormasse an weiterer Ausbreitung zu hindern und die Stimulation des Immunsystems intensiv genug ist, eine Regression zu erreichen. Diese Erkenntnisse lassen Schlüsse auf den möglichen klinischen Einsatzbereich zu.

2.2 Versuch II - Prophylaktische Immunisierung

Aus den Erkenntnissen der vorgeschalteten In-vitro-Versuche, die die erfolgreiche Inhibition der aktiven Invasionseigenschaften der Tumorzellen zeigen, lässt sich postulieren, dass eine Immunisierung vor Entstehung bzw. Injektion der Tumorzellen eine Invasion und Etablierung verzögern, wenn nicht sogar ganz verhindern könnte.

Durch Immunisierung der Versuchstiere vor anschließender Tumorzellimplantation soll die anschließende Tumorzellwachstums- und Metastasierungstendenz in vivo untersucht werden. Sollten sich positive Aspekte ergeben, so wären die Auswirkungen auf den klinischen Einsatz erheblich.

3 Experimenteller Ansatz

3.1 Tierversuchsbeschreibung

3.1.1 Verwendete Materialien

Die Herstellung, Pflege und Zubereitung erfolgte durch die Mitarbeiter/Innen des zellbiologischen Labors und des Labors für Tumorimmunologie der Universitätsfrauenklinik Bonn.

3.1.1.1 Der Antikörper MAkACA14C5-1 aus dem Hybridomaklon 5C

Die Reinigung des anti-idiotypischen Ab2-Antikörpers MAkACA14C5 (I) (Klon 5C) erfolgte über Protein G Sepharose Affinitäts-Chromatographie („MAb Trap G columns“, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Schweden) und die Reinheit wurde mit SDS-PAGE („PHAST System“, Pharmacia Biotech, Schweden) überprüft. Das isolierte Immunglobulin wies eine Reinheit von über 95% auf und das endgültige Produkt wurde ohne den Zusatz von Adjuvans zubereitet. Der IgG1-Antikörper wurde in eine sterile, pyrogen-, mycoplasma-, polynucleotid-, virus- und retrovirusfreie PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung. pH = 7,4, w/o Ca²⁺+Mg²⁺) gefügt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das endgültige Produkt auf seine Sterilität, Pyrogenität und generelle Sicherheit an Mäusen getestet.

Unmittelbar vor den Injektionen wurde der Antikörper aufgetaut und in den entsprechenden Verhältnissen zu 100 µg MAkACA14C5 in isotonischer NaCl-Lösung auf 0,1 ml pro Injektion gelöst. Vom Auftauvorgang bis zur endgültigen Injektion in die Ratte vergingen maximal 90 Minuten.

3.1.1.2 Das Maus-Immunglobulin

Die Kontrollgruppe erhielt polyvalentes Maus-IgG (Dianova, Chrom Pure Mouse IgG, whole molecule, Jackson Immuno Research, Hamburg). Dieses wurde in einer Dosierung von 100 µg pro 0,1 ml Injektion in isotonischer NaCl-Lösung verabreicht.

3.1.1.3 Die Zelllinie HH-16 Klon 2/1

Für unseren in-vivo Tierversuchsansatz wurde die Ratten-Fibrosarkom-Zelllinie HH-16cl.2/1 von Prof. Hölzel, Hamburg eingesetzt. Dieser Klon wurde von Steffen et al.

(1988) aus einem durch 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) induzierten Mammatumorgewebe an Ratten entwickelt.

Die HH-16 cl.2/1 Zellen bestehen histologisch aus mesenchymalen Zellen des Stromagewebes der Brustdrüse. Morphologisch erscheinen sie als spindelförmige, meist bipolar (mehrzipflig) ausgerichtete Fibroblasten in kreuz und quer verlaufender Anordnung (Fischgrätmuster).

Die Zellen sind in der Lage, in immunkompetenten Ratten metastasierende Tumore (Adenokarzinome oder Fibrosarkome) hervorzurufen.

Ergänzend wurde die Zelllinie auf die Expression des Tumorantigens CA14C5 untersucht. Dazu wurde die Bindungsfähigkeit von fluoreszenzmarkierten MAk 14C5 an die HH-16 cl.2/1 Zellen in vitro überprüft.

Die Zellen werden in Cryoröhrchen in einem Container mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen werden drei Wochen vor dem geplanten Implantationstermin in die Ratten aufgetaut und die benötigte Menge angezchtet.

Das Auftauen erfolgte im 37°C Wasserbad. Die Zellen wurden in RPMI (Fa. Cytogen, Lohmar) suspendiert und mehrmals zentrifugiert. Die Vitalitätsprüfung erfolgte anschließend mit Trypanblau. Hierzu wurde eine Farblösung für eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Die gefärbten und ungefärbten Zellen wurden nach dreiminütiger Inkubation in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die vitalen Zellen pro ml Zellsuspension berechnet. Die Weiterzucht der Tumorzellen erfolgte in Kulturflaschen (275 ml bzw. 600 ml, Flacon, Becton & Dickinson, USA) mit komplettem Medium mit FCS, bestehend aus 10ml L-Glutamin 200 nM (Fa. Biochrom K0282, Hamburg), 5 ml Na-Pyruvat 100 nM (Fa. Biochrom L0473), 0,5 ml.

Gentamycin 50 mg/ml (Fa. Biochrom A2712), 50 ml FCS intakt (fötales Kälberserum, Fa. Biochrom 501139 und 435 ml RPMI 1640 (w.2.0g/l NaHCO₃, w/o L-Glutamin, Fa. Cytogen, Lohmar) bei 500 ml Medium.

Das Kulturmedium wurde zur Implantation abpipettiert, die Zellen wurden mit Trypsin-EDZA-Lösung (37°C) gesplittet, mit Hilfe eines Zellsrabbers von der Kulturflasche gelöst, zentrifugiert und in RPMI und FCS resuspendiert. Nach Auszählung wurden die Zellen so suspendiert, dass jeweils 5, 10 und 25 Millionen Tumorzellen in 0,3 ml PBS pro Injektion zur Verfügung standen. Unmittelbar vor der Implantation in die Ratte erfolgte die Zubereitung der Injektionsspritze.

3.1.1.4 Versuchstiere

In der Zeit von Februar 1997 bis Juli 1997 wurde in den Tierversuchslabors der Universitätsfrauenklinik Bonn der Tierversuch mit Genehmigung des Tierschutzantrages Nummer 23.203.2 BN 3814/96 unter dem Titel: „Überprüfung der immunologischen Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers ACA 14C5 und seines Effektes auf das Metastasierungsverhalten von Mammakarzinomzellen im Tiermodell“ durchgeführt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche und weibliche Sprague Dawley Ratten. Etwa fünf Wochen nach der Geburt wurden sie von der Mutter und nach dem Geschlecht getrennt.

Die Ernährung bestand zunächst aus Muttermilch, ab der dritten Lebenswoche wurde sie durch Trockenfutter und Wasser ergänzt. Während des Versuchszeitraumes erhielten beide Gruppen, Versuchstiere und Muttertiere, das Alleinfuttermittel „Altromin- Erhaltungsdiät für Ratten und Mäuse“ (Altromin GmbH, Lage). Die Herstellung von Altromin erfolgt standardisiert mit ausgewählten Rohstoffen und frei von pathogenen Keimen. Unter standardisierten Bedingungen lebten jeweils mehrere Ratten in Großkäfigen bei einer Raumtemperatur von 22-24°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden.

3.2 Versuchsplan

3.2.1 Versuchsanordnung

3.2.1.1 Tumor-Last Versuch (TL)

Die Versuchstiergruppen des Tumor-Last Versuchs (TL) bestanden jeweils aus 7 Ratten. Es gab 3 Gruppen: Die Tiere der Gruppe A erhielten 100µg MAk ACA14C5 pro Woche. Die Tiere der Gruppe B erhielten 100µg Mäuse IgG pro Woche. Die Kontrollgruppe C erhielt keine Immunisierung. Allen Tieren wurden Tumorzellen implantiert.

3.2.1.2 Prophylaktische Immunisierung (PI)

Die Versuchstiergruppen des Versuchs Prophylaktische Immunisierung (PI) bestanden aus jeweils 4 Tieren (Gruppen 5A, 5B, 10A, 10B, 25A, 25B). Die Gruppen 5A, 10A

und 25A erhielten 100µg ACA14C5, die Gruppen 5B, 10B und 25B erhielten 100µg Mäuse IgG po Woche.

3.3 Versuchsdurchführung:

3.3.1 Tumorimplantation

Die Tumorzellsuspension wurde dem Versuchstier subkutan auf dem Rücken ca. 0,5 cm oberhalb des Schwanzansatzes injiziert. Dafür wurde eine Subkutannadel ("Neolus" 0,4x20mm, Terumo, Belgien) verwendet. Nach Injektion wurde die Einstichstelle noch einige Zeit manuell komprimiert, um ein Austreten der injizierten Flüssigkeit zu unterbinden.

3.3.1.1 TL Gruppe

Die Versuchstiere aller drei Gruppen (A, B, C) erhielten am 9. Lebenstag (Geburtstag = Tag 0) jeweils 5 Millionen Tumorzellen in 3ml Suspension.

3.3.1.2 PI Gruppe

Die Versuchstiere erhielten an ihrem 29. Lebenstag drei unterschiedliche Tumorkonzentrationen:

- Gruppe 5A und 5B erhielten je 5 Millionen Tumorzellen à 3ml
- Gruppe 10A und 10B erhielten je 10 Millionen Tumorzellen à 3ml
- Gruppe 25A und 25B erhielten je 25 Millionen Tumorzellen à 4ml

In den letzten beiden Gruppen mußte das Volumen der Suspension mit NaCl-Lösung auf 4 ml erhöht werden, damit die Tumorzellen sich vollständig lösen konnten und nicht verklumpten.

3.3.2 Immunisierungen

Die Immunisierungen erfolgten in beiden Gruppen regelmäßig alle sieben Tage, intraperitoneal durchgeführt während einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran ("Forene", Abbott, Chicago, USA). Die Narkose wurde in einem für Tierversuche üblichen Narkoseglastopf mit einem mit "Forene" getränkten Wattebausch eingeleitet. Die Antikörpermenge bzw. das Maus-IgG war jeweils auf eine Injektionsmenge von 0,1 ml suspendiert und wurde mit einer Subkutannadel ("Neolus" 0,4x20mm, Terumo, Belgien) in den rechten Unterbauch injiziert.

3.3.2.1 TL Gruppe

Alle Tiere wurden am 30. Lebenstag bzw. am 21. Tag nach Tumorimplantation zum ersten Mal immunisiert-.

- Gruppe A erhielt 100 µg ACA14C5.
- Gruppe B erhielt 100 µg Mäuse IgG.
- Gruppe C erhielt keine Immunisierung

3.3.2.2 PI-Gruppe

Alle Tiere wurden am 15. Lebenstag bzw. 14 Tage vor Tumorimplantation zum ersten Mal immunisiert.

- Gruppe A erhielt 100 µg ACA14C5.
- Gruppe B erhielt 100 µg Mäuse IgG.

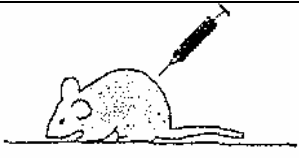
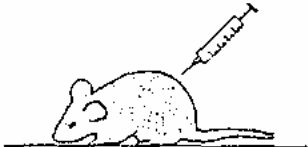

Implantation der jeweiligen Tumorzellmenge in das Subcutangewebe oberhalb des Schwanzansatzes TLC: 9. Lebenstag PI: 29. Lebenstag	Immunisierung i.p. einmal pro Woche mit 100 µg ACA14C5 oder Mäuse IgG.. TLC ab 30. Lebenstag PI ab 15. Lebenstag	Täglich Kontrolle des Tumorwachstums TLC ab 15. Lebenstag PI ab 40. Lebenstag
		

Abbildung 4: Immunisierungsprotokoll in Kurzform

3.3.3 Datenerfassung:

Ab dem achten Tag nach Implantation wurden die Tumore täglich mit einer Messleere nach Länge (parallel zur Wirbelsäule) und Breite (seitliche Ausdehnung neben der Wirbelsäule) in Millimeter vermessen. Es zeigte sich, dass die Messwerte erst ab dem elften Tag verwertbar waren, weil sich erst ab diesem Tag das Injektionsödem so weit zurückgebildet hat, dass der Tumor palpabel und somit messbar war. Der

durchschnittliche Tumordurchmesser jedes Tieres wurde aus diesen beiden Werten bestimmt.

Die Messung erfolgte täglich möglichst zur gleichen Zeit, um einen 24 Stundenrhythmus bei der Wachstumskontrolle einzuhalten.

3.3.3.1 Erläuterung zur Auswertung der Ergebnisse:

Die Versuche wurden nach 56 bzw. 57 Tagen aus ethischen Gründen abgebrochen. Die absichtlich klein gehaltenen Gruppen (Tierschutz) schränkten die Auswertung ein. Bei einer hohen Standardabweichung und kleinen Gruppen ist die Aussagekraft statistischer Tests auf dem allgemein üblichen Signifikanzniveau ($\alpha=0,05$) begrenzt. Deshalb werden die Ergebnisse mehr deskriptiv dargestellt, indem die Mittelwerte der Tumordurchmesser der Einzeltiere und der Gruppen verglichen werden. Tabellen und Diagramme wurden mit den Funktionen des Programms Excel der Firma Microsoft berechnet und dargestellt.

Die gesamten Werte der einzelnen Gruppen sind im Anhang zu finden.

4 Ergebnisse

4.1 Einleitung in die Ergebnisse

Die relativ klein gehaltenen Gruppen führen zu Einschränkungen bei der Auswertung. Die Aussagekraft statistischer Tests bei dem allgemein üblichen Signifikanzniveau ($p = 0,05$) ist bei hoher Standardabweichung und kleinen Gruppen begrenzt, daher wird auf die Durchführung dieser Tests verzichtet und die Darstellung der Ergebnisse erfolgt deskriptiv. Es werden die Entwicklung der absoluten Einzelwerte und die Mittelwerte des Tumordurchmessers der einzelnen Gruppen betrachtet. Bei der Einzelfallanalyse geht die individuelle Entwicklung und der Gesundheitszustand der Tiere am Ende des Beobachtungszeitraums in die Auswertung ein. Hierbei erfolgt auch eine Analyse der individuellen extremen Abweichungen von den Durchschnittswerten.

4.2 Einzelfallanalyse

4.2.1 Versuch TLC

4.2.1.1 Gruppe A (n=7)

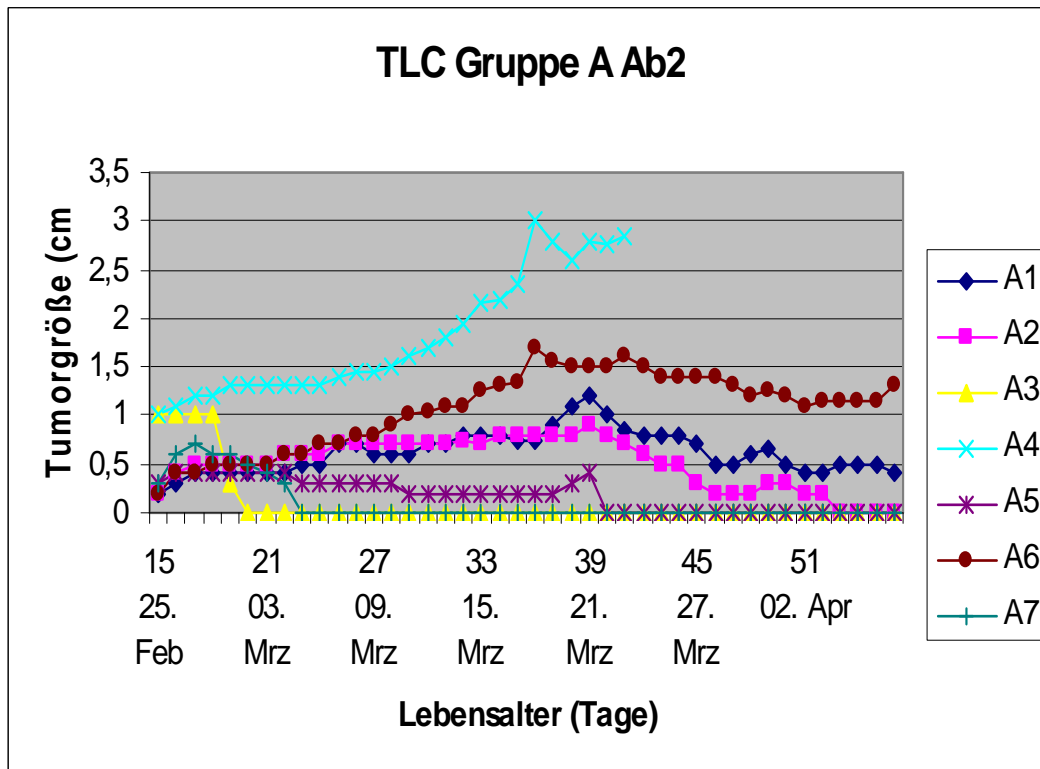


Abbildung 5: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe A

Gesamtdarstellung: Grundsätzlich lassen sich drei Tumorwachstumskurven verzeichnen. Es zeigte sich ein nach kurzer Plateauphase in sich zusammenbrechendes Tumorwachstum, wobei diese Tumore eine Komplettremission in Lebenszeit des Versuchstiers zeigten. Drei Versuchstiere (A3, A7, A5) zeigten ein solches Tumorwachstum. Eine zweite Tumorwachstumskurve war geprägt durch ein langsames Tumorwachstum bis zu einem Maximum zwischen dem 33. und 36. Lebenstag (18. bis 21. Tag nach Tumorimplantation), gefolgt von einer Tumorregression bis zum Versuchsende. Versuchstiere A1, A2 und A6 zeigten diese Wachstumsdynamik. Als dritte Wachstumskurve zeigte sich ein exponentielles Tumorwachstum bei Tier A4.

Einzelarstellung: Versuchstier A3 zeigte zu Beginn einen deutlich palpablen Tumor, der sich bis zum 20. Tag rapide zurück bildete.

Auch bei dem Tier A7 bildete sich der Tumor mit einem maximalen Durchmesser von 0,7 cm am 17. Tag auf 0 cm am 23. Tag zurück.

Beide Tiere blieben bis zum Ende des Versuchs tumorfrei.

Auch bei den Ratten A5 und A2 erfolgte ein Tumorrückgang von (A5) 0,4cm , (A2) 0,9cm auf 0cm bis zum 40. Tag (A5) und 53. Tag (A2).

Bei den Tieren A6 und A1 waren Maximaldurchmesser von 1,7 bzw. 1,2cm um den 39. Tag zu beobachten. Danach zeigte sich ein Rückgang des Tumordurchmessers bis zum Versuchsende auf 1,3 bzw. 0,45cm.

Versuchstier A4 wies ein deutliches starkes Tumorwachstum auf mit einem Maximum von 3cm am 36. Tag. Der Tumor wurde auf Grund des schnellen Wachstums partiell nekrotisch. Daraufhin wurde das Tier bei einem Tumordurchmesser von ca.2,8 cm am 41. Tag aus ethischen Gründen getötet.

4.2.1.2 Gruppe B (n=7)

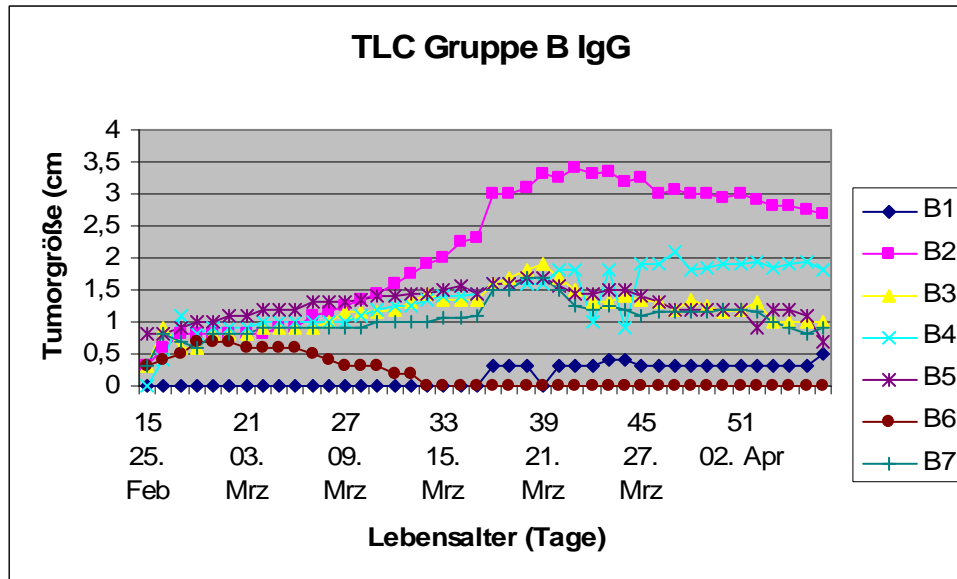


Abbildung 6: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe B

Gruppendarstellung: In dieser Gruppe ließen sich drei Tumor-Wachstums-Kurven beobachten. Vier Tiere zeigten nach anfänglicher Tumorentwicklung ein Wachstumsplateau ohne oder nur mit marginaler Tumordurchmesser-Abnahme. Drei Tiere fielen aus diesem Wachstumsverhalten heraus. Ein Tier zeigte nach anfänglichem Tumorwachstum bis zum 32. Lebenstag eine klinische Komplettremission. Ein weiteres Versuchstier entwickelte nach zunächst logarithmischem Wachstum ein Plateau auf signifikant höherem Niveau gegenüber den anderen Tieren. Ein letztes Tier entwickelte erst nach dem 32. Lebenstag einen kleinen Tumor. Bei allen Tieren konnte im Beobachtungszeitraum eine Zweiteilung der Wachstumsdynamik verfolgt werden, wobei es in der zweiten Hälfte zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Plateaubildung kam.

Einzelarstellung: Bei der Ratte B6 zeigte sich sehr schnell ein Rückgang des Tumordurchmessers von 0,7cm am 20.Tag auf 0 cm am 32.Tag. Es war das einzige Tier der Gruppe, das am Ende des Versuchs als klinisch geheilt betrachtet werden konnte.

Das Tier B1 zeigte bis zum 34.Tag keinen Tumor, entwickelte ab dann bis zum Versuchsende jedoch einen Tumor mit einem Durchmesser von 0,5 cm .

Die übrigen Tiere (B2-B5, B7) zeigten bis zum ca. 40.Tag einen Anstieg des Tumordurchmessers. Danach war eine Stagnation oder ein leichter Abfall zu beobachten.

4.2.1.3 Gruppe C (n=4)

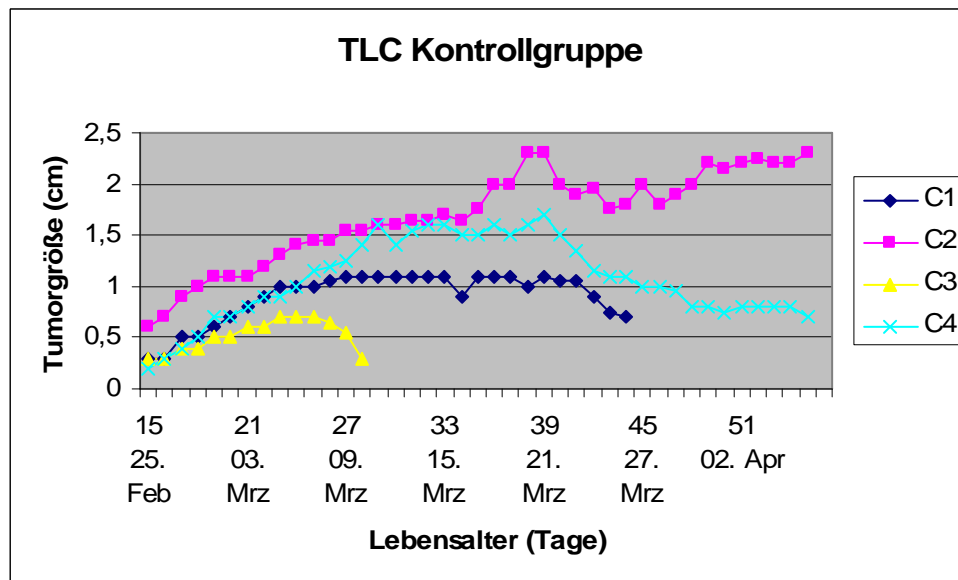


Abbildung 7: Tumorstadium der Einzeltiere in Gruppe C

Gruppendarstellung: Nach der Ödemphase erfolgte ein gleichmäßiger Anstieg der Tumorstadium bei allen Tieren dieser Gruppe. Interindividuell kam es bei drei der vier Versuchstiere zu einem Einbruch des Tumorstadiums. Ein Tier zeigte nach einem Wachstumseinbruch ein weiteres logarithmisches Wachstum.

Einzelarstellung: Bei der Ratte C3 stagnierte das Wachstum als erstes. Die Tumorstadium nahm ab dem 26.Tag deutlich ab auf unter 0,5cm. Das Tier verstarb überraschenderweise am 28.Tag. Die Obduktion zeigte außer einer auffälligen Rötung der Leber keine weiteren Besonderheiten.

Bei dem Tier C1 stagnierte der Tumordurchmesser ab dem 27.Tag bei 1,1cm und fiel dann ab dem 41.Tag bis zum Exitus am 44.Tag auf 0,7cm ab.

Nach Erreichen des Maximums des Tumordurchmessers mit 1,7cm am 39.Tag bei Versuchstier C4 ging er bis zum Versuchsende auf 0,7cm zurück.

Bei Ratte C2 war ein Anstieg des Tumordurchmessers von 1,1cm auf 2,3cm bis zum 38.Tag zu beobachten. Auffallend hierbei war ein rapider Anstieg des Durchmessers ab dem 34.Tag mit dessen anschließendem Rückgang um den 38.Tag auf 1,75cm. Ab dem 43.Tag nahm der Wert wieder kontinuierlich bis auf 2,3cm zu.

4.2.1.4 Erkrankungszustände am Versuchsende:

Neben der Tumorgöße ist auch der Verlauf resp. das Stadium der Tumorerkrankung bei den Tieren ein wichtiges Beschreibungsmerkmal. Es ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die Erkrankungszustände teile ich in fünf Stadien ein:

„Tumorfrei“

„Deutliche Remission“: wenn die Tumorgöße kleiner 50% der zuvor erreichten Maximalgröße betrug.

„Geringe Remission“: wenn die Tumorgöße um 25 bis 50% der zuvor erreichten Maximalgröße zurückgegangen war.

„Tumorstadium“ oder „Tumorrückgang <25%“ der Maximaltumorgöße.

„Tod der Tieres“ im Laufe des Versuchs mit etabliertem Tumor.

In dieser Einteilung zeigte sich die Gruppe A als die Gruppe mit den meisten Tieren (71%) in den günstigeren Stadien „Tumorfrei“ und „Deutliche Remission“. 28% der Tiere befanden sich in den ungünstigen Stadien „Wachstum und Tod“.

In Gruppe B befanden sich nur 28% in den günstigen Stadien, ebenfalls 28% befanden sich im Stadium „Geringe Remission“. Hier befanden sich 43% im Stadium „Wachstum“.

In der Kontrollgruppe starben 50% der Tiere, bei 25% war eine „Geringe Remission“ und bei weiteren 25% eine „Deutliche Remission“ zu verzeichnen. Kein Tier befand sich im Stadium „Tumorfrei“.

Tabelle 6: Erkrankungs Zustände der Versuchsgruppe TLC am Versuchsende

	Gruppe A ACA14C5 n=7	Gruppe B Mäuse IgG n=7	Gruppe C Kontrollgruppe n=4
Tumorfreier Zustand	4/7 57%	1/7 14%	0/4 0%
Deutliche Remission: Rückgang > 50%	1/7 14%	1/7 14%	1/4 25%
Geringe Remission: Rückgang um 25-50%	0/7 0%	2/7 28%	0/4 0%
Rückgang < 25% oder Wachstum	1/7 14%	3/7 43%	1/4 25%
Tod des Tieres	1/7 14%	0/7 0%	2/4 50%

4.2.2 Versuch PI

4.2.2.1 5 Millionen Tumorzellen

- **Gruppe A**

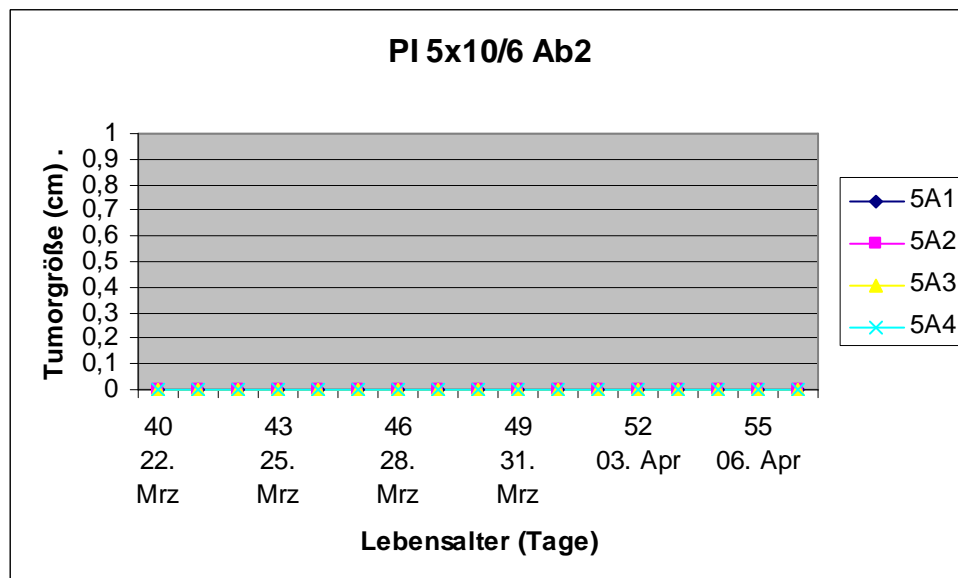


Abbildung 8: Tumorstadium der Einzeltiere in Gruppe 5A

Kein Versuchstier dieser Gruppe zeigte ein messbares Tumorstadium. Histologische postmortale Untersuchung der Rückenhaut an der Injektionsstelle ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Tumors.

- **Gruppe B**

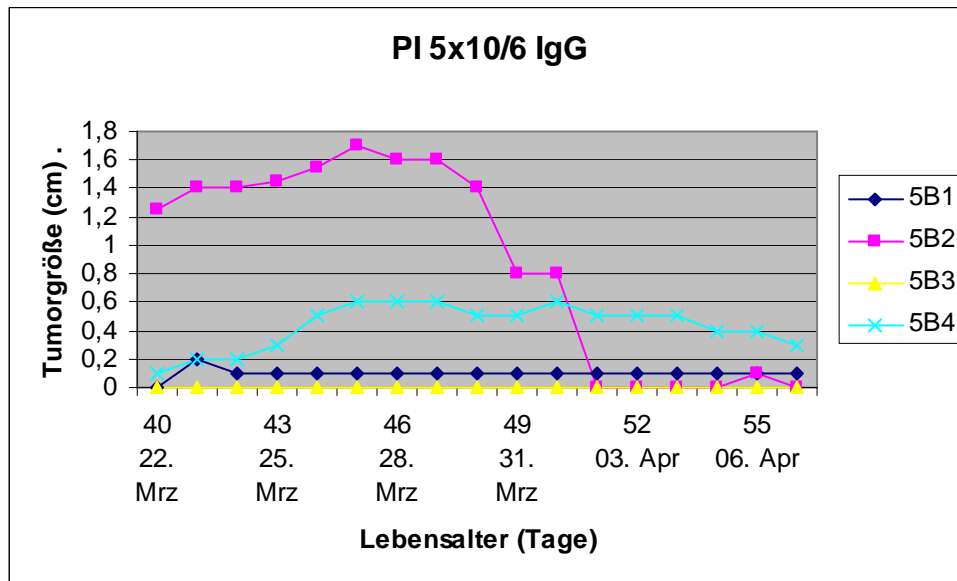


Abbildung 9: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe 5B

Das Versuchstier B3 zeigte kein Tumorwachstum. Die Ratte B1 hatte durchgehend einen gut palpablen Tumor von 0,1cm. Tier B2 entwickelte einen Tumor mit Maximaldurchmesser von 1,7cm am 45.Tag, der bis zu 51.Tag auf Dauer verschwand. Bei Ratte B4 war ein langsames Tumorwachstum zu beobachten, wobei sich der Durchmesser ab dem 48.Tag bei ca. 0,5cm hielt.

4.2.2.2 10 Millionen Tumorzellen

- **Gruppe A**

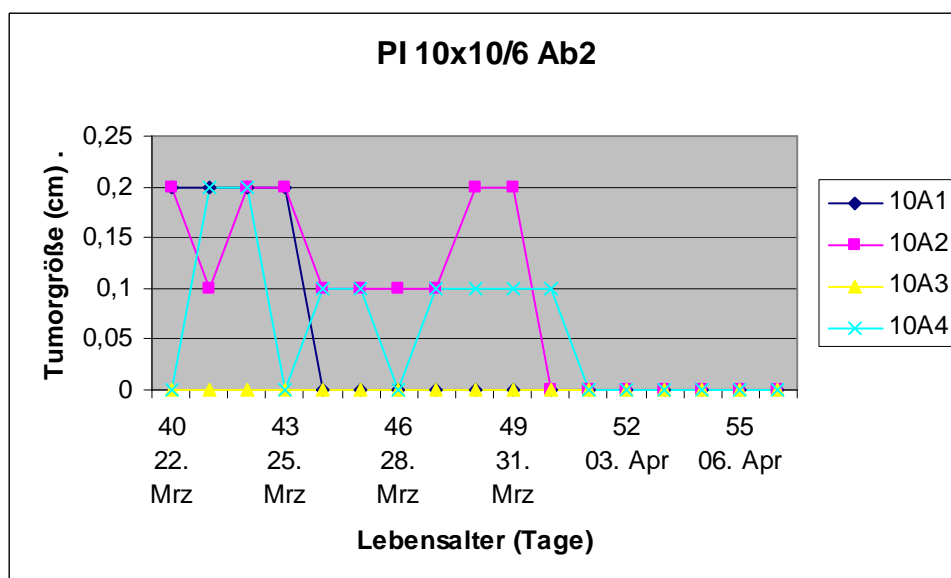


Abbildung 10: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe 10A

Die Tiere A1 und A3 zeigten kein Tumorwachstum.

Bei den Ratten A2 und A4 schwankte die palpable Tumorgöße zwischen 0cm und 0,2cm. Endgültiger Rückgang war am 51./52.Tag feststellbar.

- **Gruppe B**

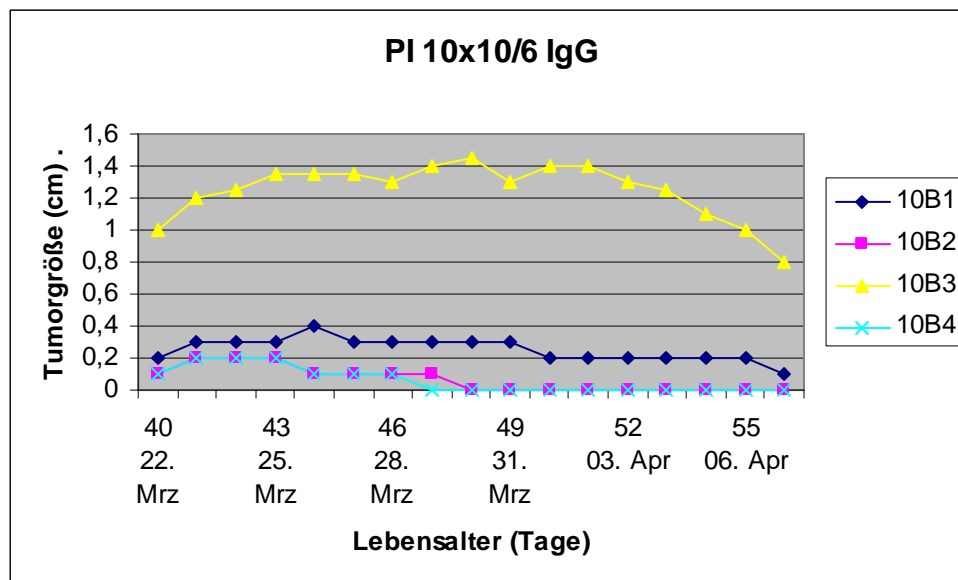


Abbildung 11: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe 10B

Bei allen Tieren war ein Tumor messbar.

Die Ratten B2 und B4 wiesen bei Beginn den kleinsten Tumordurchmesser von 0,2 cm auf und waren ab dem 48.Tag tumorfrei.

Tier B1 hatte einen Tumordurchmesser von 0,4 cm am 44.Tag, der bis zum 56. Tag auf 0,1 cm zurück ging.

Versuchstier B3 zeigte das größte Tumorwachstum mit 1,4 cm am 48.Tag. Ab da ging der Tumor auf 0,8 cm am 56. Tag zurück.

4.2.2.3 25 Millionen Tumorzellen

- **Gruppe A**

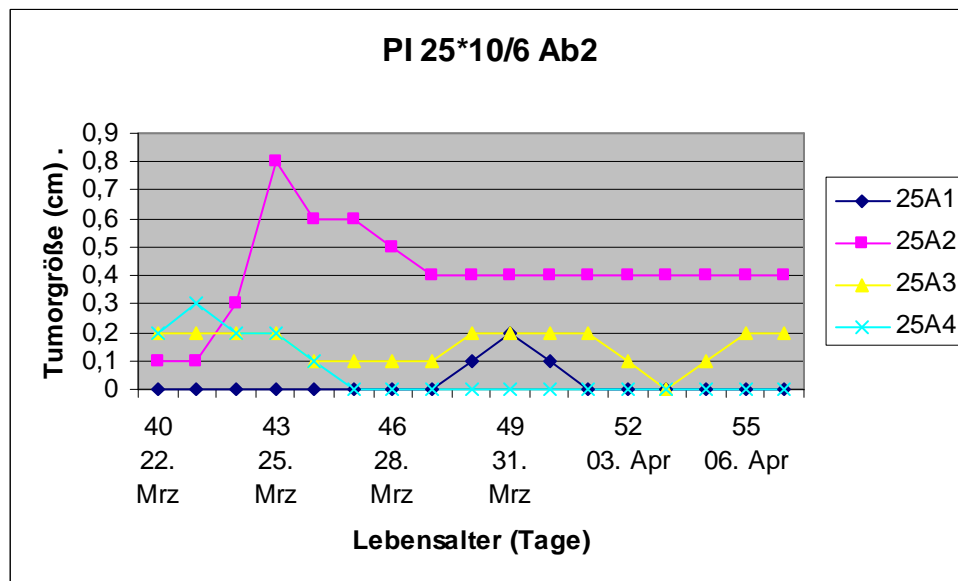


Abbildung 12: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe 25A

Das Tier A2 zeigte einen anfänglich rapiden Anstieg des Tumorwachstums von 0,1 cm /41. Tag auf 0,8 cm /43. Tag mit nachfolgendem Abfall auf 0,4 cm /47. Tag. Dieser Durchmesser blieb bis zum Versuchsende konstant.

Die Ratte A4 zeigte einen Tumorrückgang von 0,3 cm am 41. Tag auf 0 cm 45. Tag.

Bei Tier A1 war bis zum 47. Tag kein Tumor palpabel. Danach war ein kurzzeitiges Wachstum bis zu einem Durchmesser von 2 mm zu beobachten. Ab dem 51. Tag war kein Tumor mehr feststellbar.

- **Gruppe B**

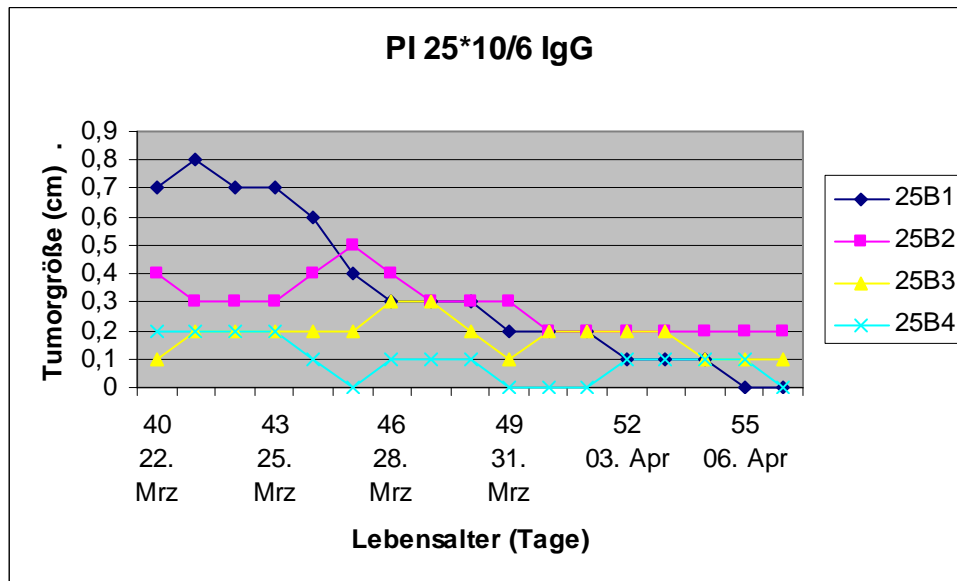


Abbildung 13: Tumorwachstum der Einzeltiere in Gruppe 25B

Das Tier B1 hatte den größten Tumor mit 0,8 cm am 41. Tag, wobei hier ein kontinuierlicher Rückgang auf 0 cm bis zum 55. Tag zu verzeichnen war.

Auch die Ratte B4 war am Ende des Versuchs tumorfrei, jedoch war hier nur ein Maximaldurchmesser von 0,2 cm am 40. Tag zu beobachten.

Die Tiere B2 und B3 zeigten erst ein Wachstum von maximal 0,3-0,5 cm, dann einen Rückgang auf 0,1-0,2 cm.

4.2.2.4 Erkrankungs Zustände am Versuchsende:

Die Gruppen A zeigten sowohl bei 5 als auch bei 10 Millionen Tumorzellen am Ende des Versuchs einen tumorfreien Zustand. Bei der Gruppe B befanden sich zwar 50% im tumorfreien Stadium, die anderen 50% befanden sich jedoch in den ungünstigeren Stadien „Geringe Remission“, oder „Wachstum“.

Bei Gruppe B waren 75% im positiven Stadium und 25% wiesen eine „Geringe Remission“ auf.

Bei der hohen Tumorlast von 25 Millionen Tumorzellen verhielten sich Gruppe A und B fast identisch. 75% verteilten sich gleichermaßen auf die günstigen Stadien. Die restlichen 25% zeigten bei Gruppe A „Wachstum“, bei Gruppe B „Geringe Remission“.

Tabelle 7: Erkrankungs Zustände der Versuchsgruppe PI am Versuchsende

	5 Millionen Tumorzellen		10 Millionen Tumorzellen		25 Millionen Tumorzellen	
	A Ab2 n=4	B Mäuse IgG n=4	A Ab2 n=4	B Mäuse IgG n=4	A Ab2 n=4	B Mäuse IgG n=4
Tumorfreier Zustand	4/4 100%	2/4 50%	4/4 100%	2/4 50%	2/4 50%	2/4 50%
Deutliche Remission: Rückgang >50%	0/4	0/4	0/4	1/4 25%	1/4 25%	1/4 25%
Geringe Remission: Rückgang um 25-50%	0/4	1/4 25%	0/4	1/4 25%	0/4	1/4 25%
Rückgang <25% oder Wachstum	0/4	1/4 25%	0/4	0/4	1/4 25%	0/4

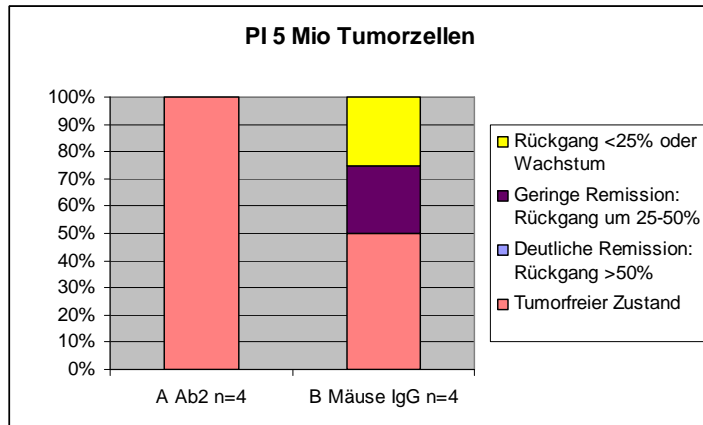


Abbildung 14: Erkrankungszustände der PI Gruppe mit 5 Mio. Tumorzellen

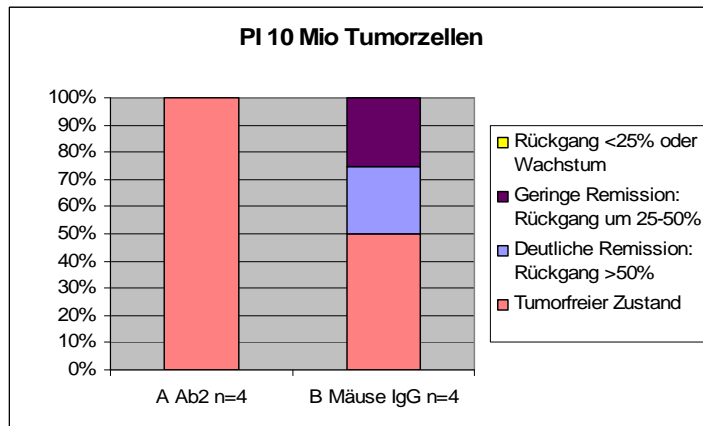


Abbildung 15: Erkrankungszustände der PI Gruppe mit 10 Mio. Tumorzellen

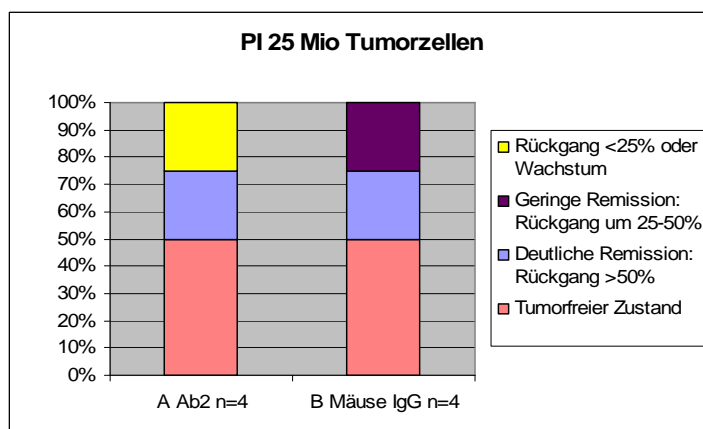


Abbildung 16: Erkrankungszustände der PI Gruppe mit 25 Mio. Tumorzellen

4.3 Gruppenanalyse

4.3.1 Versuch TLC

4.3.1.1 Allgemeine statistische Beobachtung

In dieser Gruppenanalyse werden die Mittelwerte der Tumordurchmesser in den einzelnen Tierversuchsgruppen im Vergleich der Gruppen untereinander dargestellt. In diese Darstellung gehen drei Gruppen ein: Versuchsgruppe A erhielt den Anti-Idiotypen Antikörper (100 µg ACA14C5), Gruppe B erhielt 100 µg Mäuse IgG sowie die Kontrollgruppe C, die keinerlei Immunisierung erhielt.

Am 47. Tag nach Tumorimplantation (Versuchsende) betrug der Mittelwert des Tumordurchmessers in Gruppe A 0,33 cm mit einer Standardabweichung von 0,51 cm. Der Mittelwert in Gruppe B betrug 1,29 cm mit einer Standardabweichung von 1,04 cm. Der Mittelwert der Kontrollgruppe betrug 1,43 cm mit einer Standardabweichung von 0,67 cm. Die Gruppe A zeigte also mit 0,33 cm den geringsten durchschnittlichen Tumordurchmesser am Versuchsende, während die Gruppe B mit 0,96 cm (290%) und die Kontrollgruppe C mit 1,1 cm (333%) darüber lagen.

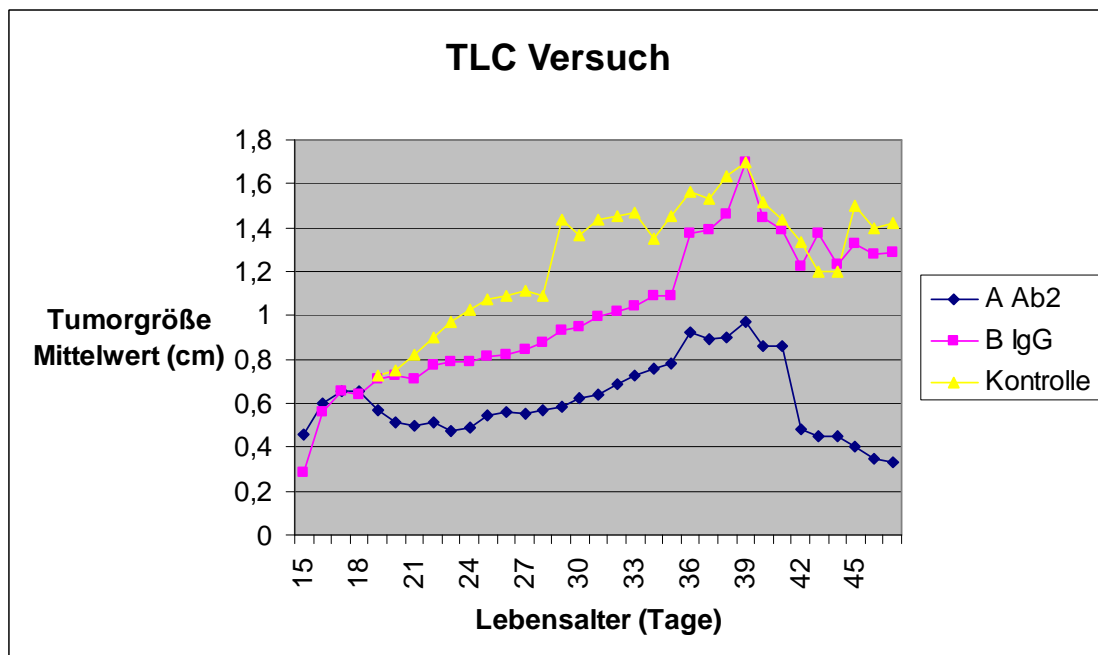


Abbildung 17: Mittelwerte aller Gruppen des TLC Versuchs

4.3.1.2 Endpunktbetrachtung

Bei kleinen Versuchsgruppen und hoher Standardabweichung sollte auch der Median als Lagemaß und als dazugehöriges Streuungsmaß der Interquartilabstand (Abstand zwischen dem 25. und 75. Perzentil) zur Auswertung herangezogen werden. Sie sind unempfindlicher gegenüber Ausreißern, jedoch auch größere Maßzahlen als der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zum Versuchsende betrug der Median der Gruppe A bei 0 mm mit einem Interquartilabstand von 0,3 cm im Gegensatz zum Mittelwert mit 0,28cm bei einer Standardabweichung von 0,52cm (d.h. 50 % der Werte liegen zwischen der Differenz des 1. und 3. Quartils in cm). Der Median der Gruppe B lag ähnlich dem Mittelwert bei 0,9cm mit einem Interquartilabstand von 0,8cm. Auch bei der Kontrollgruppe sind die Abstände minimal. Hier ist der Median mit 1,5 cm mit dem Mittelwert identisch und der Interquartilabstand beträgt 0,8cm.

4.3.1.3 Beobachtung des Kurvenverlaufs

Nach Rückgang des primären Ödems und Konsolidierung der injizierten Tumorzellen ist ein gemeinsamer Ausgangspunkt am 17.Tag bei einer Tumorgöße von ca. 0,65cm zu erkennen.

Ab hier steigen die Tumorgößen der Gruppen B und C bis zum 39.Tag auf ein Maximum von ca. 1,7cm an, wobei die Gruppe C der Gruppe B im Wachstum bis dahin immer überlegen war. Danach verzeichnen die Tiere beider Gruppen einen starken Abfall des Tumordurchmessers bis zum 44.Tag. Ab dem 45.Tag fällt die Tumorgöße der Gruppe B bis zum Versuchsende nahezu kontinuierlich von 1,3 cm um 0,2 cm auf 1,1 cm ab.

Die Kurve der Gruppe C weist zwei Tumorgrößendurchmessersprünge nach oben um ca. 0,3cm auf, die durch den jeweiligen Tod des Tieres mit dem kleinsten Tumordurchmesser zu erklären sind. Dies geschah jeweils am 28.Tag und 44.Tag Ab dem 45. Tag stieg die Kurve bis zum Versuchsende noch langsam auf 1,5 cm an.

Die durchschnittliche Tumorgröße der Gruppe A fiel bis zum 23. Tag um ca. 0,15 cm um dann bis zum 39.Tag auf ein Maximum von ca. 0,98 cm anzusteigen. Ab da fiel sie erst sehr rapide durch den Tod des Tieres mit dem größten Tumordurchmesser, dann langsam bis auf eine Tumorgröße von ca. 0,27 cm am Versuchsende ab.

4.3.2 Versuch PI

4.3.2.1 Allgemeine statistische Beobachtung

In dieser Gruppenanalyse werden die Mittelwerte der Tumordurchmesser in den einzelnen Tierversuchsgruppen im Vergleich der Gruppen untereinander dargestellt. In diese Darstellung werden drei Tierversuchsgruppen mit unterschiedlicher Tumorzellkonzentration (5×10^6 ; 10×10^6 ; 25×10^6 Tumorzellen) einbezogen. Diese bestehen jeweils aus zwei Untergruppen: Die Gruppe A, sie erhält den Anti-Idiotypen Antikörper (100 μ g ACA14C5), und die Gruppe B, die 100 μ g Mäuse IgG erhält.

4.3.2.2 Endpunktbetrachtung

- **5×10^6 Tumorzellen**

Am 46. Tag nach Tumorimplantation (Versuchsende) gibt es in Gruppe A keinerlei Tumorwachstum. In Gruppe B beträgt der Mittelwert des Tumordurchmessers 0,1cm bei einer Standardabweichung von 0,14cm.

Der Median der Gruppe B beträgt 0,05cm, der Interquartilabstand 0,15cm.

- **10×10^6 Tumorzellen;**

Bei dieser Tumorzellmenge sind am Versuchsende auch alle Tiere der Gruppe A tumorfrei. In Gruppe B beträgt der Mittelwert des Tumordurchmessers 0,23 cm bei einer Standardabweichung von 0,39 cm.

Der Median der Gruppe B beträgt 0,05 cm, der Interquartilabstand 0,28 cm.

- **25×10^6 Tumorzellen**

Bei dieser Tumorkonzentration sind in beiden Gruppen jeweils 2 Tiere bei Versuchsende tumorfrei. In Gruppe A beträgt der Mittelwert 0,15cm bei einer Standardabweichung von 0,19 cm im Gegensatz zu den Werten von Gruppe B, wo der Mittelwert 0,08cm mit einer Standardabweichung von 0,1cm beträgt. Die Mediane betragen bei Gruppe A 0,1cm mit einem Interquartilabstand von 0,25cm und bei Gruppe B liegt der Median bei 0,05cm mit einem Interquartilabstand von 0,13cm.

4.3.2.3 Beobachtung des Kurvenverlaufs

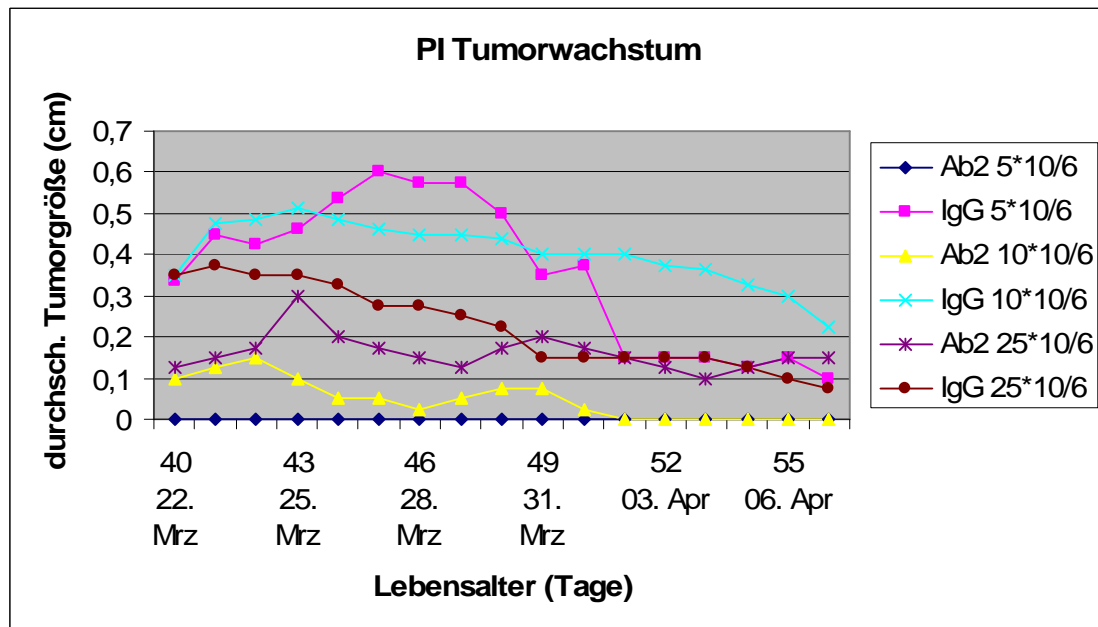


Abbildung 18: Mittelwerte aller Gruppen des PI Versuchs

- 5×10^6 Tumorzellen

Bei Gruppe A zeigt sich bei keinem Tier zu keiner Zeit Tumorwachstum. Gruppe B startet wie alle B-Gruppen bei 0,35cm, um dann nach einem kleinen Einbruch am 42.Tag zum Maximalwert von 0,6cm am Tag 45 anzusteigen. Hierauf folgt ein nahezu kontinuierlicher Rückgang des durchschnittlichen Tumordurchmessers auf ca 0,15cm ab dem 51.Tag. Ab jetzt bewegt sich der Mittelwert knapp über 0,1cm bis zum Versuchsende.

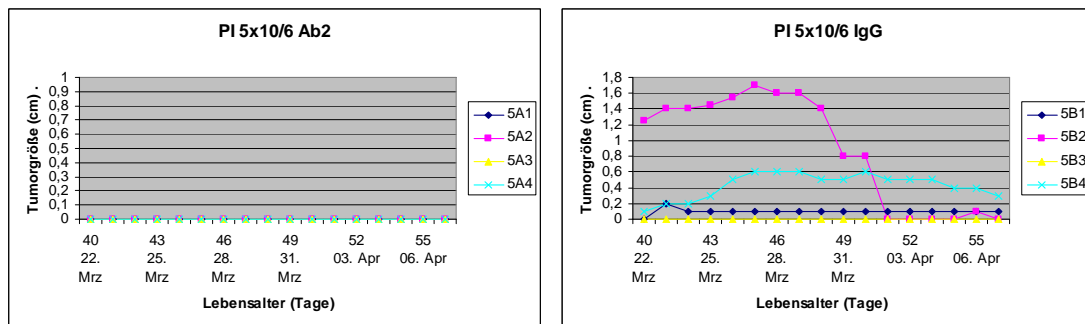


Abbildung 19: Tumorwachstum der Einzeltiere in den Gruppen des PI Versuchs mit 5 Mio. Tumorzellen

- 10×10^6 Tumorzellen

Gruppe A startet bei einem Durchmesser von 0,1cm an Tag 40. Dieser kann sich bis Tag 42 auf 0,15cm steigern. Dann sinkt er am Tag 46 auf 0,025cm ab, um dann nochmals auf 0,075cm an Tag 48/49 anzusteigen. Ab Tag 51 sind alle Tiere tumorfrei. Gruppe B startet bei 0,35cm und erlebt keinen so starken Zuwachs wie die Gruppe B der kleineren Tumorkonzentration. Sie erreicht ein Maximum von ca 0,5cm am 43. Tag. Aber auch der Tumorrückgang ist ab hier langsamer und erreicht am Tag 57 seinen Enddurchmesser von 0,23cm, der den größten durchschnittlichen Durchmesser aller Gruppen dieses Versuchs darstellt.

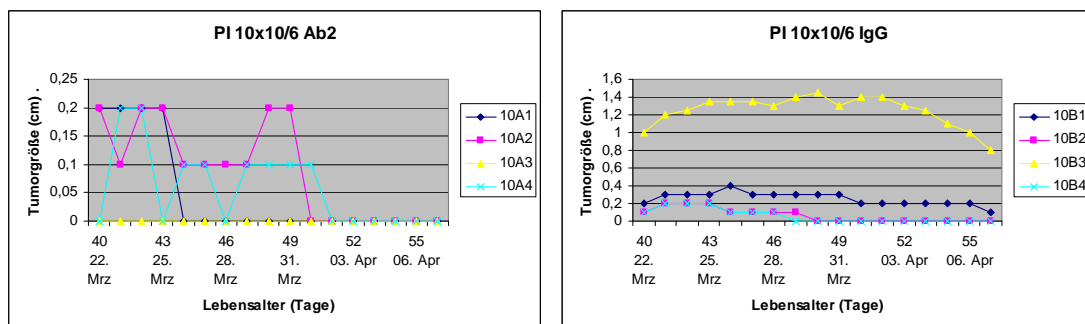


Abbildung 20: Tumorwachstum der Einzeltiere in den Gruppen des PI Versuchs mit 10 Mio. Tumorzellen

- **25x10⁶ Tumorzellen**

Gruppe A startet mit 0,125cm knapp über der Gruppe A mit der mittleren Tumorkonzentration, dann steigt der Tumordurchmesser auf 0,3cm an Tag 43 an, um dann auf 0,125cm am Tag 47 abzufallen. Wie bei der mittleren Tumorkonzentration steigt der Tumordurchmesser wieder an auf 0,2cm, ca. 2/3 des Maximaldurchmessers, am 49. Tag. Ab da zeigen sich fallende Werte, die sich nach leichtem Anstieg bei 0,15cm am Versuchsende einfinden. Gruppe B zeigt nach einem minimalen Anstieg von 0,025cm auf 0,375cm am Tag 41, einen deutlichen Abstieg auf 0,15 am Tag 49. Hier hält sich das Niveau bis zum 53.Tag, um dann bis zum Versuchsende am Tag 57 auf 0,075cm abzufallen.

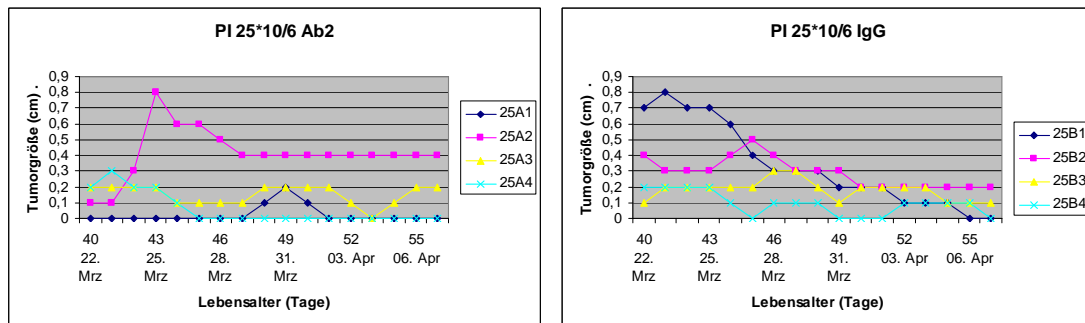


Abbildung 21: Tumorwachstum der Einzeltiere in den Gruppen des PI Versuchs mit 25 Mio. Tumorzellen

5 Diskussion

5.1 Tumorimmuntherapie

Der therapeutische Ansatz, Tumorerkrankungen mit immunmodulierenden Maßnahmen entgegenzutreten, erweist sich in den letzten Jahren aufgrund von Entwicklungen in der Grundlagenforschung, aber auch Fortschritten in der klinischen Anwendung als eine viel versprechende Möglichkeit in der onkologischen Therapie. Durch Veränderungen der Immunitätssituation kann die Abwehrbereitschaft des vom Tumor befallenen Organismus moduliert werden. Diese biologischen Therapien können regenerieren, stimulieren oder die Immunität gegenüber dem Karzinom erhöhen.

Aufgrund des grundlegenden Aufbaus der Komponenten besitzt das Immunsystem die Fähigkeit, den Körper vor Antigenen, die durch Erkrankungen, inklusive Tumorerkrankungen, repräsentiert werden können, zu protegieren. Hierbei ist die Antigenität des Tumors von entscheidender Bedeutung. Wird ein Fremdatigen nicht erkannt oder weisen die Funktionsabläufe der Immunabwehr einen Defekt auf, so führt dies zur Ausbildung der Erkrankung (Herlyn et al., 1990). Die von den Zellen des Immunsystems als wichtiger Teil dieser Abwehrfunktion sezernierten Proteintypen sind Antikörper und Zytokine. Antigenität, Antikörper und verschiedene Zytokine (Interferone, Interleukine) dienen daher als Grundlage vielfältiger Forschungsansätze und werden mittlerweile erfolgreich in der Tumorimmuntherapie angewandt. Die Immuntherapeutika lassen sich aber auch schon oft als natürliche Substanzen im Körper nachweisen (Beatty, 1992; Beverley, 1995; Bhattacharya-Chatterjee et al., 1994; Herlyn et al., 1996; Pegram et al., 1999; Riethmüller et al., 1998; Wagner et al., 1999, Pfisterer 2006).

Man bemüht sich Möglichkeiten zu finden, die vielseitigen Funktionen und Interaktionen des Immunsystems zu stärken resp. wiederherzustellen. Die Interaktion des körpereigenen Abwehrsystems mit den Krebszellen soll durch die Immuntherapeutika auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst werden. Dabei werden Prozesse in Gang gesetzt, die auch im gesunden Organismus normalerweise ablaufen (Grundmann, 1981; Liotta, 1983; Informationen des National Cancer Institute, Zhang 2003, Reinartz 2006).

Als ein Ziel werden die Reduzierung von Prozessen zur Begünstigung des Tumorwachstums und die Vernichtung wieder erkennbar gemachter Tumorzellen durch das Immunsystem angestrebt. Die für die Zerstörung von Fremdzellen verantwortlichen Zellen wie T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen sollen unterstützt und die Wachstumseigenschaften der Tumorzellen in Eigenschaften von gesunden Zellen umgewandelt werden. Ein weiteres Ziel ist es, die Sequenz ‚normale Zelle – präkanzeröse Zelle – Krebszelle‘ zu blockieren oder umzukehren. Eine Steigerung der Reparationsfähigkeiten des Körpers, auch hinsichtlich der durch vorausgegangene Behandlungen wie z. B. Chemotherapie oder Radiatio verursachten Schäden, soll ebenso wie die Verhinderung der Metastasierung erreicht werden.

Die entsprechenden bei bestimmten Tumorarten, -eigenschaften oder -stadien angewandten Therapien stoßen immer wieder an ihre Grenzen. So erwies sich beispielsweise die Anwendung monoklonaler Antikörper im adjuvanten Bereich Erfolg versprechend. Riethmüller et al. (1994) belegten die höchste Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers 17-IA gegen individuell dispersierte Zellen („minimal residual disease“). An die Zellen solider Karzinome fand lediglich eine geringe und unvollständige Bindung statt (Jain, 1990). Darauf basiert unter anderem die jetzige Indikation für die Anwendung des Antikörpers. Sie ist jedoch auf die postoperative adjuvante Therapie des colorektalen Karzinoms bei Befall der lokalen Lymphknoten ohne Fernmetastasen (Dukes, C.) begrenzt (Raab et al., 1996, Riethmüller et al., 1998). Ein weiteres Problem wirft die Antigenität der Immuntherapeutika selbst auf. Als Nebenwirkung kann nämlich eine allergische Reaktion gegen Maus-Immunglobulin hervorgerufen werden, da die meisten bisher verwendeten Antikörper murinen Ursprungs sind. Man versucht daher, mit der Herstellung chimärischer und bispezifischer Antikörper und auch mit der Entwicklung eines Single-chain-fragments eines Antikörpers (reine Fab-Fragmente) diesem Problem entgegenzuwirken (Raab et al., 1996; Schlebusch et al., 1997).

Ein weiterer Ansatz in der klinischen Immuntherapie ist die Zuführung von Immunadjuvantem. Diese Zuführung soll vorhandene körpereigene Immunprozesse gegen den Tumor anregen. Erste Versuche wurden mit Zytokinen durchgeführt (Beverly P. et al. 1995). Der Einsatz von Zytokinen verursachte jedoch massive, vor

allem grippeähnliche Nebenwirkungen (Informationen des National Cancer Institute, 1997).

Die heute verfügbaren und sich abzeichnenden unterschiedlichen Ansätze ermöglichen es der Tumormimmuntherapie, sich einer Vielzahl denkbarer Kombinationsverfahren zu bedienen. Sie finden Einsatzmöglichkeiten als Kombinationen innerhalb der Immuntherapie, aber auch als Kombinationen mit den konventionellen Therapien wie Chemotherapie und Radiatio. Daraus geht hervor, dass die Immuntherapie einen enormen Forschungsaufwand erforderlich macht, der jedoch durch die aussichtsreichen Perspektiven gerechtfertigt wird (Beatty, 1992; Raab et al., 1996).

Welchen Stellenwert nimmt nun die Immuntherapie innerhalb der konventionellen Krebstherapieverfahren ein?

Man kann davon ausgehen, dass heute und auch in Zukunft die konventionellen Krebstherapieverfahren – Chirurgie, Chemotherapie, Radiatio – die Grundlage einer modernen onkologischen Therapie darstellen. Oft bieten nur sie kurative Möglichkeiten, vorausgesetzt, die Erkrankung ist in einem relativ frühen Stadium diagnostiziert worden. Allerdings ist auch dann das Risiko groß, dass es eventuell schon zu einer Aussaat von Tumorzellen gekommen ist. Es ist zu beobachten, dass in jüngster Zeit durch verbesserte Diagnostik mehr Karzinominzidenzen mit einer disproportional höheren Zunahme von kleineren Karzinomen nachgewiesen werden (Harris et al., 1992). Einer der Hauptgründe für die Karzinommortalität dürfte in der Dissemination der Krebszellen während der frühen Stadien der Erkrankung zu suchen sein, da die Mortalität bei den meisten Karzinomerkrankungen relativ konstant geblieben ist. Dies gilt besonders für das Mammakarzinom, aber auch für das Kolonkarzinom. Aus diesem Grund ist die Anwendung nicht toxischer adjuvanter Therapien angezeigt, vorausgesetzt, die Behandlung wird gut toleriert (Riethmüller et al., 1994). Adjuvante Therapiemaßnahmen sind bei einem gewissen Anteil von Patienten nicht angebracht. Hier sollten die immuntherapeutischen Verfahren zum Einsatz kommen. Ziel ist es hierbei, durch eine Erweiterung des Spektrums der adjuvanten Therapieverfahren, Mikrometastasen zu erfassen. Eine Therapie, die den Körper bei geringer Tumorlast bei der Abwehr von Fremdzellen unterstützt, erscheint sinnvoll und viel versprechend (Riethmüller et al., 1994). Die Forschungen auf dem Gebiet der Tumormimmuntherapie bemühen sich um neue Behandlungsmethoden zur

Ergänzung der bisherigen Möglichkeiten und zur Verbesserung der Patientenversorgung.

5.2 Anti-Idiotypen zur Immuntherapie

Für Versuchsansätze mit monoklonalen Antikörpern muss ein passendes Antigen zur Verfügung stehen.

Wünschenswert ist dabei die Identifikation eines Antigens, das von vielen Tumorzellen, aber möglichst wenigen gesunden Körperzellen exprimiert wird. Der Identifikation des Antigens folgt die Aufklärung der molekularen Struktur. Der klinische Einsatzbereich könnte ansonsten von einer möglicherweise stattfindenden Kreuzreaktivität durch unerwünschte toxische Reaktionen eingeschränkt werden (Bajorin et al., 1992; Raab et al., 1996). Für das hier untersuchte CA 14C5 Antigen ist dies noch nicht erfolgt, für andere Antigene wie z.B. das CA 125 erst in den letzten Jahren (O'Brian 2001, Yin 2001, Yin 2002). Riethmüller et al. (1993; 1994) konnten allerdings belegen, dass eine absolute Spezifität für die Tumorzellen nicht zwingend notwendig ist, wenn die gesunden Körperzellen nicht besonders zugänglich für den Antikörper sind. Dies bestätigen die bisherigen positiven Ergebnisse und der Einsatz des monoklonalen Antikörpers 17-IA ohne erhebliche Nebenwirkungen (Riethmüller et al., 1998).

Auch der monoklonale Antikörper Trastuzumab zeigt, wie wichtig das Auffinden eines geeigneten Antigens ist. In diesem Fall wurde ein Antikörper gegen ein tumorspezifisches mutiertes Zelloberflächenprotein aus der Familie der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren entwickelt (Hudziak et al., 1989; Slamon et al., 1989a, 1989b), der keine Kreuzreaktivität mit dem Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor zeigt (Press et al., 1990). Es bestätigte sich, dass eine HER2/neu-Überexpression in 25-30% der Mammakarzinome stattfindet. Diese Überexpression steht mit einer erhöhten Rezidivrate und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit in Wechselbeziehung (Press et al., 1993). Dadurch wird es möglich, den Indikationsbereich gezielt bei einem Patientenkreis, der von der Therapie profitieren kann, einzusetzen. Allerdings ist dieser Kreis relativ klein, da die Überexpression nur 25-30% der Mammakarzinome erreicht. Unsere Arbeitsgruppe wählte das Antigen CA 14C5 wegen seiner günstigen Eigenschaften für den Therapieansatz mit monoklonalen Antikörpern aus. Dabei

handelt es sich um eine extrazelluläre Domäne eines Plasmamembranmoleküls auf SK-BR-3 Brustkrebszellen. Eine Blockierung dieses Epitops mit dem monoklonalen Antikörper 14C5 hemmt den Ablauf von Adhäsions- und Invasionsprozessen, so dass davon ausgegangen werden darf, dass es sich um ein Adhäsionsmolekül handelt, welches Tumorinvasions- und Metastasierungsprozesse vermittelt (De Potter et al., 1994). Eine Untersuchung entsprechend der von Press et al. (1993) wäre sicherlich auch hier aufschlussreich. 14C5-exprimierende Tumore tendieren vermutlich vermehrt zu Metastasierung und damit erhöhten Rezidivraten. Coene et al. (1997) konnten nachweisen, dass CA 14C5 von 64% der invasiv duktalem Mammakarzinome, der mit 65-80% häufigste Tumortyp der Mammakarzinome, überexprimiert wird. Auf normalem Gewebe ließ sich keine Expression nachweisen mit Ausnahme von myoepithelialen Zellen von Brust- und Nierengewebe. Für einen therapeutischen Ansatz mit dem ACA 14C5 ist dadurch eine gute Grundlage vorhanden. Mit diesem Konzept (auch bereits klinisch mit einem Anti-Idiotypen Antikörper ACA 125 beim Ovarialkarzinom) konnten gute Erfahrungen gemacht werden, da der Therapieansatz sich als wirksam und ohne nennenswerte Nebenwirkungen erwies (Wagner et al., 1999).

Da eine zytotoxische Wirkung unabhängig von der Phase des Zellzyklus der Tumorzellen ist, rechtfertigt dies insbesondere den Einsatz einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Der überwiegende Teil der mikrometastasierten Zellen befindet sich nicht im Zustand der Proliferation, sondern im Stadium der Ruhe (G₀-Phase) und ist somit resistent gegen antiproliferativ wirkende Chemotherapeutika (Pantel et al., 1993a; 1993b; Riethmüller et al., 1994). Speziell bei Mammakarzinomen erweist sich die Mikrometastasierung, häufig gefolgt von Spätmetastasen, als ein Hauptproblem in der Therapie. Eine effektive Diagnose von Mikrometastasen ist derzeit noch nicht möglich, so dass eine wirksame und nebenwirkungsarme Behandlung auch bei solchen Patientinnen angebracht erscheint, die eigentlich keiner Therapie bedürften. Die recht schwierige Behandlungssituation wird durch die inzwischen sehr aufwendigen Risikogruppierungen zur Indikationsstellung der adjuvanten Therapieformen (siehe Kapitel 1.6 Das Mammakarzinom) verdeutlicht. Die Antikörpertherapie kann daher als geeignete Ergänzung der antiproliferativen Chemotherapeutika im Einsatz gegen die hauptsächlich in Ruhe befindlichen

Mikrometastasen eingesetzt werden. Erstrebenswert ist dabei die daraus resultierende Verringerung der Nebenwirkungen der Chemotherapie durch eine niedrigere Dosierung.

Wie bereits unter 4.1 erwähnt, ist die Bindung von monoklonalen Antikörpern an die Zellen von soliden Karzinomen nur gering bzw. unvollständig (Jain, 1990; Riethmüller et al., 1994). Größere Tumorzellaggregate werden vermutlich durch ihre basale Membran geschützt, sodass die Antikörpertherapie unwirksam ist. Durch ein größeres Volumen der lokalen Karzinomaggregate und ein ungünstiges Umfeld, wie beispielsweise narbiges unzureichend durchblutetes Bindegewebe mit schlechten Penetrationseigenschaften für den Antikörper und die Effektorzellen, kann der 17-IA-Antikörper ein Lokalrezidiv nicht verhindern (Riethmüller et al., 1994). Riethmüller et al. (1994) begründen die positive Wirkung des monoklonalen Antikörpers 17-IA auf minimal residuale Kolonkarzinomzellen, nämlich die Unterdrückung oder Verzögerung der Fernmetastasierung, mit der verstreuten Lokalisation der Tumorzellen im mesenchymalen oder retikuloendothelialen Kompartiment. In diesen Kompartimenten finden sich vermehrt die Effektormechanismen wie Komplement- und Killerzellen (NK-Zellen), mikrometastatische Zellen sind hingegen nur selten anzutreffen.

5.3 Bewertung der Versuchsergebnisse

5.3.1 TLC-Versuch

Ziel des Versuches war, die Wirksamkeit des Anti-Idiotypen Antikörpers (Ab2) auf das Tumorwachstum im Tiermodell im Vergleich zur „Immunisierung“ mit neutralem Mäuse-IgG zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen die immunologische Wirkungsweise der Kreuzreagibilität immunkompetenter Systeme humoraler und zellgebundener Art in Bezug auf einen Kreuzantigen tragenden Tumor belegen.

Um die klinische Wirksamkeit des Antiidiotypen herauszuarbeiten, wurde in der Kontrollgruppe (Gruppe B) nur mit immunologisch neutralem Mäuse-IgG immunisiert. Die rein klinische versuchsystem-immanente Belastung war für alle Versuchstiere dadurch gleichgehalten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass unspezifische Immunreaktionen, die durch Stress bei den Versuchstieren ausgelöst werden, das Versuchsergebnis beeinflussen können. Um den Einfluss von Stressoren

auf das Versuchsergebnis von der Wirkung des anti-idiotypischen Antikörpers trennen zu können, wurde in der Versuchsgruppe C nach erfolgter Tumorimplantation nicht therapiert. Es kann somit postuliert werden, dass die Dynamik des Tumorwachstums in dieser Gruppe dem ungebremsten Tumorwachstum unter den standardisierten Tierversuchsbedingungen entspricht.

Sieben Tage nach Tumordinjektion wurde mit der Immunisierung begonnen, damit der Tumor sich adäquat etablieren und das entstandene Injektionsödem sich weitestgehend zurückbilden konnte. So besaßen alle Tiere bei Versuchsbeginn einen vergleichbaren Tumorbefall.

Der Mittelwert der Therapiegruppe A zeigte ab dem dritten Tag (73h) nach Erstimmunisierung einen signifikanten Abfall des Mittelwertes der Tumorgöße im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Die weitere Entwicklung der Tumorgößen lag ab diesem Zeitpunkt deutlich unter der der anderen Gruppen. Mit 71.4 % der Versuchstiere in deutlicher Remission (>50 % des Tumorumfanges) und tumorfreiem Zustand in Gruppe A gegenüber 29 % in der Versuchsgruppe B und 25 % in Gruppe C am Versuchsende konnte eine signifikante Wirkung des anti-idiotypischen Antikörpers dargestellt werden. Auch unter Berücksichtigung des Medians konnte gezeigt werden, dass die Tumorkontrolle in Gruppe A am effektivsten war. In dieser Gruppe konnten vier Tiere komplett geheilt werden. Ein Tier (A2) konnte als non-responder angesehen werden, da es ein stetiges Tumorwachstum zeigte, welches der Tumorkinetik in Gruppe C glich.

Die Entwicklung von Mittelwert und Median in Gruppe B befand sich nahezu immer unterhalb der entsprechenden Werte von Gruppe C. Dies lässt den Schluss zu, dass auch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch murines IgG einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung eines Tumors hat.

Bei den für alle Tiere standardisierten Versuchs- und Lebensbedingungen kann in den hier vorgestellten Versuchdaten des Versuches TLC eine immunologische Wirkung des anti-idiotypischen Antikörpers ACA 14C5 dargestellt werden, die über eine unspezifische Wirkung durch Immunisierung durch murines IgG hinaus geht. Wie schon die Daten von Wagner et.al. 1994 in Bezug auf den ACA 125 zeigten, kann eine spezifische immunologische Wirkung auf humoraler und zellulärer Ebene postuliert werden. Dieser Reaktion geht ein Erkennen des Antikörpers voraus, die gefolgt wird

von einer immunologischen Modulation, die den applizierten Anti-idiotypen inaktiviert. In weiteren kaskadenartig folgenden Schritten wird kreuzreaktiv solubles sowie zellgebundenes 14C5 geblockt und die Apoptose 14C5 tragender Tumorzellen eingeleitet (Jerne N. 1974; Mittelman A. et. Al. 1992). Fraglich bleibt das genaue Ablaufschema, in dem dies geschieht. Weiterführende laborchemische Untersuchungen müssen den genauen spezifischen immunologischen Wirkungsregelkreis untersuchen.

5.3.2 PI-Versuch

Dieser Versuch sollte zeigen, wie groß der Einfluss einer Immunisierung vor Implantation auf das Tumorwachstum bei unterschiedlich großen Tumorimplantationsmengen ist.

Alle Tiere wurden am 15. Lebenstag bzw. 14 Tage vor Tumorimplantation zum ersten Mal immunisiert. Gruppe A mit 100 μ g Ab2 (anti-idiotypischer Antikörper 14C5), die Kontrollgruppe B mit 100 μ g Mäuse-IgG. Allen Versuchstieren wurden unter standardisiertem Verfahren Tumorzellen implantiert. Dies erfolgte in drei unterschiedlichen Tumorzellkonzentrationen (5×10^6 ; 10×10^6 ; 25×10^6 Tumorzellen). Hierbei wurden die Tiere per Zufallsprinzip den unterschiedlichen Gruppen zugeteilt. Bei allen Untergruppen der Gruppe A zeigten sich signifikant geringere Tumorstadiumsraten als bei den Untergruppen der Versuchstiergruppe B. Die Untergruppe mit der geringsten Tumorzellkonzentration von 5×10^6 Zellen zeigte überhaupt kein Tumorwachstum, die mit der mittleren Zellkonzentration (10×10^6) zeigte bei Beginn der Messung bei drei Viertel der Versuchstiere ein schwach ausgeprägtes Wachstum und am Ende des Versuchs eine vollständige Tumorfreiheit. Die Gruppe mit der hohen Tumorzellkonzentration (25×10^6) zeigte ein deutliches Wachstum, wobei der Durchschnitt der Tumorgröße immer unter dem aller anderen Versuchstiere der Untergruppen in Gruppe B lag.

Die Kontrollgruppen starteten mit ihrem Tumorwachstum auf etwa dem selben Niveau, Das geringste Wachstum zeigte die Gruppe mit der höchsten Tumorkonzentration. Forster et.al. konnten 1990 nachweisen, dass eine tumorspezifische Zellzahl existiert, die optimale Tumorimplantation und Wachstum zur Folge hat. Hierbei sind hohe Tumorzellzahlen in konstanten Volumen

ab einem zellspezifischen break even schlechter in Tumorentwicklung und Wachstum. Angenommen wird, dass in hohen Konzentrationen Tumorzellen sich gegenseitig in Implantations- und Adhäsionseigenschaften behindern. Dies kommt auch in unseren Daten zum Tragen. Im weiteren Versuchsverlauf unserer Untersuchung kam es zu einem stetigen Rückgang des Median und des Durchschnitts der Tumorgröße. Das stärkste Wachstum zeigte die Gruppe mit dem niedrig dosierten Tumor. Hier ist aber auch nach etablierter Immunisierung der deutlichste Rückgang innerhalb der Gruppen B zu beobachten. Die mittlere Gruppe verhält sich genau zwischen den beiden anderen, sie zeigt einen leichten Anstieg mit einem ebenso mäßigen Rückgang.

Geht man davon aus, dass eine spezifische Immunisierung mit Ab2 Antikörpern in den Gruppen A stattfindet, dann zeigt sich die Wirkung am besten bei geringer Tumorlast und schlecht organisierten kleinen Tumoren. Je größer die Tumorlast wird, und damit wird auch die Einnistung effektiver, desto schlechter ist die Penetration der Effektormechanismen an die Tumorzellen. Dieses Ergebnis wird durch die Versuche von Rietmüller et.al. 1994 und Roitt I.M. 1993 bestätigt.

Bei den Kontrollgruppen zeigte sich ein etwas anderes Bild: Je geringer die Tumorlast war, desto besser sind die Tumore gewachsen. Wenn wir davon ausgehen, dass das Immunsystem durch die IgG Injektion unspezifisch aktiviert ist und wir eine geringe Zellmenge injizieren, ist auch der Reiz auf das Immunsystem geringer als bei großer Zellmenge in größerem Injektionsvolumen.

Der Tumor kann sich mit der geringen Zellkonzentration erst einmal relativ unbedrängt etablieren, bevor er dann nach erfolgter spezifischer Immunisierung effektiv detektiert und die Tumorzellen in die Apoptose gedrängt werden. Somit ist ein Anstieg von Durchmesser und Median bis um den 45. Tag zu beobachten, dann folgt ein verstärkter Rückgang des Tumordurchmessers. Betrachtet man die Einzeltiere, so waren am Ende 2 von 4 tumorfrei, wobei ein Tier nie Tumor hatte, wohingegen das andere Tier mit dem größten Tumordurchmesser aller Tiere aufwarten konnte. Die Tumorträger dieser A Gruppe zeigten nach dem geringen (0,2cm) bis mäßigen Wachstum (0,6cm) einen dezenten Rückgang, der dann stagnierte (0,1cm und 0,4cm).

Bei der Untergruppe in Gruppe B mit der mittleren Tumorkonzentration zeigten alle Tiere Tumorwachstum, 3 Tiere geringes (um 0,2cm), ein Tier starkes (1cm). Die

beiden Tiere mit dem geringsten Tumorwachstum waren am Ende tumorfrei, bei den beiden anderen ist ein leichter Rückgang nach ebenso leichtem Anstieg zu beobachten. Die Untergruppe in Gruppe B mit der höchsten Tumorlast bot folgendes Bild: Das Tier mit dem größten Tumor zeigte einen konsequenten Tumorrückgang bis auf Tumorfreiheit am Ende des Versuchs. Ein Tier mit mittlerem Durchmesser zeigte zunächst Wachstum des Tumordurchmessers, dann Rückgang, der auf niedrigem Niveau stagnierte. Die Tiere mit kleinem Tumor zeigten Wachstum und Rückgang in gleichem Maße, so dass nur ein Tier von ihnen am Ende tumorfrei war, was aber wie der Gesamtverlauf der Kurve zeigt, keine endgültige Heilung bedeuten muss.

Am Ende des Versuchs hatten alle Kontrollgruppen den gleichen Median von 0,05cm. Den geringsten durchschnittlichen Tumordurchmesser hatte allerdings die Gruppe mit der größten Tumorlast (0,075cm), gefolgt von der Gruppe mit der kleinsten Tumorlast mit 0,1cm. Deutlich darüber lag die Gruppe mit der mittleren Tumorkonzentration mit 0,225cm

Dies unterstützt oben genannte Theorie, dass eine große Tumormenge, die auch starkes Wachstum zeigt, von einem aktivierten Immunsystem effektiver bekämpft werden kann als eine kleine. Wachstumskinetik scheint an allgemeine Perfusions- und interzelluläre Kontakt-stoffwechselprozesse gebunden. Dies hat zellbiologisch sowohl tumor-nutritive wie tumor-destruierende Effekte. Mit spezifischen immuntherapeutischen Ansätzen wie in den hier vorgestellten Versuchen wird die spezielle Tumorkinetik von der Art der Immuntherapie, unspezifisch durch murines IgG oder spezifisch durch ACA14C5, beeinflusst, wobei kleine und schlecht perfundierte Tumore mit geringen Wachstum sich gegenüber großen Tumoren mit guter Perfusion durch ein schlechteres Ansprechen auszeichnen. Dies kann sich in einem weiteren Wachstum bei schlechterer Dynamik und langsamerer Tumorregression unter Therapie äußern. Weitere Versuche mit einer größeren Versuchstierzahl müssten die theoretischen Ansätze untersuchen.

Des Weiteren sollten Versuche zur Tumornutrition und Oxygenierung unter immunologischer Therapie durchgeführt werden. Erste Versuche zur Neoangiogenese haben zu Therapieansätzen geführt, die die Angiogenesefaktoren als Target immunologischer Ansätze fahren und die präklinische Forschung schon überwinden. Es ist damit zu rechnen, dass im weiteren Verlauf immunologische Anti-Angiogenese-

Faktoren wirksame Substanzen in der immunologisch-onkologischen Therapie darstellen werden.

5.4 Ausblick zur klinischen Anwendung und Bedeutung des Anti-Idiotypen Antikörpers

Die Therapie mit Anti-Idiotypen Antikörpern zur Erzeugung einer spezifischen Antwort gegen Tumorgewebe bietet einen immuntherapeutischen Ansatz, dessen Weiterentwicklung und klinische Anwendung berechtigt sind. Die Entwicklung optimaler Anti-Idiotypen Antikörper erweist sich jedoch als recht aufwendig. Weitere intensive Forschungsarbeit ist notwendig. Tumormimmuntherapeutika wie Panorex® und Herzeptin® sind möglicherweise bisher wirkungsvoller, da sie als passive Immuntherapeutika auf der Ak1-Stufe schneller entwickelt werden konnten. Beide Therapien treffen zum Teil in den gleichen Effektormechanismen zusammen und nach der Netzwerk-Theorie wird auch bei Applikation von Ak1 die Produktion von Ak2 induziert, so dass folglich auch hier positive Auswirkungen erwartet werden können (Riethmüller et al., 1994). Es liegen ausreichend Beweise vor, dass auch die Ak2 antitumorale Effekte bewirken (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1994). Offenbar ergeben sich aber erhebliche Schwierigkeiten bei der Identifizierung des geeigneten antiidiotypischen Antikörpers (Ak2). In dem Versuch ‚Idiotype Matching‘ wurden nur zwei verschiedene Antikörper erprobt, die beide zu antitumoralen Effekten qualifiziert waren. Es bleibt zu untersuchen, ob weitere Hybridomazellklone auch effektive Ak2 erzeugen können, und ob davon eventuell einer noch effektiver ist. Eine wichtige Aufgabe ist demnach, den am besten geeigneten Ak2 zu ermitteln. Die ersten Versuche findet man bei Raychaudhuri et al. (1990). Sie recherchierten nach strukturellen typischen Merkmalen der protektiven Ak2, versuchten Unterschiede in der Bindungsaffinität der Ak1 zu den Ak2 zu ermitteln und untersuchten die Fähigkeit der Ak2, anti-TAA Antikörper (Ak3) zu produzieren. Bei diesen Ermittlungen konnte allerdings nur dargelegt werden, dass die biologische Aktivität der Ak2 auf Strukturen der variablen Region zurückgeführt werden kann, die beiden letzten Punkte zeigten sich als nicht aussagekräftig. Die Suche nach dem geeigneten Antikörper sollte also über die Sequenzanalyse Ak2 und möglichst auch des TAA erfolgen.

Roitt et al. (1998) führen einen bedeutenden Grundsatz hinsichtlich der Anti-Idiotypen Vakzination an: “anti-idiotypic vaccines could be used when the original antigen is insituable“. Das originäre Antigen selbst ist nicht immunogen, und eine verfügbare Sequenz besteht nicht. Unbekannt ist ebenfalls die molekulare Struktur, dies gilt auch für 14C5 und z.B. auch für CA 125 (Wagner et al. 2001). Monoklonale Anti-Idiotypen Antikörper können also für schwierig zu isolierende und zu charakterisierende Antigene hergestellt werden. Außerdem ist ihre Produktion in großen Mengen möglich. Der Anti-Idiotyp wird nun als Ersatz für das originäre Antigen angewandt und kann eine Immunantwort gegen dessen Epitop, das selbst keine ausreichende Immunogenität besitzt, hervorrufen. Mittels Anti-Idiotypen Antikörpern lassen sich demnach immunologische Toleranzen gegenüber Tumorantigenen ausschalten. Die Tatsache, dass die Anti-Idiotypen Antikörper nicht infektiös und daher bedingt risikoarm sind, macht sie für den Einsatz im klinischen Bereich besonders geeignet.

5.5 Überlegung zur generellen Anwendung einer Immuntherapie in der Onkologie

Die Immuntherapie mit Anti-Idiotypen Antikörpern gegen Tumorgewebe beinhaltet einen immuntherapeutischen Ansatz, dessen weitere Entwicklung bis zur klinischen Anwendung sinnvoll erscheint. Die Immuntherapie ist bei hoher Spezifität und eng umschriebener, gut dargestellter und untersuchter Wirkungsweise nebenwirkungsärmer und somit weniger belastend als die meisten heute gängigen angewandten Chemotherapeutika. Wenn auch anfangs die überhöhten Ansprüche an die Effektivität unterschiedlicher Vakzinierungsstrategien nicht erfüllt werden konnten, so trägt doch die wachsende Kenntnis der hochkomplexen immunologischen Zusammenhänge zunehmend dazu bei, die Schlüsselfunktionen in der Induktion und Regulation des Immunsystems zu definieren und neuere Ansätze mit einzubeziehen (Reinartz 2006, Baxevanis 2008).

Die in diesen Versuchen genutzten Anti-Idiotypen Antikörper haben zum einen gegenüber den früher verwendeten Ab1 den Vorteil, dass sie in einer wesentlich geringeren Dosierung eingesetzt werden müssen, was die unerwünschte Nebenwirkungsrate weiter senkt, zum anderen besteht ihre Wirkung durch die passive Immunisierung über das Vorhandensein des Antikörpers hinaus. Versuch PI zeigt, dass

eine präventive Immunisierung, die mit einer Impfung vergleichbar ist, bei einer geringen Tumorlast kein Tumorwachstum erlaubt bzw. das Tumorwachstum abschwächt.

Ziel der Immuntherapie ist, das Abwehrsystem des Karzinomträgers zu aktivieren, so dass es in der Lage ist, die Karzinomzellen zu töten. Versuch TLC belegt dies mit dem deutlich geringeren Tumorwachstum in Gruppe B, die nur Mäuse IgG erhielt, im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies bestätigt den positiven Effekt einer unspezifischen Immunsystemaktivierung. Mit dem passenden Ab2-Anti-Idiotypen-Antikörper wurde dem Immunsystem zusätzlich die Möglichkeit einer gerichteten Abwehrreaktion gegeben. Diese Gruppe zeigt bei den Responder-Tieren eine signifikante Tumor-Remission.

Das belegt zum einen die Wirksamkeit der Anti-Antikörper, zum anderen zeigt auch eine unspezifische Immunisierung eine bessere antitumorale Wirksamkeit als gar keine Behandlung. Diese Tatsache relativiert die Probleme bei der Herstellung und dem Einsatz von hundertprozentig effektiven Antikörperpräparaten (Riethmüller1993; Wagner 1995).

Die belegte Effektivität bei der Bekämpfung von Karzinomzellen, sowohl durch eine unspezifische als auch eine spezifische Aktivierung des Immunsystems, in Verbindung mit ihrer langen Wirksamkeit, auch nach letztmaliger Gabe, prädestiniert diese Immuntherapie zu einem adjuvanten Einsatz bei der Therapie des Mammakarzinoms bei R0-Situation nach erfolgreichem chirurgischem Eingriff.

Das immunologische Gedächtnis, was der Immuntherapie einen deutlichen Vorteil gegenüber den klassischen Chemotherapeutika ermöglicht, ist auch für die Erfolg versprechenden Ergebnisse des PI-Versuchs verantwortlich. Sie weisen einen möglichen Weg zur Immunisierung von Hochrisikopatientinnen schon vor Auftreten des Primärtumors.

Beide Teilversuche, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, reihen sich in die sich momentan entwickelten und in Metaanalysen korrelierten Therapieprinzipien ein (Viani 2007, Dahabreh 2008). Diese Therapien werden zusammen mit weiteren Ansätzen wie z.B. der antihormonellen Therapie hormonsensitiver Mammatumore die onkologische Medizin in Richtung intelligenter Therapiemethoden weiterentwickeln.

6 Zusammenfassung

Die Immuntherapie beschreitet in den letzten Jahren neue Wege, sie ist immer mehr zu einem Hauptgegenstand der onkologischen Forschung geworden. In einigen Gebieten ist sie schon fester Bestandteil bei der Therapie onkologischer Erkrankungen. Sie ist in der Lage, das patienteneigene, individuelle Immunsystem mit seinem zum Teil noch unüberschaubaren Potential zur gezielten effektiven Tumorbekämpfung nutzbar zu machen. Bislang ist die Immuntherapie nicht als eigenständige Therapie der ersten Wahl etabliert. Die meisten immuntherapeutischen Ansätze werden additiv angewendet nach Stabilisierung der Erkrankung mit etablierten konventionellen onkologischen Therapien. Dies führte in den letzten Jahren zur Entwicklung verschiedener immuntherapeutischer Behandlungsstrategien. Eine dieser Strategien verfolgt die Immun-Netzwerk-Theorie von Nils Jernes, indem sie von der Wirksamkeit einer Impfung mit anti-idiotypischen Antikörpern (Ab2) ausgeht. Dieser Theorie nach enthalten die variablen Antigenbindungsregionen von AB2 das „internal-image“ des Antigens, in diesem Fall eines tumorassoziierten Antigens (TAA) der Karzinomzelle. Der mit Ab2 geimpfte Organismus beginnt nun gegen diesen Antikörper vorzugehen und einige der Ab3 richten sich auch gegen das „internal image“ und somit gegen das TAA. Somit kann eine selektive Immunisierung mit einem AB2 eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen der Tumorzelle auslösen.

Das Mammakarzinom ist bei Frauen bei weitem die häufigste Krebstodesursache. In der Altersgruppe zwischen dem 39. und 58. Lebensjahr ist das Mammakarzinom sogar in der Einzeltodesstatistik führend. Die Inzidenz beträgt 100/100000. Der Altersmedian liegt bei 57 Jahren, wobei die Inzidenzrate mit steigendem Lebensalter zunimmt. Im Jahre 2005 sind weltweit 502000 Frauen an den Folgen von Brustkrebs verstorben.

Die Ursache des Mammakarzinoms ist unbekannt. Es gibt jedoch epidemiologische Beobachtungen, die gewisse Risikofaktoren als gesichert ansehen. Auch ist die Existenz von genetischen Faktoren, die zu sog. Brustkrebsfamilien führen, schon lange bekannt. Der Nachweis des BRCA 1 Gens geht mit einem >60%igen Brustkrebsrisiko vor dem 50. Lebensjahr einher.

Viele Brustkrebszellen exprimieren ein Molekül, das von De Potter et al. (1994) und Coene et al. (1997) als ein Adhäsionsmolekül, das 14C5 Molekül, identifiziert wurde. Dieses wird auf den Epithelien von invasiven duktalem Mammakarzinomen mit einer Häufigkeit von 64% exprimiert, auch bei duktalem Carcinoma in situ zeigt es eine erhöhte Dichte. Hingegen kommt es nahezu bei keinem Normalgewebe vor. Versuche mit SK-BR-3-Zellen haben gezeigt, dass Tumorzellen die Eigenschaft zur Invasion verlieren, wenn der 14C5 Rezeptor durch MAk14C5 blockiert wird

Mit diesen Erkenntnissen und den ermutigenden Ergebnissen bei den Studien mit anti-idiotypischen Antikörpern gegen ACA125 beim Ovarialkarzinom versuchten wir jetzt, ein ähnliches Konzept bei der Therapie des Mammakarzinoms mit Ab2 Antikörpern zu entwickeln und im Tiermodell zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse und Schlussfolgerungen von zwei Tierversuchen mit ACA 14C5 vorgestellt. Im ersten Versuch (TLC) wird die Wirksamkeit der Immunisierung bei individuell verschiedener Tumorgröße und Einbindung in den umgebenden Zellverband untersucht. So werden die unterschiedlichen Ausgangssituationen in Bezug auf das Tumorstadium bei Therapiebeginn simuliert. Im zweiten Versuch (PI) wird die implantierte Tumorzellzahl bei prophylaktischer Immunisierung mit ACA14C5 variiert. So soll die Wirksamkeit einer prophylaktischen Immunisierung untersucht werden.

Im TLC-Versuch wurden den Tieren am 9. Lebenstag 5 Mio Tumorzellen der Ratten-Fibrosarkom-Zelllinie HH-16cl.2/1 von Prof. Hölzel s.c. auf dem Rücken injiziert. Sie wurden ab dem 21. Tag nach Tumorimplantation alle 7 Tage intraperitoneal mit 100µg ACA14C5 bzw. die Kontrollgruppe mit 100µg Mäuse-IgG immunisiert. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt keine Immunisierung. Die Tumorgröße wurde täglich festgehalten. Ziel des Versuches war, die Wirksamkeit des Anti-Idiotypen-Antikörpers (Ab2) auf das Tumorwachstum im Tiermodell im Vergleich zur „Immunisierung“ mit neutralem Mäuse-IgG zu untersuchen. Mit 71.4 % der Versuchstiere in deutlicher Remission oder tumorfreiem Zustand gegenüber 29 % in der Mäuse-IgG-Gruppe und 25 % in der Kontrollgruppe am Versuchsende kann eine signifikante Wirkung des anti-idiotypischen Antikörpers dargestellt werden. Der positive Effekt einer unspezifischen Immunaktivierung ist ebenfalls deutlich zu erkennen.

Im PI-Versuch gab es drei Gruppen, die am 29. Lebenstag 5 Mio, 10 Mio oder 25 Mio Tumorzellen injiziert bekamen. Sie wurden 14 Tage vor Tumorimplantation zum ersten Mal mit 100µg ACA14C5 i.p. immunisiert. Die Kontrollgruppe erhielt wieder 100µg Mäuse IgG. Dieser Versuch sollte zeigen, wie groß der Einfluss einer Immunisierung vor Implantation auf das Tumorwachstum bei unterschiedlich großen Tumorimplantationsmengen ist. Bei der geringsten Tumorkonzentration fand kein Wachstum statt, die mittlere Konzentration war am Ende tumorfrei, nur die Tiere mit der hohen Konzentration wiesen bis zum Schluss deutliches Wachstum auf. Die Kontrollgruppen verhielten sich genau entgegengesetzt. Je geringer die Konzentration, desto besser das Wachstum. Bei gezielter Präventivimmunisierung, also Impfung, sind kleine Tumormengen gut beherrschbar. Das weist einen möglichen Weg zur Immunisierung von Hochrisikopatientinnen schon vor Auftreten des Primärtumors. Die Kontrollgruppe zeigt aber immer noch den Nutzen einer unspezifischen Immunaktivierung bei größeren Tumormassen

7 Abkürzungsverzeichnis

ACA14C5	Anti-Idiotypen-14C5-Antikörper
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
Ak1	Idiotypen-Antikörper
Ak2	Anti-Idiotypen-Antikörper
Ak3	Anti-Anti-Idiotypen-Antikörper
CDC	complement-dependent cytotoxicity komplementvermittelte Zytotoxizität
CDIS	Carcinoma ductale in situ
CDR	complementarity determining regions = Komplementaritätsdeterminanten
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)anthracen
ECM	Extrazelluläre Matrix
HAMA	humane Anti-Maus-Antikörper
IDC	invasives duktales Karzinom
ILC	invasives lobuläres Karzinom
i.p.	intraperitoneal
MAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major-histocompatibility-complex = Haupt- Histokompatibilitätskomplex
PBL	peripheral blood lymphocytes = periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PHF	pretreated chicken heart fragments = vorbehandelte Hühnerherzfragmente
RAMA	Ratten-Anti-Maus-Antikörper
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Cell-Receptor = T-Zell-Rezeptor
VAH	schwere Kette der variablen Region
VAL	leichte Kette der variablen Region

8 Literaturverzeichnis

Albeda SM. Biology of disease: Rote of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68: 4-17

Albeda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; 50: 675 7-6764

Asplund T, Heldin P. Hyaluronan receptors are expressed on human malignant mesothelioma cells but not on normal mesothelial cells. *Cancer Res* 1994; 54: 4516-4523

Auquier A, Rutquist LE, Host H, Rotstein S, Arriagada R. Postmastectomy megavoltage radiotherapy: the Oslo and Stockholm trials. *Eur J Cancer* 1992; 28: 433-437

AWMF-Registernummer 032/045, Version Juni 2004, Nationale, interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau <http://leitlinien.net>

Bässer R, Böcker W, Hermanek P, Pickartz H, Schauer A, Schnurch HG, Stegner HE. Die gegenwärtige Situation des Gradings beim Mammakarzinom. *Pathologe* 1992; 13:130-134

Bässer R, Mamma. In Remmelew, Hrsg.. *Pathologie Bd. 4 2te, neu bearb. Aufl.* Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag 1997

Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 1983, 49: 140-147

Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68: 1331

Bastert G, Costa SD, Schmid H. Mammakarzinom. In: Dudenhausen JW, Schneider HPG, Hrsg.. Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Berlin - New York: Walter de Gruyter, 1994: 492-505

Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Mar; 58(3): 317-24. Epub 2008 Aug15.

Beatty JD. Immunotherapy of Colorectal Cancer. *Cancer (Suppl.)* 1992; 70: 1425-1433
 Bender H, Grapow M, Schomburg A, Reinhold U, Biersack HJ. Effects of Diagnostic Application of Monoclonal Antibody on Survival in Melanoma Patients. *Hybridoma* 1997; 16: 65-68

Beverly P. Tumorimmunologie. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK, Hrsg.. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart .New York: Thieme, 1995: 246-257

Bhattacharya-Chatterjee M, Foon KA, Köhler H. Idiotypic antibody immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38: 75-82

Biesterfeld S. Methodische Aspekte bei der standardisierten Beurteilung der mitotischen Aktivität von Tumorgeweben. *Pathologe* 1997; 18: 439-444

Cerny J, Hiernaux J. Concept of Idiotypic Network: Description and Functions. In: Cerny J, Hiernaux J, eds.. Idiotypic Network and Diseases. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990:13-29

Chakraborty M, Mukerjee S, Foon KA, Köhler H, Ceriani RL, Bhattacharya-Chatterjee M. Induction of Human Breast Cancer-specific Antibody Responses in Gynomolgus Monkeys by a Murine Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody. *Cancer Res* 1995; 55: 1525-1530

Chatterjee M, Foon KA, Köhler H, Idiotypic antibody immunotherapy of cancer *Cancer immunol Immunother* 1994, 38(2): 75-82

- Chan BMC, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 1991; 251: 1600-1602
- Coutinho A. The network theory: 21 years later. *Scand J Immunol* 1995; 42: 3-8
- Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 1992; 116: 1055-1062
- Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* 1994; 160: 275-286
- Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S.: Trastuzumab in the adjuvant early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008 Jun; 13(6): 620-30
- De Jager R, Guinan P, Lamm D, et al.: Long-term complete remission in bladder carcinoma in situ with intravesical TICE bacillus Calmette Guerin. Overview analysis of six phase II clinical trials. *Urology*. 1991 Dec;38(6):507-13
- De Potter CR, Schelfhout AM, De Smet FH, Van Damme S, De Ridder L, Dhont E, Van Emmelo J. A Monoclonal Antibody Directed Against a Human Cell Membrane Antigen Prevents Cell Substrate Adhesion and Tumor Invasion. *Am J Pathol* 1994; 144: 95-103
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Hrsg., Therapie-Leitlinien der Internistischen Onkologie: Solide Tumoren. 1. Aufl.. München: Zuckerschwerdt, 1996
- Dykes PW, Bradwell AR, Chapman CE, Vaughn ATM. Radioimmunotherapy of cancer; clinical studies and limiting factors. *Cancer Treat Rev* 1987; 14: 87-106 Fleming 5.
- Cellular functions of adhesion molecules. *J Pathol* 1990; 161: 189-190

Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. 133 randomised trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15

Eiermann, W. New antibody for breast cancer therapy. Interview by Brigitte Schalhorn *Fortschr. Med.* 116 (1998): 18-19

Elston CW, Ellis IO, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410

Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am.* 275:150 –154, 1996.

Foon KA, Chakraborty M, John WJ, Sherratt A, Köhler H, Bhattacharya-Chatterjee M. Immune Response to the Carcinoembryonic Antigen in Patient Treated with an Anti-Idiotypic Antibody Vaccine. *J Clin Invest* 1995; 96: 334-342

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113: 173-185

Gause A, Pfreundschuh M, Diehl V. Mammakarzinom. In: Clasen M, Diehl V, Kochsiek K, Hrsg.. *Innere Medizin.* München - Wien - Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1994: 151-154

Goldhirsch A, Wood WC, Senn HJ, Glick JH, Gelber RD,. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 97:1441-1445

Gray BN, Walker C, Andrewartha L, Freeman S, Bennett RC. Controlled clinical trial of adjuvant immunotherapy with BCG and.auraminidase-treated autologous tumor cells in large bowel cancer. *J Surg Oncol* 1989; 40: 34-37

Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Gell* 1991; 65: 13-24

Hanna MG Jr, Hoover HC Jr, Peters LC, et al.. Fundamental applied aspects of successful active specific immunotherapy of cancer. In: Oldham RK, cd.. Principles of cancer biotherapy. New York: Raven, 1987: 195-221

Herlyn D, Somasundaram R, Zaloudik J, Jacob L, Harris D, Kieny MP, Sears H, Mastrangelo M. Anti-Idiotypic and Recombinant Antigen in Immunotherapy of Colorectal Cancer. *Cell Biophysics* 1994; 24/25: 143-153

Herlyn D, Somasundaram R, Li W, Maruyama H. Anti-idiotypic cancer vaccines: past and future. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 65-76

Huland, H. Friedrich, M.: Harnblasenkarzinom in Hautmann, R. Huland, H.: Urologie, 3. Auflage, Heidelberg 2006, S. 202-212

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 1. Aktualisierung 2008

Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995: 23-27; 557-562

Janni W, et al.: Zertifizierte medizinische Fortbildung: Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2005; 102(41): A-2795 / B-2360 / C-2226

Jefferis R. What is an idiotypic?. *Immunol Today* 1993; 14: 119-121

Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 1974; 125 C: 373-389

Kazatchkine MD, Coutinho A. Are lymphocytes concerned with our definition of idiotypic?. *Immunol Today* 1993; 14: 5 13-515

Konecny G, Bischoff J, Eiermann W, Funke I, Gabius S, Gutschow K, Jänicke F, Kuhn W, Salat C, Sattler D, Sauer H, Untch M. Adjuvante Hormon- und Chemotherapie. In: Tumorzentrum München, Hrsg.. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Mammakarzinome. München: TZM-München, 1998: 71-80

Kühn T, et al.: Sentinel-Node-Biopsie beim Mammakarzinom. Geburtsh. Frauenheilk. 2003 (63):835-40

Kuhn W, Eiermann W, Gabius S, Herbeck N, Konecny G, Lutz L, Raab G, Rauthe G, Salat C, Sattler D, Sauer H, Schünemann H, Tigges FJ, Untch M. Systematische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. In: Tumorzentrum München, Hrsg.. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Mammakarzinome. München: TZM-München, 1998 143-156

Larochelle M, Fortin A, Lavadiere J. Local failure could be responsible for decrease in survival for patients with breast cancers treated by conservativ surgery and post-operativ radiotherapy. Int J Radiat Oncol Bio Phys 1997; 39:257

Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W, Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In Tumorzentrum München, Hrsg.. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Mammakarzinome. München: TZM-München, 1998: 11-24

Lindner H, Bayerl A, Sommer H, von Rottkay P. Strahlentherapie. In: Tumorzentrum München, Hrsg.. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Mammakarzinome. München: TZM-München, 1998 65-70

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumorinvasion and the extracellular matrix. Lab Invest 1983; 49: 636-649

McGregor BC, McGregor JL, Weiss LM, Wood GS, Hu CH, Boukerche H, Warnke RA. Presence of cytoadhesins (IIb-IIIa-like glycoproteins) on human metastatic melanomas but not on benign melanocytes. Am J Clin Pathol 1989; 92: 495-499

Mellstedt H, Frödin JE, Masucci G, et al.. Monoclonal antibodies (MAB 17-1A) for the treatment of patients with metastatic colorectal carcinomas. Acta Chir Scand Suppl 1989; 549: 63-70

Mittelman A, Chen ZJ, Yang H, Wong GY, Ferrone S. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: Induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 466-470

Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 1991; 115: 517-533

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, et al. (2001). The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol*. 22(6): 348-366.

Pervin S, Chakraborty M, Bhattacharya-Chatterjee M, Zeytin H, Foon KA, Chatterjee SK. Induction of Antitumor Immunity by an Anti-Idiotypic Antibody Mimicking Carcinoembryonic Antigen. *Cancer Res* 1997; 57: 728-734

Peters JH, Baumgarten H. *Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 1990

Pfisterer J, du Bois A, Sehouli J. et al. (2006). The anti-idiotypic antibody abagovomab in patients with recurrent ovarian cancer. A phase I trial of the AGO-OVAR. *Ann. Oncol.* 17(10): 1568-1577.

Pollock BA, Kearney JF. Identification and Characterization of an Apparent Germline Set of Auto-Anti-Idiotypic Regulatory B Lymphocytes. *J. Immunol.* 132 (1984) S.114-121.

Possinger K. *Mammakarzinome. Diagnostik-Therapie-Nachsorge*. Schriftenreihe der medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik II, Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité, Humboldt Universität Berlin 1997

Reinartz S, Köhler S, Wagner U. et al. Vaccination of Patients with Advanced Ovarian Carcinoma with the Anti-Idiotypic ACA125. *Clinical Cancer Research* Vol. 10, (2004) 1580-1587,

Reinartz S, Wagner U. Immuntherapie in der gynäkologischen Onkologie; *Gynäkologie* 39 (2006) 158-164

Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ. Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: Riede UN, Schäfer HE, Hrsg.. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 1995: 344-392

Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G et al. and the German Cancer Aid 17-1A Study Group. Randomised Trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* 1994; 343: 1177-1183

Roitt IM. Idiotypische Netzwerke. In: Roitt IM. *Leitfaden der Immunologie*, 4. Auflage. Berlin: Blackwell-Wissenschaft, 1993: 164-170

Romestaing P, Lehingue Y, Carrie C. Role of a 10Gy boost in the conservativ treatment of early breast cancer: results of a randomized clinical trial in Lyon, France. *J Clin Onol.* 1997; 15: 963-968

Santos C, Chandler K, Zimmer S, Fisher PB, Gunthert U, Anderson KW. Detachment of transformed cells. Role of CD44 variants. *Cell Biophys* 1995; 26: 1-19

Schlebusch H, Wagner U, Grün U, Schultes B. A monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125 mimicking the tumor-associated antigen CA125 for immunotherapy of ovarian cancer. *Hybridoma* 1995; 14: 167-174

Schmolling J, Reinsberg J, Wagner U, Krebs D. Anti-TAG-72 Antibody B72.3 — Immunological and Clinical Effects in Ovarian Carcinoma. *Hybridoma* 1997; 16: 53-58

Schmolling J, Wagner U, Reinsberg J, Biersack HJ, Krebs D. Immunreaktionen und Überlebenszeiten von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen nach Applikation von 123-J-F(ab)'₂-Fragmenten des OC125 Mab. *Geb Fra* 1995; 55: 200-203

Schneck D, Butler F, Dugan W et al.. Phase 1 studies with a murine monoclonal antibody Vinca conjugate (KS 1/4-DAVLB) in patients with adenocarcinoma. *Antibody Immunoconjugation Radiopharmacol* 1989; 2: 93-100

Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 443-455

Senter P. Activation of prodrugs by antibody-enzyme conjugates: a new approach to cancer therapy. *FASEB J* 1990; 4: 188-193

Smorodinsky NI, Ghendler Y, Bakimer R, Chaitchuk S, Keydar I, Shoenfeld Y. Towards an idiotype vaccine against mammary tumors. Induction of an immune response to breast cancer-associated antigens by anti-idiotypic antibodies. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1713-1718

Steffen M, Scherdin U, Duvigneau C, Hölzel F. Glucocorticoid-induced alterations of morphology and growth of fibrosarcoma cells derived from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene rat mammary tumor. *Cancer Res* 1988; 48: 7212-7218

Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys* 1969; 134: 279-284

Sy MS, Gou YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* 1991; 174: 859-866

Sy MS, Guo YJ, Stanienkovic I. Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J Exp Med* 1992; 176: 623-627

Takahashi T, Yamaguchi T, Kitamura K, Suzuyama H, Honda M, Yokata T, Kotanagi H, Takahashi M, Hashimoto Y. Clinical application of monoclonal antibody-drug conjugates for immunotargeting chemotherapy of colorectal carcinoma. *Cancer* 1988; 61: 881-888

Tanis, Peter J.; Nieweg, Omgo E; Valdés Olmos, Renato A History of sentinel node and validation of technique, *Breast Cancer Res.* 2001; 3(2) 109-112

Thor A, Gorsten F, Ohuchi N, Szpak C, Johnston W, Schlom J. Tumor Associated Glycoprotein (TAG-72) in Ovarian Carcinomas defined by Monoclonal Antibody B72.3. *J Natl Cancer* 1986; 76: 3118-3124

Uemura H, Beniers AJMC, Okajima E, Debruyne FMJ, Oosterwijk E. Vaccination with anti-idiotypic antibodies mimicking a renal cell carcinoma-associated antigen induces tumor immunity. *Int J Cancer* 1994; 58: 555-561

Untch, M. et al: Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen *Dtsch Arztebl* 2006; 103(50): A-3406 / B-2961 / C-2841

Varela J, Coutinho A. Second generation immune networks. *Immunol Today* 1991; 12: 159-166

Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV: Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer.* 2007 Aug 8;7:153. Review. PMID 17686164

Wagner U. Antitumor antibodies for immunotherapy of ovarian carcinomas. *Hybridoma* 1993; 12: 521-528

Wagner U, Chronides A, Mallmann P, Reinsberg J, Schultes B, Cui H, Liu Q, Oehr P, Schlebusch H, Schmidt S, Biersack HJ, Krebs D. Induktion einer tumorspezifischen zellulären Immunität durch Idiotypen-Vakzination für das Ovarialkarzinom mit dem MAb 0C125. *TumorDiagnostik & Therapie* 1993a; 14: 125-131

Wagner U, Reinsberg J, Schmidt S, Richter H, Cui H, Mallmann P, Schmolling J, Krebs D. Immunologische Veränderungen nach Anti-Idiotypen-Antikörperbildung bei Patienten mit Ovarialkarzinom. *Ber Gyn Gebh* 1993b; 130: 674

Wagner U, Reinsberg J, Schmidt S, Mallmann P, Schmolling J, Schultes B, Richter H, Biersack HJ, Krebs D. Monoclonal antibodies and idiotypic network activation for ovarian carcinoma. *Cell Biophys* 1994a; 24-25: 23 7-242

Wagner U, Schlebusch H, Cui H, Krebs D. Eine Anti-IdiotypenVakzine zur Immuntherapie des Ovarialkarzinoms. *Arch Gyn Obst* 1994b; 255, Suppl. 1: 182

Wagner U, Köhler S, Reinartz S. Immunological Consolidation of Ovarian Carcinoma Recurrences with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody ACA125: Immune Responses and Survival in Palliative Treatment. *Clinical Cancer Research* Vol. 7, (2001) 1154-1162,

Wagner U. Anti-idiotypische Antikörper in der Immuntherapie des Ovarialkarzinoms. Habilitationsschrift zur Erlangung der venia legendi der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für das Lehrgebiet Gynäkologie und Geburtshilfe. Bonn: vorgelegt von Dr. Uwe Wagner wissenschaftlicher Assistent an der Frauenklinik der Universität, 1995

Wagner U, Schlebusch H, Köhler S, Schmolling J, Grün U, Krebs D. Immunological Responses to the Tumor-Associated Antigen CA 125 in Patients with Advanced Ovarian Cancer Induced by the Murine Monoclonal Anti-Idiotypic Vaccine ACA 125. *Hybridoma* 1997; 16: 33-40

Wettendorff M, Koprowski H, Herlyn D. Modulation of Antitumor Immunity by Anti-Idiotypic Antibodies. In: Cerny J, Hiernaux J, eds.. *Idiotypic Network and Diseases*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990: 203-229

Wittekind C, Riede UN. Brustdrüse. In: Riede UN, Schaefer HE, Hrsg.. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 1995: 950-961

Yin, B.W., Lloyd, K.O. (2001). Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J. Biol. Chem.* 276(29): 27371-27375.

Yin, B.W., Dnistrian, A., Lloyd, K.O. (2002). Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int. J. Cancer* 98(5): 737-740

Zhang L, Conejo-Garcia J.R, Katsaros D. et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 348(3): 203-213.

9 Summary/Abstract

Immunological approaches using monoclonal antibodies in oncological treatment have been emerging during the last decades. In some fields antibodies yet implemented in standard therapy regiments. Our strategy follows the immunological-net-work-theory of Niels Jerne using an anti-idiotypic-antibody (Ab2) for active tumour vaccination. According to Niels Jernes theory the variable antigen-binding region of Ab2 represents the internal image of the tumour related antigen. An immunized organism creates anti-anti-idiotypic-antibodies (Ab3) witch cross-react with the original tumour-related-antigen. Immunisation with the Ab2 results in a specific immune reaction against the tumour.

Worldwide, breast cancer is by far the most common cancer amongst women, with an incidence rate of 100/100000. In 2005, breast cancer caused 502,000 deaths worldwide. Mean age is 57 years. A single cause for developing a breast cancer is unknown, but until now individual, genetic and epidemiological risk factors are proven.

Many of metastatic active breast cancers express a specific membrane polypeptide antigen described by De Potter et al. 1994 and Coene et al. 1997 as CA 14C5. This antigen is a polypeptide-adhesions-molecule of ductal carcinoma cells which seems to be involved in tumour invasions and adhesion. We created an anti-idiotypic-antibody ACA 14C5 mimickig the CA 14C5 and proved immunotherapeutic properties of this new Ab2 in 2 experimental settings in an established animal model with Balb/c mice. In the tumour last challenge (TLC) setting tumour implanted mice where immunized every week with 100µg ACA 14C5. The control-group according with 100µg mouse immunoglobuline (IgG). A second control-group received no treatment. 71,4 % of the antiidiotypic treated animals showed whether tumour remission or complete remission in comparison with immunisation with mouse-IgG or no therapy.

In the prophylactic immunisation (PI) setting we showed that a immunisation before tumour implementation has a strong influence on tumour growth, according to the amount of tumour cells implanted. 14 days after immunisation with 100µg ACA 14C5 animals received tumour cells in three subgroups. 5, 10, and 25 million HH-16cl.2/1 fibrosarcoma cells where implanted. The lower the tumour-cell concentrations the better the in animal response. No tumour growth was observed in immunized animals which received 5 Mio. tumour cells. Immunisation with the anti-idiotypic-antibody ACA 14C5 represents a feasible approach in oncological treatment of breast cancer in an animal model. Still much more work has to be done to prove possible benefit in humans.

10 Verzeichnis akademischer Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren

in Bonn: Cochet, Gansz, Güldenzoph, Göke, Inglen, Kaiser, Keller, Kelter, Kessler, Krebs, Pütz, Richter, Schacher, Seuser, Tönnismann, Wagner, Wöstmann

in Bern: Büchler, Flückiger, Gorschewsky, Herren, Kohler, Riecherts, Steinhauer, Vogel, Wyder

11 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Uwe Wagner möchte ich ganz herzlich für die Überlassung dieses innovativen Dissertationsthemas und seine Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse danken.

Ich möchte auch Sonja Schmitz und Dr. med. Patrick Giffels für ihre Mitarbeit und Hilfe bei der Versuchsdurchführung danken.

Ganz herzlicher Dank geht an alle, die nach meinem Unfall an mich geglaubt und mich unterstützt haben und mir somit eine Rückkehr ins normale Leben ermöglicht haben.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern und meiner Verlobten für die Kraft, Toleranz und Unterstützung, die sie mir entgegen brachten.

Ein großes Dankeschön soll auch Professor Dr. med. Ueli Büchler und Dr. med. Gerhard Flückiger zuteil werden, die erst die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Rückkehr geschaffen haben. Mein besonderer Dank geht hier an Petra Hardtke, ohne deren kompetente Reha-Unterstützung und Begleitung ich nicht so weit gekommen wäre.

Die Rückkehr ins berufliche Leben wurde von Dr. med. Martina Kessler ermöglicht und gefördert, herzlichen Dank dafür. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. med.

Siegfried Köhler, der mich bei der Aktualisierung meiner Arbeit unterstützte und bei Fragen stets ansprechbar war.

12 Anhang

12.1 Versuch I TLC:

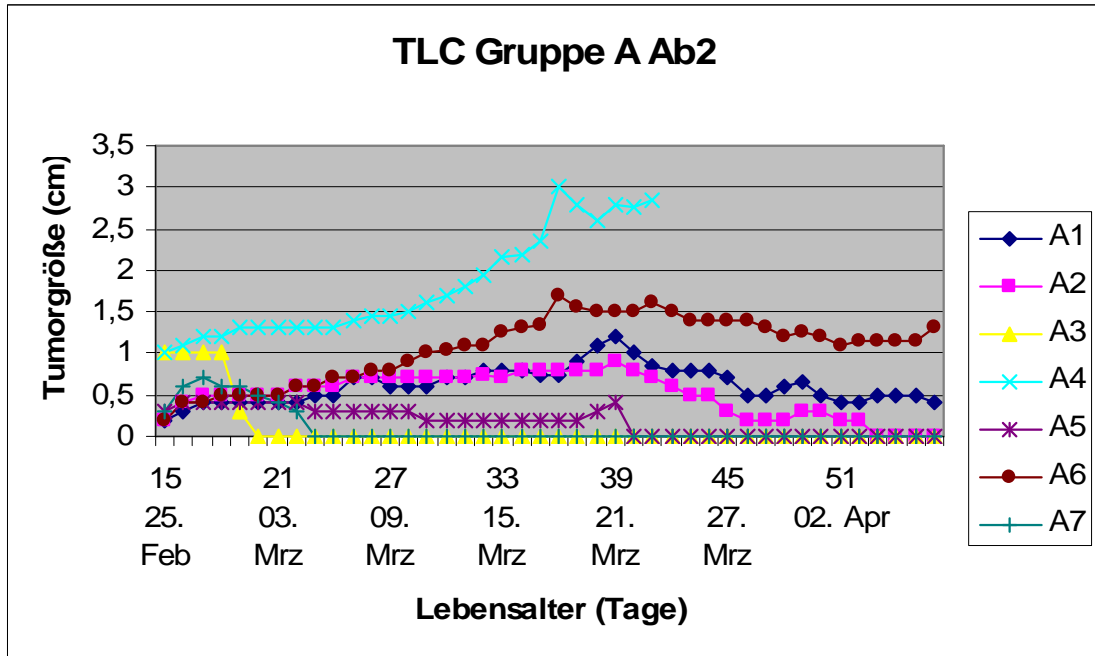


Abbildung 22 Tumorgröße der Einzeltiere aus Gruppe A des TLC Versuchs

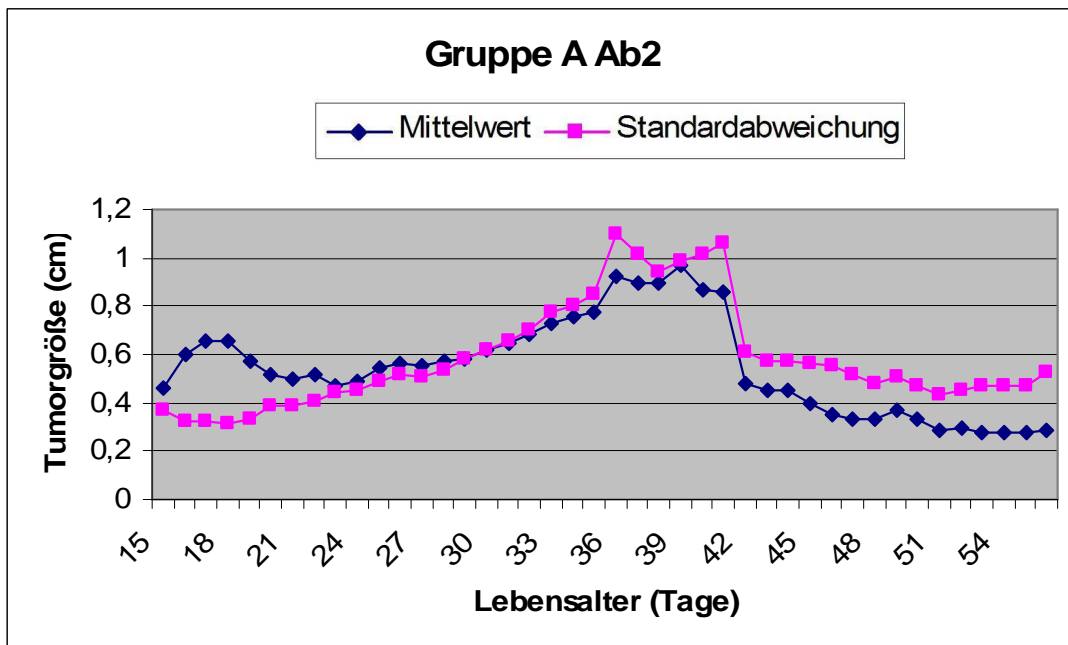


Abbildung 23: Mittelwertentwicklung bei Gruppe A

Tabelle 8: Tumorwachstum der Einzeltiere in cm von Gruppe A, immunisiert mit Ab2 am 25.2; 4./11./18/25.3; und 1.04

	Lebens tag	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
25. Feb	15	0,2	0,2	1	1	0,3	0,2	0,3
26. Feb	16	0,3	0,4	1	1,1	0,4	0,4	0,6
27. Feb	17	0,4	0,5	1	1,2	0,4	0,4	0,7
28. Feb	18	0,4	0,5	1	1,2	0,4	0,5	0,6
01. Mrz	19	0,4	0,5	0,3	1,3	0,4	0,5	0,6
02. Mrz	20	0,4	0,5	0	1,3	0,4	0,5	0,5
03. Mrz	21	0,4	0,5	0	1,3	0,4	0,5	0,4
04. Mrz	22	0,4	0,6	0	1,3	0,4	0,6	0,3
05. Mrz	23	0,5	0,6	0	1,3	0,3	0,6	0
06. Mrz	24	0,5	0,6	0	1,3	0,3	0,7	0
07. Mrz	25	0,7	0,7	0	1,4	0,3	0,7	0
08. Mrz	26	0,7	0,7	0	1,45	0,3	0,8	0
09. Mrz	27	0,6	0,7	0	1,45	0,3	0,8	0
10. Mrz	28	0,6	0,7	0	1,5	0,3	0,9	0
11. Mrz	29	0,6	0,7	0	1,6	0,2	1	0
12. Mrz	30	0,7	0,7	0	1,7	0,2	1,05	0
13. Mrz	31	0,7	0,7	0	1,8	0,2	1,1	0
14. Mrz	32	0,8	0,75	0	1,95	0,2	1,1	0
15. Mrz	33	0,8	0,7	0	2,15	0,2	1,25	0
16. Mrz	34	0,8	0,8	0	2,2	0,2	1,3	0
17. Mrz	35	0,75	0,8	0	2,35	0,2	1,35	0
18. Mrz	36	0,75	0,8	0	3	0,2	1,7	0
19. Mrz	37	0,9	0,8	0	2,8	0,2	1,55	0
20. Mrz	38	1,1	0,8	0	2,6	0,3	1,5	0
21. Mrz	39	1,2	0,9	0	2,8	0,4	1,5	0
22. Mrz	40	1	0,8	0	2,75	0	1,5	0
23. Mrz	41	0,85	0,7	0	2,85	0	1,6	0
24. Mrz	42	0,8	0,6	0		0	1,5	0
25. Mrz	43	0,8	0,5	0		0	1,4	0
26. Mrz	44	0,8	0,5	0		0	1,4	0
27. Mrz	45	0,7	0,3	0		0	1,4	0
28. Mrz	46	0,5	0,2	0		0	1,4	0
29. Mrz	47	0,5	0,2	0		0	1,3	0
30. Mrz	48	0,6	0,2	0		0	1,2	0
31. Mrz	49	0,65	0,3	0		0	1,25	0
01. Apr	50	0,5	0,3	0		0	1,2	0
02. Apr	51	0,4	0,2	0		0	1,1	0
03. Apr	52	0,4	0,2	0		0	1,15	0
04. Apr	53	0,5	0	0		0	1,15	0
05. Apr	54	0,5	0	0		0	1,15	0
06. Apr	55	0,5	0	0		0	1,15	0
07. Apr	56	0,4	0	0		0	1,3	0

Tabelle 9: Durchschnittswerte von Gruppe A in cm

	Lebenstag	Mittelwert	Standard abweichung	Median	Interquartil abstand
25. Feb	15	0,46	0,3735	0,30	0,45
26. Feb	16	0,60	0,3215	0,40	0,40
27. Feb	17	0,66	0,3259	0,50	0,45
28. Feb	18	0,66	0,3155	0,50	0,35
01. Mrz	19	0,57	0,3352	0,50	0,15
02. Mrz	20	0,51	0,3891	0,50	0,10
03. Mrz	21	0,50	0,3916	0,40	0,10
04. Mrz	22	0,51	0,4018	0,40	0,25
05. Mrz	23	0,47	0,4461	0,50	0,45
06. Mrz	24	0,49	0,4525	0,50	0,50
07. Mrz	25	0,54	0,4928	0,70	0,55
08. Mrz	26	0,56	0,5137	0,70	0,60
09. Mrz	27	0,55	0,5107	0,60	0,60
10. Mrz	28	0,57	0,5345	0,60	0,65
11. Mrz	29	0,59	0,5843	0,60	0,75
12. Mrz	30	0,62	0,6204	0,70	0,78
13. Mrz	31	0,64	0,6554	0,70	0,80
14. Mrz	32	0,69	0,7028	0,75	0,85
15. Mrz	33	0,73	0,7788	0,70	0,93
16. Mrz	34	0,76	0,7997	0,80	0,95
17. Mrz	35	0,78	0,8509	0,75	0,98
18. Mrz	36	0,92	1,0946	0,75	1,15
19. Mrz	37	0,89	1,0126	0,80	1,13
20. Mrz	38	0,90	0,9381	0,80	1,15
21. Mrz	39	0,97	0,9912	0,90	1,15
22. Mrz	40	0,86	1,0185	0,80	1,25
23. Mrz	41	0,86	1,0608	0,70	1,23
24. Mrz	42	0,48	0,6080	0,30	0,75
25. Mrz	43	0,45	0,5718	0,25	0,73
26. Mrz	44	0,45	0,5718	0,25	0,73
27. Mrz	45	0,40	0,5621	0,15	0,60
28. Mrz	46	0,35	0,5505	0,10	0,43
29. Mrz	47	0,33	0,5125	0,10	0,43
30. Mrz	48	0,33	0,4844	0,10	0,50
31. Mrz	49	0,37	0,5037	0,15	0,56
01. Apr	50	0,33	0,4719	0,15	0,45
02. Apr	51	0,28	0,4309	0,10	0,35
03. Apr	52	0,29	0,4499	0,10	0,35
04. Apr	53	0,28	0,4730	0,00	0,38
05. Apr	54	0,28	0,4730	0,00	0,38
06. Apr	55	0,28	0,4730	0,00	0,38
07. Apr	56	0,28	0,5231	0,00	0,30

Tabelle 10: Tumorwachstum der Einzeltiere in cm von Gruppe B, immunisiert mit Mäuse IgG am 25.2; 4./11./18/25.3; und 1.4

	Lebenstag	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
25. Feb	15	0	0,3	0,3	0	0,8	0,3	0,3
26. Feb	16	0	0,6	0,9	0,4	0,8	0,4	0,8
27. Feb	17	0	0,8	0,6	1,1	0,9	0,5	0,7
28. Feb	18	0	0,8	0,6	0,8	1	0,7	0,6
01. Mrz	19	0	0,8	0,8	0,9	1	0,7	0,8
02. Mrz	20	0	0,8	0,8	0,9	1,1	0,7	0,8
03. Mrz	21	0	0,8	0,8	0,9	1,1	0,6	0,8
04. Mrz	22	0	0,8	0,9	1	1,2	0,6	0,9
05. Mrz	23	0	0,9	0,9	1	1,2	0,6	0,9
06. Mrz	24	0	0,9	0,9	1	1,2	0,6	0,9
07. Mrz	25	0	1,1	0,9	1	1,3	0,5	0,9
08. Mrz	26	0	1,15	1	1	1,3	0,4	0,9
09. Mrz	27	0	1,25	1,15	1	1,3	0,3	0,9
10. Mrz	28	0	1,35	1,15	1,1	1,35	0,3	0,9
11. Mrz	29	0	1,45	1,15	1,2	1,4	0,3	1
12. Mrz	30	0	1,6	1,2	1,25	1,4	0,2	1
13. Mrz	31	0	1,75	1,3	1,25	1,45	0,2	1
14. Mrz	32	0	1,9	1,45	1,35	1,45	0	1
15. Mrz	33	0	2	1,35	1,4	1,5	0	1,05
16. Mrz	34	0	2,25	1,35	1,4	1,55	0	1,05
17. Mrz	35	0	2,3	1,35	1,45	1,45	0	1,1
18. Mrz	36	0,3	3	1,6	1,6	1,6	0	1,5
19. Mrz	37	0,3	3	1,7	1,6	1,6	0	1,5
20. Mrz	38	0,3	3,1	1,8	1,6	1,7	0	1,7
21. Mrz	39	0,3	3,3	1,9	1,6	1,7	0	1,7
22. Mrz	40	0,3	3,25	1,7	1,8	1,55	0	1,5
23. Mrz	41	0,3	3,4	1,5	1,8	1,45	0	1,25
24. Mrz	42	0,3	3,3	1,3	1	1,45	0	1,2
25. Mrz	43	0,4	3,35	1,3	1,8	1,5	0	1,25
26. Mrz	44	0,4	3,2	1,4	0,9	1,5	0	1,2
27. Mrz	45	0,3	3,25	1,35	1,9	1,4	0	1,1
28. Mrz	46	0,3	3	1,3	1,9	1,3	0	1,15
29. Mrz	47	0,3	3,05	1,2	2,1	1,2	0	1,15
30. Mrz	48	0,3	3	1,35	1,8	1,2	0	1,15
31. Mrz	49	0,3	3	1,25	1,85	1,2	0	1,15
01. Apr	50	0,3	2,95	1,15	1,9	1,2	0	1,2
02. Apr	51	0,3	3	1,2	1,9	1,2	0	1,2
03. Apr	52	0,3	2,9	1,3	1,95	0,9	0	1,15
04. Apr	53	0,3	2,8	1	1,85	1,2	0	1
05. Apr	54	0,3	2,8	1	1,9	1,2	0	0,9
06. Apr	55	0,3	2,75	1	1,95	1,1	0	0,8
07. Apr	56	0,5	2,7	1	1,8	0,7	0	0,9

Tabelle 11: Durchschnittswerte von Gruppe B in cm

	Lebenstag	Mittelwert	Standard abweichung	Median	Interquartil abstand
25. Feb	15	0,29	0,2673	0,30	0,15
26. Feb	16	0,56	0,3155	0,60	0,40
27. Feb	17	0,66	0,3505	0,70	0,30
28. Feb	18	0,64	0,3155	0,70	0,20
01. Mrz	19	0,71	0,3288	0,80	0,10
02. Mrz	20	0,73	0,3450	0,80	0,10
03. Mrz	21	0,71	0,3485	0,80	0,15
04. Mrz	22	0,77	0,3861	0,90	0,25
05. Mrz	23	0,79	0,3891	0,90	0,20
06. Mrz	24	0,79	0,3891	0,90	0,20
07. Mrz	25	0,81	0,4337	0,90	0,35
08. Mrz	26	0,82	0,4581	1,00	0,43
09. Mrz	27	0,84	0,5004	1,00	0,60
10. Mrz	28	0,88	0,5282	1,10	0,65
11. Mrz	29	0,93	0,5597	1,15	0,65
12. Mrz	30	0,95	0,6117	1,20	0,73
13. Mrz	31	0,99	0,6528	1,25	0,78
14. Mrz	32	1,02	0,7455	1,35	0,95
15. Mrz	33	1,04	0,7662	1,35	0,93
16. Mrz	34	1,09	0,8265	1,35	0,95
17. Mrz	35	1,09	0,8334	1,35	0,90
18. Mrz	36	1,37	0,9878	1,60	0,70
19. Mrz	37	1,39	0,9924	1,60	0,75
20. Mrz	38	1,46	1,0342	1,70	0,80
21. Mrz	39	1,70	1,0488	1,70	0,23
22. Mrz	40	1,44	1,0694	1,55	0,85
23. Mrz	41	1,39	1,1078	1,45	0,88
24. Mrz	42	1,22	1,0622	1,20	0,73
25. Mrz	43	1,37	1,0770	1,30	0,83
26. Mrz	44	1,23	1,0242	1,20	0,80
27. Mrz	45	1,33	1,0723	1,35	0,95
28. Mrz	46	1,28	0,9966	1,30	0,88
29. Mrz	47	1,29	1,0355	1,20	0,93
30. Mrz	48	1,26	0,9876	1,20	0,85
31. Mrz	49	1,25	0,9916	1,20	0,83
01. Apr	50	1,24	0,9825	1,20	0,83
02. Apr	51	1,26	0,9964	1,20	0,80
03. Apr	52	1,21	0,9835	1,15	1,03
04. Apr	53	1,16	0,9402	1,00	0,88
05. Apr	54	1,16	0,9502	1,00	0,95
06. Apr	55	1,13	0,9477	1,00	0,98
07. Apr	56	1,09	0,8971	0,90	0,80

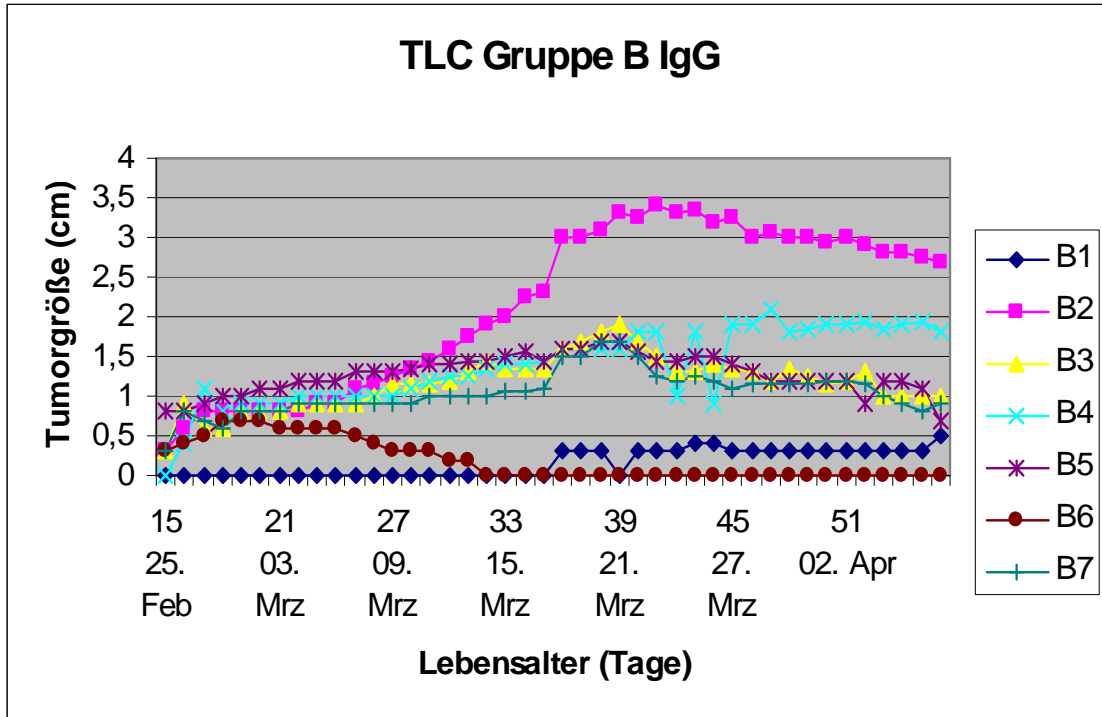


Abbildung 24 Tumorgröße der Einzeltiere aus Gruppe B des TLC Versuchs

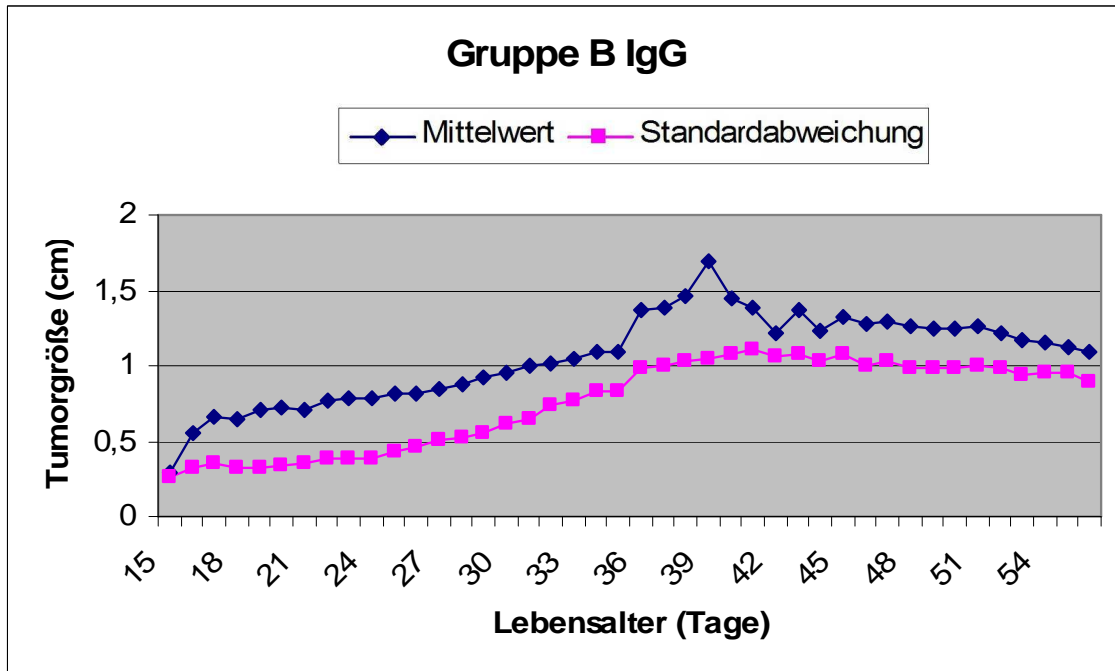


Abbildung 25: Mittelwertentwicklung bei Gruppe B

Tabelle 12: Tumorwachstum der Einzeltiere in cm von Gruppe C, immunisiert mit Mäuse IgG am 25.2; 4./11./18/25.3; und 1.4 Tiere C1 und C3 starben während des Beobachtungszeitraums

	Lebenstag	C1	C2	C3	C4
25. Feb	15	0,3	0,6	0,3	0,2
26. Feb	16	0,3	0,7	0,3	0,3
27. Feb	17	0,5	0,9	0,4	0,4
28. Feb	18	0,5	1	0,4	0,5
01. Mrz	19	0,6	1,1	0,5	0,7
02. Mrz	20	0,7	1,1	0,5	0,7
03. Mrz	21	0,8	1,1	0,6	0,8
04. Mrz	22	0,9	1,2	0,6	0,9
05. Mrz	23	1	1,3	0,7	0,9
06. Mrz	24	1	1,4	0,7	1
07. Mrz	25	1	1,45	0,7	1,15
08. Mrz	26	1,05	1,45	0,65	1,2
09. Mrz	27	1,1	1,55	0,55	1,25
10. Mrz	28	1,1	1,55	0,3	1,4
11. Mrz	29	1,1	1,6		1,6
12. Mrz	30	1,1	1,6		1,4
13. Mrz	31	1,1	1,65		1,55
14. Mrz	32	1,1	1,65		1,6
15. Mrz	33	1,1	1,7		1,6
16. Mrz	34	0,9	1,65		1,5
17. Mrz	35	1,1	1,75		1,5
18. Mrz	36	1,1	2		1,6
19. Mrz	37	1,1	2		1,5
20. Mrz	38	1	2,3		1,6
21. Mrz	39	1,1	2,3		1,7
22. Mrz	40	1,05	2		1,5
23. Mrz	41	1,05	1,9		1,35
24. Mrz	42	0,9	1,95		1,15
25. Mrz	43	0,75	1,75		1,1
26. Mrz	44	0,7	1,8		1,1
27. Mrz	45		2		1
28. Mrz	46		1,8		1
29. Mrz	47		1,9		0,95
30. Mrz	48		2		0,8
31. Mrz	49		2,2		0,8
01. Apr	50		2,15		0,75
02. Apr	51		2,2		0,8
03. Apr	52		2,25		0,8
04. Apr	53		2,2		0,8
05. Apr	54		2,2		0,8
06. Apr	55		2,3		0,7

Tabelle 13: Durchschnittswerte von Gruppe C in cm

	Lebenstag	Mittelwert	Standard abweichung	Median	Interquartil sabstand
25. Feb	15	0,35	0,1732	0,30	0,10
26. Feb	16	0,40	0,2000	0,30	0,10
27. Feb	17	0,55	0,2380	0,45	0,20
28. Feb	18	0,60	0,2708	0,50	0,15
01. Mrz	19	0,73	0,2630	0,65	0,23
02. Mrz	20	0,75	0,2517	0,70	0,15
03. Mrz	21	0,83	0,2062	0,80	0,13
04. Mrz	22	0,90	0,2449	0,90	0,15
05. Mrz	23	0,98	0,2500	0,95	0,23
06. Mrz	24	1,03	0,2872	1,00	0,18
07. Mrz	25	1,08	0,3122	1,08	0,30
08. Mrz	26	1,09	0,3351	1,13	0,31
09. Mrz	27	1,11	0,4191	1,18	0,36
10. Mrz	28	1,09	0,5573	1,25	0,54
11. Mrz	29	1,43	0,2887	1,60	0,25
12. Mrz	30	1,37	0,2517	1,40	0,25
13. Mrz	31	1,43	0,2930	1,55	0,28
14. Mrz	32	1,45	0,3041	1,60	0,28
15. Mrz	33	1,47	0,3215	1,60	0,30
16. Mrz	34	1,35	0,3969	1,50	0,38
17. Mrz	35	1,45	0,3279	1,50	0,33
18. Mrz	36	1,57	0,4509	1,60	0,45
19. Mrz	37	1,53	0,4509	1,50	0,45
20. Mrz	38	1,63	0,6506	1,60	0,65
21. Mrz	39	1,70	0,6000	1,70	0,60
22. Mrz	40	1,52	0,4752	1,50	0,48
23. Mrz	41	1,43	0,4311	1,35	0,43
24. Mrz	42	1,33	0,5485	1,15	0,53
25. Mrz	43	1,20	0,5074	1,10	0,50
26. Mrz	44	1,20	0,5568	1,10	0,55
27. Mrz	45	1,50	0,7071	1,50	0,50
28. Mrz	46	1,40	0,5657	1,40	0,40
29. Mrz	47	1,43	0,6718	1,43	0,48
30. Mrz	48	1,40	0,8485	1,40	0,60
31. Mrz	49	1,50	0,9899	1,50	0,70
01. Apr	50	1,45	0,9899	1,45	0,70
02. Apr	51	1,50	0,9899	1,50	0,70
03. Apr	52	1,53	1,0253	1,53	0,73
04. Apr	53	1,50	0,9899	1,50	0,70
05. Apr	54	1,50	0,9899	1,50	0,70
06. Apr	55	1,50	1,1314	1,50	0,80

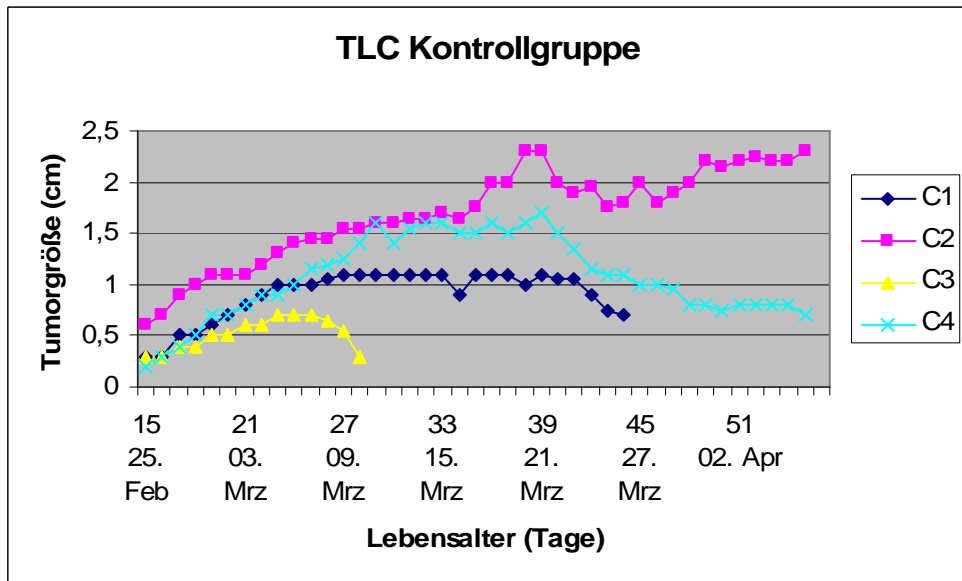


Abbildung 26: Tumorgroße der Einzeltiere aus Gruppe C des TLC Versuchs

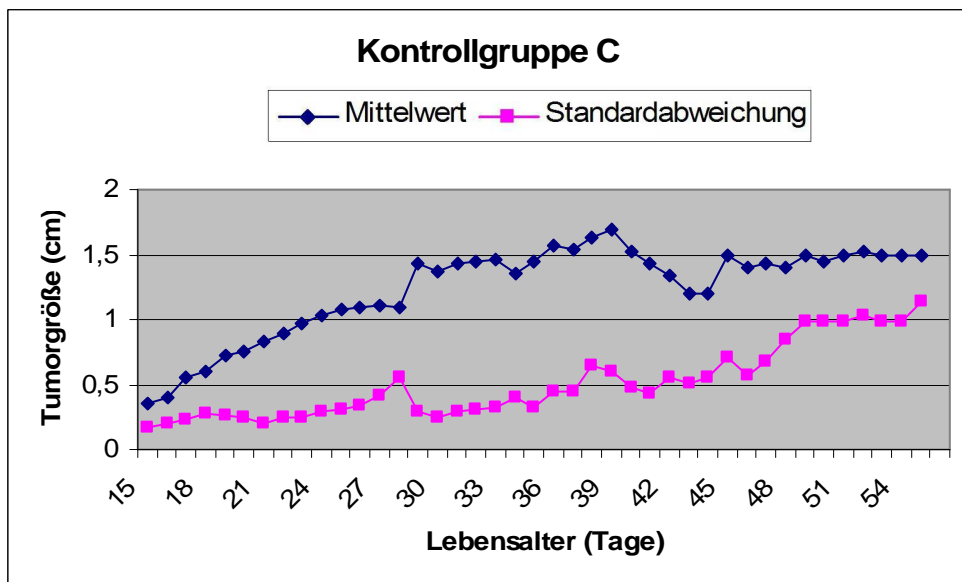


Abbildung 27: Mittelwertentwicklung bei Gruppe C

12.2 Versuch II PI

Tabelle 14: Tumorwachstum der Einzeltiere der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 5×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	5A1	5A2	5A3	5A4
22. Mrz	40	0	0	0	0
23. Mrz	41	0	0	0	0
24. Mrz	42	0	0	0	0
25. Mrz	43	0	0	0	0
26. Mrz	44	0	0	0	0
27. Mrz	45	0	0	0	0
28. Mrz	46	0	0	0	0
29. Mrz	47	0	0	0	0
30. Mrz	48	0	0	0	0
31. Mrz	49	0	0	0	0
01. Apr	50	0	0	0	0
02. Apr	51	0	0	0	0
03. Apr	52	0	0	0	0
04. Apr	53	0	0	0	0
05. Apr	54	0	0	0	0
06. Apr	55	0	0	0	0
07. Apr	57	0	0	0	0

Tabelle 15: Durchschnittswerte der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 5×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0	0	0	0
23. Mrz	41	0	0	0	0
24. Mrz	42	0	0	0	0
25. Mrz	43	0	0	0	0
26. Mrz	44	0	0	0	0
27. Mrz	45	0	0	0	0
28. Mrz	46	0	0	0	0
29. Mrz	47	0	0	0	0
30. Mrz	48	0	0	0	0
31. Mrz	49	0	0	0	0
01. Apr	50	0	0	0	0
02. Apr	51	0	0	0	0
03. Apr	52	0	0	0	0
04. Apr	53	0	0	0	0
05. Apr	54	0	0	0	0
06. Apr	55	0	0	0	0
07. Apr	57	0	0	0	0

Tabelle 16: Tumorwachstum de Einzeltiere der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 5×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	5B1	5B2	5B3	5B4
22. Mrz	40	0	1,25	0	0,1
23. Mrz	41	0,2	1,4	0	0,2
24. Mrz	42	0,1	1,4	0	0,2
25. Mrz	43	0,1	1,45	0	0,3
26. Mrz	44	0,1	1,55	0	0,5
27. Mrz	45	0,1	1,7	0	0,6
28. Mrz	46	0,1	1,6	0	0,6
29. Mrz	47	0,1	1,6	0	0,6
30. Mrz	48	0,1	1,4	0	0,5
31. Mrz	49	0,1	0,8	0	0,5
01. Apr	50	0,1	0,8	0	0,6
02. Apr	51	0,1	0	0	0,5
03. Apr	52	0,1	0	0	0,5
04. Apr	53	0,1	0	0	0,5
05. Apr	54	0,1	0	0	0,4
06. Apr	55	0,1	0,1	0	0,4
07. Apr	57	0,1	0	0	0,3

Tabelle 17: Durchschnittswerte der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 5×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0,34	0,6102	0,05	0,39
23. Mrz	41	0,45	0,6403	0,20	0,35
24. Mrz	42	0,43	0,6551	0,15	0,43
25. Mrz	43	0,46	0,6700	0,20	0,51
26. Mrz	44	0,54	0,7087	0,30	0,69
27. Mrz	45	0,60	0,7789	0,35	0,80
28. Mrz	46	0,58	0,7320	0,35	0,78
29. Mrz	47	0,58	0,7320	0,35	0,78
30. Mrz	48	0,50	0,6377	0,30	0,65
31. Mrz	49	0,35	0,3697	0,30	0,50
01. Apr	50	0,38	0,3862	0,35	0,58
02. Apr	51	0,15	0,2380	0,05	0,20
03. Apr	52	0,15	0,2380	0,05	0,20
04. Apr	53	0,15	0,2380	0,05	0,20
05. Apr	54	0,13	0,1893	0,05	0,18
06. Apr	55	0,15	0,1732	0,10	0,10
07. Apr	57	0,10	0,1414	0,05	0,15

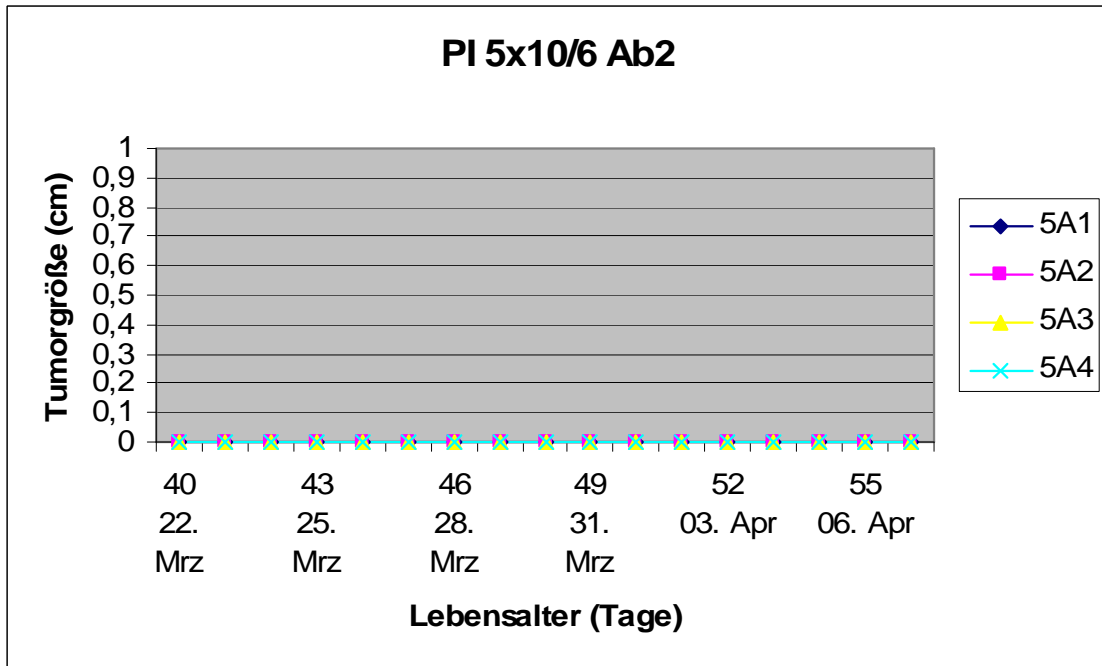


Abbildung 28 Tumorgröße der Einzeltiere der IgG Gruppe mit 5×10^6 Tumorzellen

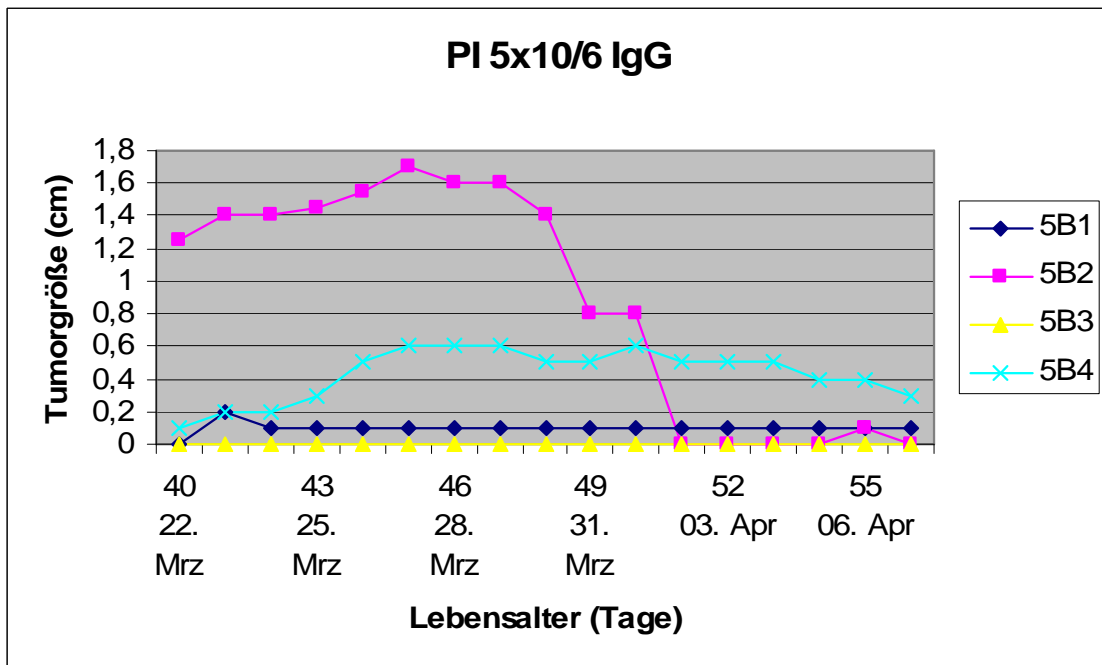


Abbildung 29 Tumorgröße der Einzeltiere der IgG Gruppe mit 5×10^6 Tumorzellen

Tabelle 19: Tumorwachstum der Einzeltiere der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 10×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	10A1	10A2	10A3	10A4
22. Mrz	40	0,2	0,2	0	0
23. Mrz	41	0,2	0,1	0	0,2
24. Mrz	42	0,2	0,2	0	0,2
25. Mrz	43	0,2	0,2	0	0
26. Mrz	44	0	0,1	0	0,1
27. Mrz	45	0	0,1	0	0,1
28. Mrz	46	0	0,1	0	0
29. Mrz	47	0	0,1	0	0,1
30. Mrz	48	0	0,2	0	0,1
31. Mrz	49	0	0,2	0	0,1
01. Apr	50	0	0	0	0,1
02. Apr	51	0	0	0	0
03. Apr	52	0	0	0	0
04. Apr	53	0	0	0	0
05. Apr	54	0	0	0	0
06. Apr	55	0	0	0	0
07. Apr	57	0	0	0	0

Tabelle 20: Durchschnittswerte der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 10×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0,10	0,1155	0,10	0,20
23. Mrz	41	0,13	0,0957	0,15	0,13
24. Mrz	42	0,15	0,1000	0,20	0,05
25. Mrz	43	0,10	0,1155	0,10	0,20
26. Mrz	44	0,05	0,0577	0,05	0,10
27. Mrz	45	0,05	0,0577	0,05	0,10
28. Mrz	46	0,03	0,0500	0,00	0,03
29. Mrz	47	0,05	0,0577	0,05	0,10
30. Mrz	48	0,08	0,0957	0,05	0,13
31. Mrz	49	0,08	0,0957	0,05	0,13
01. Apr	50	0,03	0,0500	0,00	0,03
02. Apr	51	0,00	0,0000	0,00	0,00
03. Apr	52	0,00	0,0000	0,00	0,00
04. Apr	53	0,00	0,0000	0,00	0,00
05. Apr	54	0,00	0,0000	0,00	0,00
06. Apr	55	0,00	0,0000	0,00	0,00
07. Apr	57	0,00	0,0000	0,00	0,00

Tabelle 21: Tumorwachstum der Einzeltiere der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 10×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	10B1	10B2	10B3	10B4
22. Mrz	40	0,2	0,1	1	0,1
23. Mrz	41	0,3	0,2	1,2	0,2
24. Mrz	42	0,3	0,2	1,25	0,2
25. Mrz	43	0,3	0,2	1,35	0,2
26. Mrz	44	0,4	0,1	1,35	0,1
27. Mrz	45	0,3	0,1	1,35	0,1
28. Mrz	46	0,3	0,1	1,3	0,1
29. Mrz	47	0,3	0,1	1,4	0
30. Mrz	48	0,3	0	1,45	0
31. Mrz	49	0,3	0	1,3	0
01. Apr	50	0,2	0	1,4	0
02. Apr	51	0,2	0	1,4	0
03. Apr	52	0,2	0	1,3	0
04. Apr	53	0,2	0	1,25	0
05. Apr	54	0,2	0	1,1	0
06. Apr	55	0,2	0	1	0
07. Apr	57	0,1	0	0,8	0

Tabelle 22: Durchschnittswerte der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 10×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0,35	0,4359	0,15	0,30
23. Mrz	41	0,48	0,4856	0,25	0,33
24. Mrz	42	0,49	0,5105	0,25	0,34
25. Mrz	43	0,51	0,5603	0,25	0,36
26. Mrz	44	0,49	0,5921	0,25	0,54
27. Mrz	45	0,46	0,5991	0,20	0,46
28. Mrz	46	0,45	0,5745	0,20	0,45
29. Mrz	47	0,45	0,6455	0,20	0,50
30. Mrz	48	0,44	0,6897	0,15	0,59
31. Mrz	49	0,40	0,6164	0,15	0,55
01. Apr	50	0,40	0,6733	0,10	0,50
02. Apr	51	0,40	0,6733	0,10	0,50
03. Apr	52	0,38	0,6238	0,10	0,48
04. Apr	53	0,36	0,5991	0,10	0,46
05. Apr	54	0,33	0,5252	0,10	0,43
06. Apr	55	0,30	0,4761	0,10	0,40
07. Apr	57	0,23	0,3862	0,05	0,28

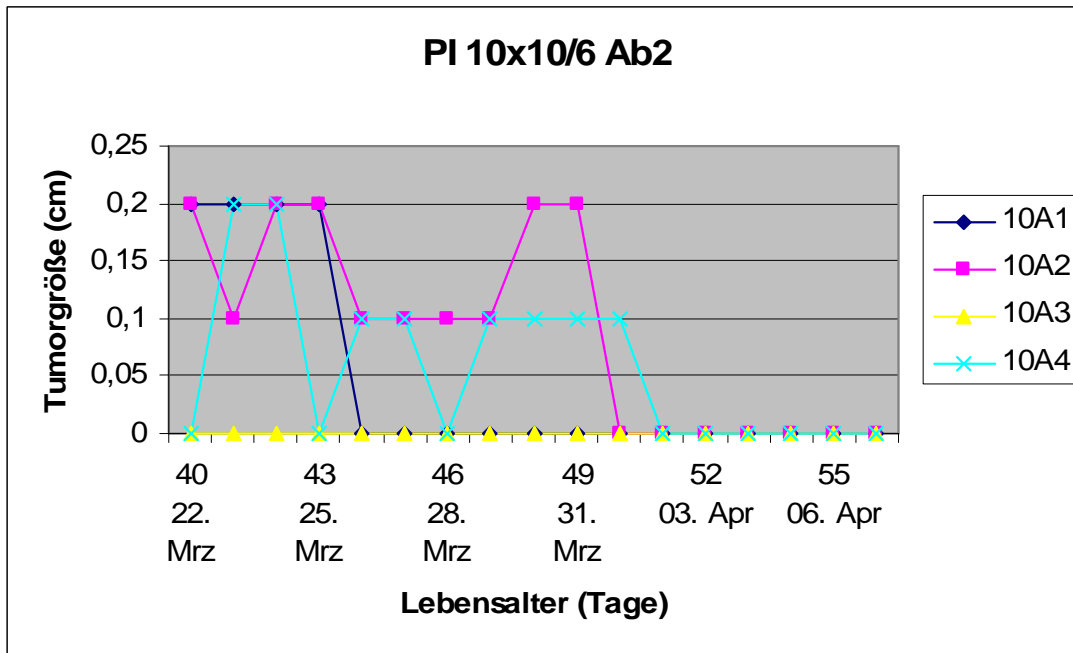


Abbildung 30: Tumorgröße der Einzeltiere der Ab2 Gruppe mit 10×10^6 Tumorzellen

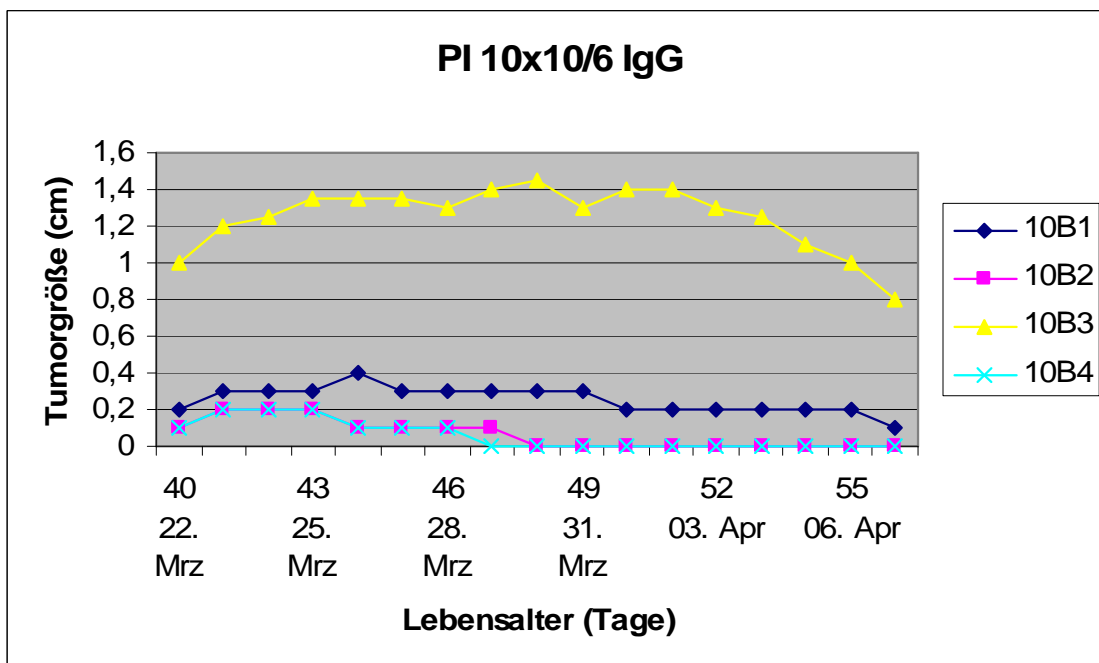


Abbildung 31: Tumorgröße der Einzeltiere der IgG Gruppe mit 10×10^6 Tumorzellen

Tabelle 23: Tumorwachstum der Einzeltiere der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 25×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	25A1	25A2	25A3	25A4
22. Mrz	40	0	0,1	0,2	0,2
23. Mrz	41	0	0,1	0,2	0,3
24. Mrz	42	0	0,3	0,2	0,2
25. Mrz	43	0	0,8	0,2	0,2
26. Mrz	44	0	0,6	0,1	0,1
27. Mrz	45	0	0,6	0,1	0
28. Mrz	46	0	0,5	0,1	0
29. Mrz	47	0	0,4	0,1	0
30. Mrz	48	0,1	0,4	0,2	0
31. Mrz	49	0,2	0,4	0,2	0
01. Apr	50	0,1	0,4	0,2	0
02. Apr	51	0	0,4	0,2	0
03. Apr	52	0	0,4	0,1	0
04. Apr	53	0	0,4	0	0
05. Apr	54	0	0,4	0,1	0
06. Apr	55	0	0,4	0,2	0
07. Apr	57	0	0,4	0,2	0

Tabelle 24: Durchschnittswerte der AB2 Gruppe mit einer Tumorlast von 25×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0,13	0,0957	0,15	0,13
23. Mrz	41	0,15	0,1291	0,15	0,15
24. Mrz	42	0,18	0,1258	0,20	0,08
25. Mrz	43	0,30	0,3464	0,20	0,20
26. Mrz	44	0,20	0,2708	0,10	0,15
27. Mrz	45	0,18	0,2872	0,05	0,23
28. Mrz	46	0,15	0,2380	0,05	0,20
29. Mrz	47	0,13	0,1893	0,05	0,18
30. Mrz	48	0,18	0,1708	0,15	0,18
31. Mrz	49	0,20	0,1633	0,20	0,10
01. Apr	50	0,18	0,1708	0,15	0,18
02. Apr	51	0,15	0,1915	0,10	0,25
03. Apr	52	0,13	0,1893	0,05	0,18
04. Apr	53	0,10	0,2000	0,00	0,10
05. Apr	54	0,13	0,1893	0,05	0,18
06. Apr	55	0,15	0,1915	0,10	0,25
07. Apr	57	0,15	0,1915	0,10	0,25

Tabelle 25: Tumorwachstum der Einzeltiere der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 25×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	25B1	25B2	25B3	25B4
22. Mrz	40	0,7	0,4	0,1	0,2
23. Mrz	41	0,8	0,3	0,2	0,2
24. Mrz	42	0,7	0,3	0,2	0,2
25. Mrz	43	0,7	0,3	0,2	0,2
26. Mrz	44	0,6	0,4	0,2	0,1
27. Mrz	45	0,4	0,5	0,2	0
28. Mrz	46	0,3	0,4	0,3	0,1
29. Mrz	47	0,3	0,3	0,3	0,1
30. Mrz	48	0,3	0,3	0,2	0,1
31. Mrz	49	0,2	0,3	0,1	0
01. Apr	50	0,2	0,2	0,2	0
02. Apr	51	0,2	0,2	0,2	0
03. Apr	52	0,1	0,2	0,2	0,1
04. Apr	53	0,1	0,2	0,2	0,1
05. Apr	54	0,1	0,2	0,1	0,1
06. Apr	55	0	0,2	0,1	0,1
07. Apr	57	0	0,2	0,1	0

Tabelle 26: Durchschnittswerte der IgG Gruppe mit einer Tumorlast von 25×10^6 Tumorzellen

	Lebenstag	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilabstand
22. Mrz	40	0,7	0,4	0,1	0,2
23. Mrz	41	0,8	0,3	0,2	0,2
24. Mrz	42	0,7	0,3	0,2	0,2
25. Mrz	43	0,7	0,3	0,2	0,2
26. Mrz	44	0,6	0,4	0,2	0,1
27. Mrz	45	0,4	0,5	0,2	0
28. Mrz	46	0,3	0,4	0,3	0,1
29. Mrz	47	0,3	0,3	0,3	0,1
30. Mrz	48	0,3	0,3	0,2	0,1
31. Mrz	49	0,2	0,3	0,1	0
01. Apr	50	0,2	0,2	0,2	0
02. Apr	51	0,2	0,2	0,2	0
03. Apr	52	0,1	0,2	0,2	0,1
04. Apr	53	0,1	0,2	0,2	0,1
05. Apr	54	0,1	0,2	0,1	0,1
06. Apr	55	0	0,2	0,1	0,1
07. Apr	57	0	0,2	0,1	0

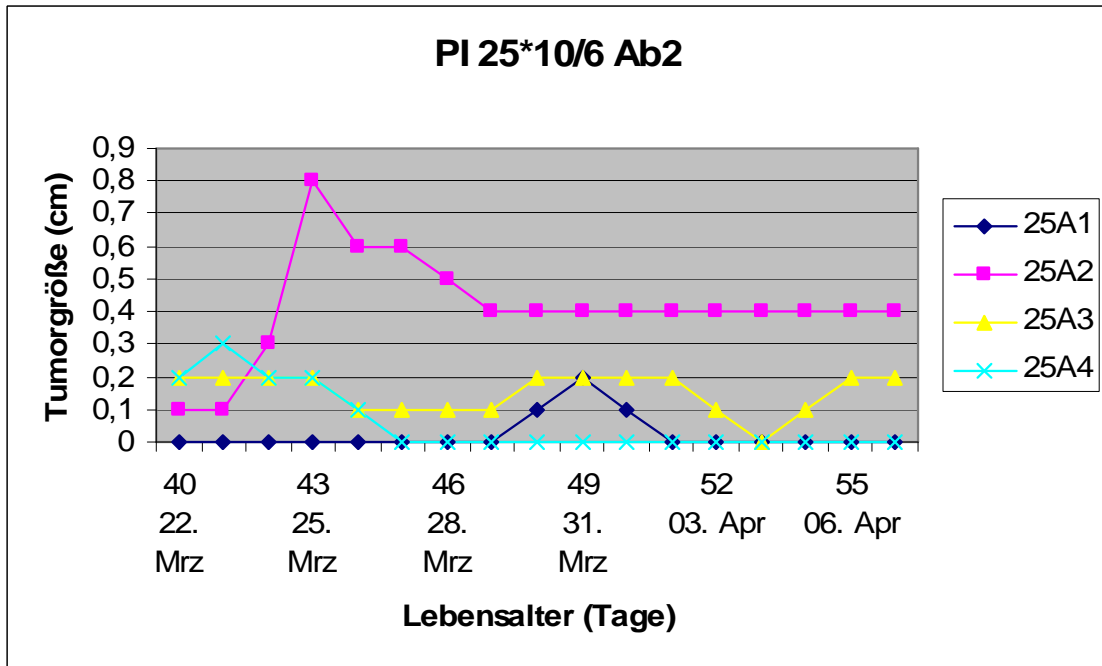


Abbildung 32 Tumorgröße der Einzeltiere der Ab2 Gruppe mit 25×10^6 Tumorzellen

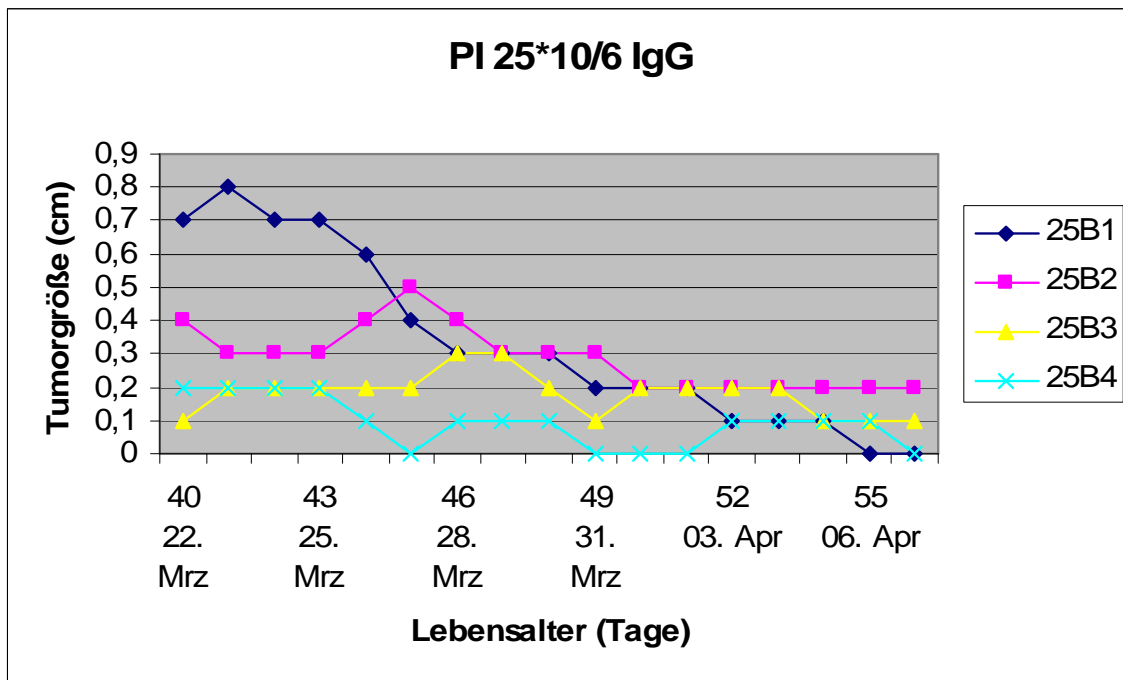


Abbildung 33 Tumorgröße der Einzeltiere der IgG Gruppe mit 25×10^6 Tumorzellen