

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Campus Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid in Kombination mit regionaler Hyperthermie in  
der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen – klinische Ergebnisse  
und Effekte auf die lytische Aktivität von natürlichen Killerzellen**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Veit Leonhard Bücklein  
aus  
Gräfelfing  
2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Biochem. Rolf D. Issels

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Martin Weisser  
Prof. Dr. med. Wolfram Dempke

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Valeria Milani  
Dr. med. Christina Limmroth

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2013

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Weichteilsarkome.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Grundlagen .....	2
1.1.2 Prinzipien der Therapie von Weichteilsarkomen.....	5
1.1.3 Zytostatische Therapie von Weichteilsarkomen .....	5
1.1.3.1 Wirksamkeitsbeurteilung einer zytostatischen Therapie in der Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen.....	8
1.1.3.2 Therapiekonzepte in der Zweitlinienbehandlung von Weichteilsarkomen .....	9
1.1.4 Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) in der Therapie von Weichteilsarkomen.....	18
1.1.5 Regionale Hyperthermie (RHT) .....	19
1.1.5.1 Grundlagen .....	19
1.1.5.2 Technik .....	22
1.1.5.3 Regionale Hyperthermie in der Therapie von STS .....	25
<b>1.2 Natürliche Killerzellen.....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Grundlagen .....	27
1.2.2 NK-Zellen in der Immunosurveillance von malignen Erkrankungen .....	28
1.2.3 Die konstitutionelle Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten.....	29
1.2.4 NK-Zell-Aktivierung .....	30
1.2.5 Stimulation der NK-Zell-Funktion durch IL-2 .....	32
1.2.6 Beeinflussbarkeit der NK-Zell-Aktivität durch Hyperthermie .....	33
<b>2 Fragestellungen .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 ICE + RHT in der Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Weichteilsarkomen.....</b>	<b>37</b>
2.1.1 Fragestellungen .....	37
2.1.2 Hypothese .....	38
<b>2.2 NK-Zell-Aktivität bei Patienten mit Weichteilsarkom unter Kombinationsbehandlung mit regionaler Hyperthermie .....</b>	<b>39</b>

2.2.1 Fragestellungen .....	39
2.2.2 Hypothese .....	40
<b>3 ICE + RHT in der Therapie von Weichteilsarkomen.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Patienten und Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.1.1 Patientenrekrutierung & Einschlusskriterien .....	41
3.1.2 Therapieprotokoll .....	42
3.1.3 Therapieansprechen nach RECIST-Kriterien .....	44
3.1.4 Überlebensanalyse .....	45
3.1.5 Thermometrie.....	46
3.1.6 Toxizität.....	47
3.1.7 Statistische Analyse.....	47
<b>3.2 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.2.1 Patientencharakteristika.....	50
3.2.2 Thermometrie.....	53
3.2.3 Toxizität.....	56
3.2.4 Tumoransprechen .....	58
3.2.5 Überlebensanalysen .....	60
3.2.5.1 Gesamtüberleben (OS).....	61
3.2.5.2 Progressionsfreies Überleben (PFS) .....	68
3.2.5.3 Progressionsfreie Überlebensrate (PFR).....	73
3.2.5.4 Lokal progressionsfreies Überleben (LPFS) .....	74
3.2.5.5 Fernprogressionsfreies Überleben (DPFS).....	77
<b>4 Die Funktion natürlicher Killerzellen in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 Material und Methoden .....</b>	<b>81</b>
4.1.1 Patienten- und Spenderproben.....	81
4.1.2 Isolierung der PBL aus Patienten- und Spenderproben mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	83
4.1.3 Zellkultur.....	84
4.1.4 Zellzählung.....	87

---

4.1.5 <sup>51</sup> Chrom-Freisetzung-Assay .....	87
4.1.6 Statistische Analyse .....	90
<b>4.2 Ergebnisse.....</b>	<b>91</b>
4.2.1 Patientencharakteristika.....	91
4.2.1.1 Charakteristika der Zweitlinienpatienten.....	91
4.2.1.2 Charakteristika der Erstlinienpatienten .....	94
4.2.2 <sup>51</sup> Chrom-Freisetzung-Assays .....	96
4.2.2.1 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten bei Therapiestart.....	96
4.2.2.2 Veränderung der NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten während eines Therapiezyklus .....	97
4.2.2.3 Veränderung der NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten im Laufe der Therapie .....	99
4.2.2.4 Stimulation der Aktivität bei Zweitlinienpatienten.....	100
4.2.2.4.1. NK-Zell-Aktivität nach Stimulation im Vergleich mit Proben von gesunden Spendern .....	101
4.2.2.4.2. Stimulierbarkeit im Verlauf der Therapie .....	102
4.2.2.4.3. Vergleich der lytischen Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Stimulationsansätzen .....	104
4.2.2.5 Unstimulierte und stimulierte NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten .	105
4.2.2.6 Vergleich der Aktivität von Erstlinienpatienten mit der Aktivität von gesunden Spendern und Zweitlinienpatienten.....	107
4.2.3 Veränderungen der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut während der Therapie mit ICE + RHT .....	108
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>109</b>
<b>5.1 ICE + RHT in der Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen .....</b>	<b>109</b>
5.1.1 Untersuchte Patientenpopulation .....	110
5.1.2 Thermometrie.....	112
5.1.3 Toxizität.....	114
5.1.4 Wirksamkeitsbeurteilung von ICE + RHT .....	116
5.1.4.1 Progressionsfreie Überlebensrate (PFR).....	117
5.1.4.2 Tumoransprechen.....	118
5.1.4.3 Gesamtüberleben .....	119

5.1.4.4 Die regionale Hyperthermie im Behandlungskonzept.....	121
5.1.4.5 Die Behandlung von Patienten mit metastasierter Erkrankung mit ICE + RHT.....	123
5.1.4.6 ICE + RHT in der Behandlung histologischer STS-Subentitäten.....	125
5.1.4.7 ICE + RHT in der Behandlung von Weichteilsarkomen mit mäßigem (G2) und schlechtem (G3) Differenzierungsgrad.....	126
5.1.4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen mit ICE + RHT .....	128
<b>5.2 <i>Die lytische Aktivität von NK-Zellen bei Weichteilsarkom-Patienten</i>.....</b>	<b>129</b>
5.2.1 Die unstimulierte NK-Zell-Aktivität.....	130
5.2.1.1 Unstimulierte NK-Zell-Aktivität gesunder Spender.....	130
5.2.1.2 Unstimulierte NK-Zell-Aktivität vor Einleitung der Zweitlinientherapie ..	131
5.2.1.3 Unstimulierte NK-Zell-Aktivität vor Einleitung der Erstlinientherapie ...	134
5.2.1.4 Veränderungen der NK-Zell-Aktivität im Verlauf der Therapie.....	135
5.2.2 Die Stimulation der NK-Zell-Aktivität.....	136
5.2.2.1 Stimulierbarkeit der NK-Zell-Aktivität durch IL-2 und TKD.....	136
5.2.2.2 Rolle von TKD in der Stimulation von NK-Zellen .....	138
5.2.3 Implikationen der Ergebnisse zur NK-Zell-Aktivität für die Therapie von Patienten mit Weichteilsarkomen.....	140
<b>5.3 <i>Ausblick</i> .....</b>	<b>141</b>
<b>6 <i>Zusammenfassung</i> .....</b>	<b>143</b>
<b>7 <i>Literaturverzeichnis</i> .....</b>	<b>145</b>
<b>8 <i>Anhang</i>.....</b>	<b>167</b>
8.1 <i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	167
8.2 <i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	170
8.3 <i>Tabellenverzeichnis</i> .....	173
8.4 <i>Patientenaufklärung</i> .....	175
8.5 <i>Danksagung</i> .....	177
8.6 <i>Publikationen</i> .....	178
8.7 <i>Lebenslauf</i> .....	179

## 1 Einleitung

Krebserkrankungen sind nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Ursache für Todesfälle in Deutschland. Etwa jeder vierte Mensch verstirbt in Folge einer bösartigen Neubildung.(19) Das Risiko eines Mannes, im Laufe seines Lebens an Krebs zu erkranken, beträgt fast 50%; bei Frauen liegt dieser Anteil mit 38% nur unwesentlich niedriger. Grob geschätzt verstirbt etwa die Hälfte der betroffenen Personen an ihrer Neoplasie.(72)

Aus diesen Zahlen ist die individuelle und volkswirtschaftliche Bedeutung von Krebserkrankungen ersichtlich. Die überwiegende Mehrheit der Patienten leidet dabei an Karzinomen zum Beispiel der Prostata, der Atemwege, des Darms oder der Brust.(72) Im Vergleich zu diesen Erkrankungen ist die Inzidenz von Weichteilsarkomen, deren Therapie Gegenstand dieser Arbeit ist, sehr niedrig. Die Versorgung von Patienten mit derart seltenen Erkrankungen wird allerdings dadurch erschwert, dass die Definition von Therapiestandards aufgrund geringer Fallzahlen sehr aufwendig ist.

Die vorliegende Arbeit versucht durch die Analyse und Bewertung eines in der Therapie von Weichteilsarkomen zur Anwendung kommenden Therapieprotokolls, bestehend aus Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid in Kombination mit regionaler Hyperthermie, einen Beitrag zur Verbesserung der Versorgung dieser Patienten zu leisten. Durch Erhebung von Daten zur Funktion des Immunsystems bei Patienten mit Weichteilsarkom, im Speziellen zur Funktion der NK-Zellen, sollen zudem mögliche neue Therapieansätze identifiziert werden.

### 1.1 Weichteilsarkome

Im Rahmen dieser Arbeit werden klinische Daten von Patienten ausgewertet, die aufgrund der Diagnose eines Weichteilsarkoms in einer Zweitlinientherapie behandelt wurden, also aufgrund eines Rezidivs nach Erstlinientherapie oder bei Progress der Erkrankung während dieser Erstlinientherapie. In den folgenden Abschnitten werden Grundlagen, Diagnose und Therapie von Weichteilsarkomen dargestellt.

### 1.1.1 Grundlagen

Weichteilsarkome (*soft tissue sarcoma*, STS) sind seltene maligne Tumoren, die ihren Ursprung – im Gegensatz zu Karzinomen – in Strukturen des Bindegewebes haben. Dabei werden als Bindegewebe nicht-epitheliale extraskelettale Strukturen definiert, die auf das embryonale Mesoderm und das Neuroektoderm zurückgehen. STS nehmen ihren Ausgang häufig in Muskeln, Fett und skelettassoziiertem Stützgewebe und treten in ca. 60% aller Fälle im Bereich der Extremitäten, sowie ebenfalls häufig im Bereich des Retroperitoneums auf.(22, 26)

Mit einer jährlichen Inzidenz von etwa vier Neuerkrankungen pro 100.000 Erwachsene in Europa (38, 117) machen Weichteilsarkome nur 1% aller Krebsneuerkrankungen aus. Benigne Tumore des Weichtalgewebes, insbesondere Lipome, sind um den Faktor 100 häufiger als maligne Erkrankungen. Abgesehen von Ausnahmen wie embryonalen Rhabdomyosarkomen, die nahezu ausschließlich in der Kindheit auftreten, oder Synovialsarkomen, die am häufigsten bei jungen Erwachsenen nachzuweisen sind, handelt es sich in der überwiegenden Anzahl der Fälle um Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters, mit einem Erkrankungsgipfel im Bereich des 65. Lebensjahres.(22)

In einer Analyse von Zahm und Fraumeni aus dem Jahr 1997 (210) zeigte sich eine zunehmende Inzidenz von STS im Verlauf der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts, die sich in anderen Analysen jedoch nicht bestätigen ließ.(149) Eine mögliche Erklärung für diese diskordanten Ergebnisse ist eine unzureichende Beachtung der deutlich zunehmenden Häufigkeit von Kaposi-Sarkomen in der Arbeit von Zahm et al., die in Zusammenhang mit der weltweiten Zunahme von HIV-Infektionen und AIDS zu sehen ist. Aufgrund der von anderen Weichteilsarkomen deutlich abweichenden Ätiologie und Therapie der Erkrankung wird auf Kaposi-Sarkome in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

In der überwiegenden Mehrzahl der Erkrankungsfälle sind für STS keine auslösenden Faktoren zu identifizieren. Exposition gegenüber verschiedenen Chemikalien, insbesondere Herbizide und Dioxin, wurde jedoch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer STS-Erkrankung assoziiert.(40) Außerdem erhöht die Durchführung einer Strahlentherapie das Risiko einer Weichteilsarkom-Entstehung im Bestrahlungsgebiet, mit einer Latenz von durchschnittlich acht bis zehn Jahren.(22, 148) Unabhängig davon ist das langjährige Bestehen eines

Lymphödems, zum Beispiel nach Mastektomie und Lymphnodektomie, ein Risikofaktor für die Entstehung eines Lymphangiosarkoms (Stewart-Treves-Syndrom).(160)

Auch genetische Einflüsse sind in der Ätiologie von Weichteilsarkomen von Bedeutung. Krebserkrankungen in der Familienanamnese erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von STS. Als Hinweis auf die Bedeutung von DNA-Reparaturmechanismen in der Ätiologie von STS konnten Berwick et al. zeigen, dass bei Patienten mit Weichteilsarkomen im Vergleich zu gesunden Individuen die mutagene Wirkung von Bleomycin signifikant erhöht ist.(8) Darüber hinaus gehen Erkrankungen wie das Li-Fraumeni-Syndrom mit einer ausgeprägten Erhöhung des Erkrankungsrisikos für verschiedene maligne Erkrankungen, unter anderem von STS, einher.(73) Patienten mit hereditärer Neurofibromatose weisen ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von malignen peripheren Nervenscheiden-tumoren auf.(22) Dennoch lässt sich in der überwiegenden Zahl der Patienten kein singulärer verursachender Faktor für die Entstehung eines Weichteilsarkoms erkennen.

Patienten mit Weichteilsarkomen stellen sich häufig erst spät im Verlauf der Erkrankung vor. Eine typische Symptomatik existiert, ähnlich wie bei vielen anderen onkologischen Erkrankungen, nicht. Bei Lokalisation des Sarkoms im Bereich der Extremitäten berichten betroffene Patienten über progrediente, nicht schmerzhafte Schwellungen, deren Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad variiert. Im Falle einer langsamen Progredienz der Erkrankung sind Verwechslungen mit benignen Läsionen häufig und können zu einer verspäteten adäquaten Therapie der Erkrankung führen.(171) Insbesondere Weichteilsarkome des Retroperitoneums und des Oberschenkels können Durchmesser im Bereich von 10-20 cm erreichen, bevor spezifische Symptome wie zum Beispiel Parästhesien, Defäkations- und Miktionsunregelmäßigkeiten auftreten, die sich dann meist durch eine Druckerhöhung im entsprechenden Kompartiment erklären.(26)

Nach Diagnosestellung einer Weichteilgewebsvermehrung, insbesondere bei nachgewiesener Größenprogredienz, muss eine histologische Abklärung der Dignität der Raumforderung erfolgen. Diese erfolgt im Bereich der Extremitäten üblicherweise mittels Biopsie. Bei retroperitonealen Raumforderungen sollte unter Umständen bei STS-verdächtiger Morphologie in der bildgebenden Untersuchung auf die bioptische

## Einleitung

---

Abklärung verzichtet und eine vollständige Resektion des Tumors angestrebt werden.(26) Der Nachweis von Malignität erfordert die Durchführung von Staginguntersuchungen, die üblicherweise Computertomographie-Untersuchungen des Thorax und des Abdomens umfassen. Bei Lokalisation des Tumors im Bereich der Extremitäten erfolgt darüber hinaus auch eine Bildgebung des entsprechenden Areals mittels Magnetresonanztomographie. Der Einsatz von kombinierten nuklearmedizinischen und bildgebenden Verfahren wie Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET/CT) ist bei Patienten mit STS möglicherweise vorteilhaft, da die Evaluation eines Tumoransprechens mittels PET/CT eine bessere Einschätzung des histopathologischen Ansprechens erlaubt als die Anwendung bildgebender Verfahren alleine.(41) Dies ist insbesondere bei Anwendung von neoadjuvanten Therapieschemata zur frühzeitigen Einschätzung des Therapieerfolges von Bedeutung.(7)

Der Terminus „Weichteilsarkom“ ist ein Sammelbegriff für eine ganze Reihe von histologischen Subentitäten. So umfasst die Gruppe der Weichteilsarkome in der WHO-Klassifikation für Tumore des Weichteilgewebes und des Knochens etwa 50 spezifische histologische Diagnosen.(22) Dabei erfolgt die Einteilung üblicherweise in Anlehnung an das Ursprungsgewebe, das die größte Ähnlichkeit zum vorgefundenen Tumor aufweist. Hieraus resultiert eine Einteilung in adipozytische, fibroblastische, fibrohistiozytäre Tumorentitäten sowie in Tumore, die ihren Ursprung im Skelettmuskel oder glattem Muskelgewebe, in perivaskulärem oder vaskulärem Bindegewebe haben. Darüber hinaus existieren Tumore mit unklarer Differenzierung, die keiner der vorgenannten Gruppen zugeordnet werden können, wobei hierzu zum Beispiel Synovialsarkome zählen. Die am häufigsten diagnostizierten Subentitäten waren in einer großen prospektiven Studie aus dem Jahr 2011, gastrointestinale Stromatumoren (GIST), unklassifizierbare Sarkome (unter anderem „*not otherwise specified*“, NOS), sowie Lipo- und Leiomyosarkome.(38)

Für einzelne dieser Subentitäten sind rekurrente genetische Aberrationen wie chromosomal Translokationen beschrieben, so zum Beispiel die Translokation t(X;18) unter Einbeziehung der SSX-Gene bei Synovialsarkomen und t(12;16) oder t(12;22) bei myxoiden Liposarkomen.(26)

In den letzten Jahren mehrt sich die Evidenz, dass eine solche Subklassifikation nicht nur akademische Bedeutung hat, sondern dass unter dem Sammelbegriff der

Weichteilsarkome in ihrem klinischen Verlauf unterschiedliche, eigenständige Erkrankungen subsumiert werden, die ein differenziertes Vorgehen hinsichtlich der Auswahl der anzuwendenden Therapie erfordern (siehe Abschnitt 1.1.3, S. 5).(175) Abhängig von der Tumogröße, dem Tumorgrading und der Lokalisation des Tumors (tief vs. oberflächlich) erfolgt die Einteilung der Weichteilsarkome in Standard- und Hochrisikosarkome. Dabei sind Hochrisikosarkome charakterisiert durch einen Durchmesser von mehr als 5 cm, ein G2- oder G3-Tumorgrading (mittelgradig oder gering differenziert im Gratingsystem nach FNCLCC (29) beziehungsweise nach van Unnik (195)) und durch eine tiefe Lokalisation (mediastinale, retroperitoneale oder Lokalisation im Becken, bei Extremitätentumoren Infiltration der oberflächlichen Faszie oder Lokalisation vollständig unter der oberflächlichen Faszie).(203) Die Einteilung hat Konsequenzen für die einzuleitende Therapie.

### **1.1.2 Prinzipien der Therapie von Weichteilsarkomen**

Nach wie vor ist die operative Entfernung von Weichteilsarkomen mit ausreichenden Resektionsrändern der Goldstandard in der Therapie dieser Erkrankungen.(22, 23) Eine Ergänzung des Therapiekonzeptes um eine adjuvante oder neoadjuvante Bestrahlung kann bei Tumoren mit mäßiger oder schlechter Differenzierung die Lokalrezidivrate senken.(26) Insbesondere bei retroperitoneal lokalisierten Weichteilsarkomen ist, infolge der Nähe zu vitalen Strukturen, ein Erreichen von ausreichenden Resektionsrändern jedoch oft schwierig. Auch eine prä- oder postoperative Bestrahlung ist durch die Nähe zu strahlensensiblen Strukturen wie dem Darm nicht mit Strahlendosen möglich, wie sie bei Tumoren der Extremitäten erreichbar sind.(162) Damit ist eine ausreichende Therapie von Patienten mit STS allein mittels Resektion und Bestrahlung häufig nicht möglich.

### **1.1.3 Zytostatische Therapie von Weichteilsarkomen**

Daher kommen neben den beiden genannten Modalitäten auch regelmäßig zytostatische Medikamente, häufig als Polychemotherapie mit mehreren Substanzen, in der Therapie von Weichteilsarkomen zum Einsatz. Da diese Arbeit die Wirksamkeit einer solchen Polychemotherapie in Kombination mit regionaler Hyperthermie untersucht, soll darauf im Folgenden ausführlicher eingegangen werden.

Ziel eines Einsatzes von Zytostatika bei operabler Erkrankung ist immer die Größenreduktion des Tumors. So soll eine möglichst nebenwirkungsarme Resektion sowie die Verhinderung einer okkulten Metastasierung ermöglicht werden. Im Rahmen verschiedener multidisziplinärer Studien ist die Frage, welchen Stellenwert eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit *resektablem* Weichteilsarkom hat, letztlich noch nicht eindeutig geklärt.(24, 203) In gewissen Hochrisiko-Subgruppen, wie zum Beispiel bei Patienten mit insuffizienter chirurgischer Therapie im Sinne einer R1-Resektion des Tumors oder schlecht differenzierten G3-Tumoren, scheint eine adjuvante Chemotherapie mit Doxorubicin, einem Anthrazyklin, in Kombination mit Ifosfamid indiziert zu sein. Für den standardmäßigen Einsatz einer adjuvanten zytostatischen Behandlung nach Resektion eines Weichteilsarkoms ist kein ausreichender Beleg für einen Einfluss auf das Gesamtüberleben erbracht.(23, 155)

Außer Frage steht – auch in Ermangelung von Alternativen – die Indikation zur chemotherapeutischen Behandlung von Patienten mit inoperabler oder bereits metastasierter Erkrankung. Etwa 50% aller Patienten mit der Diagnose eines STS entwickeln im Verlauf der Erkrankung Fernmetastasen (26), sodass wirksame Zytostatika für diese Situation dringend erforderlich sind. Die erreichten Remissionsraten (Anteil der Patienten mit Voll- oder Teilremission unter zytostatischer Therapie) für nachgewiesen wirksame Substanzen wie Doxorubicin, Ifosfamid und Dacarbazin als Monotherapie sind mit 15-30% jedoch relativ niedrig.(150, 197) Bei Kombination mehrerer chemotherapeutischer Agenzien (typischerweise Doxorubicin und Ifosfamid) zeigen sich signifikant höhere Ansprechraten (ca. 20-45%), ohne dass hieraus eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens resultiert.(197)

Die Gründe für diese relative Unempfindlichkeit der STS – auch bereits bei Erstdiagnose der Erkrankung – gegenüber klassischen zytostatisch wirksamen Medikamenten sind nur teilweise erklärt. *Multi-drug resistance* (MDR), die Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl zytostatischer Medikamente, vermittelt unter anderem durch eine beschleunigte Entfernung von Zytostatika aus Tumorzellen durch spezielle Transporterproteine, scheint hierbei zumindest teilweise eine Rolle zu spielen. So zeigte eine Untersuchung von Komdeur et al. an Weichteilsarkombiopsien, dass 96% aller untersuchten Tumorproben (n=141)

mindestens eines der mit *multi-drug resistance* assoziierten Proteine exprimieren (*P-glycoprotein* [Pgp], *multidrug resistance-associated protein 1* [MPR1] und *lung resistance-related protein* [LPR]).(95) Daten aus kleinen Fallserien legen den Schluss nahe, dass die Expression von *Pgp* in Weichteilsarkomen mit einem geringeren pathologischen Tumorregressionsgrad nach chemotherapeutischer Behandlung assoziiert ist.(83)

Weiterführende Analysen zeigen jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von *Pgp* und der Gesamt- oder progressionsfreien Überlebenszeit bei Patienten mit Weichteilsarkomen (30), sodass davon auszugehen ist, dass die geringe chemotherapeutische Beeinflussbarkeit von Weichteilsarkomen durch den Mechanismus der *multi-drug resistance* nicht ausreichend erklärt ist. Über weitere Mechanismen, die an der Vermittlung der relativen Zytostatikaresistenz der Tumore beteiligt sind, ist wenig bekannt.

In den letzten Jahren wurden Subentitäten in der heterogenen Gruppe der Weichteilsarkome identifiziert, die eine im Vergleich zu anderen Subentitäten überdurchschnittlich hohe Ansprechrate beziehungsweise ein überdurchschnittlich langes progressionsfreies Überleben unter zytostatischer Therapie zeigen. Beispielhaft seien hier die GIST erwähnt, deren Therapie im letzten Jahrzehnt radikalen Veränderungen unterlag. Ursprünglich als ausnehmend chemotherapierefraktär eingeschätzt, haben sich die Überlebenszeiten seit Nachweis einer regelhaften CD117-Expression (c-kit) auf den Tumorzellen durch Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib massiv verlängert. Oftmals gelingt auch bei Nachweis einer Metastasierung eine Stabilisierung der Erkrankung über einen Zeitraum von Jahren.(199) Außerdem waren in retrospektiven Analysen bei myxoiden Liposarkomen unter Therapie mit Trabectedin Ansprechraten von über 50% zu dokumentieren.(61)

In der überwiegenden Mehrzahl der Weichteilsarkom-Subentitäten ist jedoch nach wie vor von einer schlechten beziehungsweise nur moderaten Sensitivität bei Behandlung mit klassischen zytostatischen Therapeutika auszugehen. Als Standard in der Erstlinientherapie wird aktuell Doxorubicin, eventuell ergänzt um Ifosfamid, angesehen, da unter der Therapie mit diesen Substanzen bei relativ guter Verträglichkeit ausreichende Ansprechraten dokumentiert werden können.(23) Wenn in Folge einer solchen Doxorubicin-basierten Therapie keine kurative Resektion des

Tumors möglich ist, kommt es jedoch meist zum Versagen der Therapie mit Auftreten eines Rezidivs oder Progredienz einer vorbestehenden Tumormanifestation. Hierbei handelt es sich also um eine Anthracyklin-refraktäre Erkrankung, für deren Versorgung weitere chemotherapeutische Alternativen notwendig sind. Ein Standard für diese Zweitlinientherapie ist bisher nicht definiert.(158) Nach dem Versagen der Anthracyklin-basierten Standardtherapie beträgt die durchschnittliche Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittenem und/oder metastasiertem Weichteilsarkom durchschnittlich nur etwa sechs Monate.(34) Dies verdeutlicht die dringende Notwendigkeit der Identifikation und Erforschung von Wirkstoffen oder Wirkstoffkombinationen mit ausreichender Wirksamkeit in dieser Situation. In den letzten Jahren ist deshalb eine Vielzahl von Studien zur Identifikation von derartigen Substanzen initiiert worden. Die Ergebnisse dieser Studien sollen im Folgenden zusammengefasst werden. Zunächst wird jedoch kurz auf Kriterien zur Wirksamkeitsbeurteilung, die in diesen Studien zur Anwendung kommen, eingegangen.

#### **1.1.3.1            *Wirksamkeitsbeurteilung einer zytostatischen Therapie in der Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen***

In Studien evaluierte Therapieoptionen in der Behandlung von Anthracyklin-refraktären Weichteilsarkomen zeigen Ansprechraten, die meist noch geringer sind als für Therapieschemata, die in der Erstlinientherapie zur Anwendung kommen.(158)

Die Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie ist jedoch unter Umständen selbst dann gegeben, wenn es nicht zu einer messbaren Verkleinerung des Tumors kommt, sondern zu einer Verlangsamung oder einer kompletten Unterbrechung eines vorbestehenden Tumorwachstums. Auch wenn das Metastasierungspotential einer Tumors reduziert oder aufgehoben wird, profitiert der Patient von diesem Effekt der Chemotherapie. Solche Effekte werden bei Beurteilung des Tumoransprechens als einziger Parameter in der Beurteilung der Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie jedoch nicht oder nur unvollständig erfasst.

Korn et al. (101) schlugen deshalb in einer Arbeit von 2001 alternative Kriterien zur Beurteilung der Wirksamkeit von zytostatischen (Kombinations-)Therapien vor; für Phase II-Studien wiesen sie auf die progressionsfreie Überlebensrate (*progression*

*free survival rate*, PFR) nach einem definierten Zeitintervall als Wirksamkeitskriterium hin. Hierfür wird der Anteil an Patienten berechnet, die – bei vor Therapiestart progredienter Erkrankung – zum Beispiel sechs Monate nach Start der Therapie keinen Hinweis auf Progression der Erkrankung mehr zeigen.

Van Glabbeke et al. (193) übertrugen die progressionsfreie Überlebensrate als Wirksamkeitskriterium auf die Behandlung von Weichteilsarkomen und legten Richtwerte für wirksame und nicht-wirksame Therapieprotokolle fest. Hierzu analysierten sie Daten aus der Weichteilsarkom-Datenbank der *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), in der Ergebnisse von insgesamt zwölf prospektiven Therapiestudien erfasst sind. Anhand der Daten von insgesamt 380 Patienten mit Anthracyklin-refraktärer Erkrankung konnten durch Einteilung der verabreichten Zytostatika in aktive (Ifosfamid und Dacarbazin) und inaktive (alle anderen) Substanzen Richtwerte für die PFR definiert werden. Demnach ist von einer aktiven Therapieoption auszugehen, wenn die PFR nach drei Monaten  $\geq 40\%$  oder nach sechs Monaten  $\geq 15\%$  ist. Inaktivität ist dann anzunehmen, wenn die PFR nach drei Monaten  $\leq 20\%$  und nach sechs Monaten  $\leq 8\%$  ist.(158, 193) Diese Publikation ermöglicht die Erfassung eines weiteren relevanten Kriteriums neben dem reinen Therapieansprechen im Sinne einer Tumorvolumenreduktion und ist daher als Basis für eine zuverlässige Beurteilung von Therapieoptionen in der Zweitlinientherapie von Patienten mit Weichteilsarkomen zu sehen. Die definierten Richtwerte sollen deshalb in der hier vorliegenden Arbeit Anwendung finden.

### **1.1.3.2            *Therapiekonzepte in der Zweitlinienbehandlung von Weichteilsarkomen***

Eine Übersicht über die veröffentlichten Studien zur Therapie von Anthracyklin-refraktären STS der letzten zehn Jahre gibt der Artikel von Penel et al. (158) aus dem Jahr 2010, in dem die Ergebnisse von Phase II-Studien zur Therapie fortgeschrittenster Weichteilsarkome, die zwischen 1999 und 2009 veröffentlicht worden waren, zusammengefasst werden. Anhand der erreichten PFR-Werte nach drei und sechs Monaten und den hierfür publizierten Zielwerten (193) erfolgt eine Einteilung der Substanzen in Therapeutika mit wahrscheinlicher, unsicherer und fehlender Wirksamkeit.

## Einleitung

Die folgenden Tabellen 1-1 (wirksame Therapiekonzepte), 1-2 (unwirksame Therapiekonzepte) und 1-3 (nicht sicher einzuordnende Therapiekonzepte) ermöglichen eine Übersicht über die untersuchten Behandlungsprotokolle (modifiziert nach Penel et al. (158)). Die Tabellen geben Aufschluss auf die angewendeten Therapeutika, deren Dosierung und die Zyklusdauer, sowie über die in die entsprechende Studie eingeschlossenen STS-Subentitäten und die Anzahl der untersuchten Patienten. Zur Beurteilung der Wirksamkeit der eingesetzten Therapie werden die PFR-Werte nach drei und sechs Monaten, die Ansprechraten, die Anzahl und Qualität der erreichten Remissionen, das Gesamtüberleben nach Einleitung der Therapie und das Nebenwirkungsprofil dargestellt.

In einigen Fällen werden in den Tabellen Therapiekonzepte abweichend von der Wirksamkeitsbeurteilung in der Arbeit von Penel et al. kategorisiert. Diese Konzepte sind farblich markiert. Gründe für die Neueinteilung waren überwiegend differente Ergebnisse in Original- und Übersichtsarbeit; für diese Fälle wurden die Daten der Originalarbeit als Maßstab für die Wirksamkeitsbeurteilung angewendet.

Untersuchte Zytostatika (-kombinationen)	Eingeschlossene Subtypen	n	Drei-Monats-% (95%-KI)	PFR in % (95%-KI)	Sechs-Monats-% (95%-KI)	Ansprechrate	MedIANES OS (Monate, 95%-KI)	Max. Grad III/IV Myelotoxizität in %	Fieber Zytopenie in %	Ref.
Brostallicin 10 mg/m <sup>2</sup> (alle 21 Tage)	Alle	43	45 (29–60)	22 (9–34)	5 % (2 PR)	7,7	70 %	14 %	0 %	(113)
DTIC 500 mg/m <sup>2</sup> + Gemcitabin 1800 mg/m <sup>2</sup> (alle 14 Tage)	Alle	26	46 (27–65)	27 (10–44)	4 % (1 CR)	9,3	96 %	0 %	0 %	(121)
DTIC 500 mg/m <sup>2</sup> + Gemcitabin 1800 mg/m <sup>2</sup> (alle 14 Tage)	Alle	57	56 (43–69)	n.a.	12 % (6 PR)	16,8	48 %	9 %	9 %	(49)
Gemcitabin 900 mg/m <sup>2</sup> an d1 & 8 + Docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> an d8 (alle 21 Tage)	Uterine Leiomyosarkome	51	72 (60–84)	51 (32–64)	27 % (3 CR, 10 PR)	14,7 (0,8 – 50,9+)	39 %	4 %	4 %	(66)
Ifosfamid 3 g/m <sup>2</sup> d1-d3 (alle 21 Tage)	Alle	40	65 (50–79)	20 (7–32)	8 % (1 CR, 2 PR)	11,3	77 %	10 %	10 %	(194)
Trofosfamid 300mg d1-d7, dann 150mg kontinuierlich	Alle	18	66 (21–44) <sup>1</sup>	n.a.	18 % (3 PR)	10	22 %	0 %	0 %	(94)
Pazopanib 800 mg/d	Leiomyosarkome	42	44 (28–59)	>33	2 % (1 PR)	11,8 (10,6 – 18,1)	4 %	n.a.	n.a.	(176)
Pazopanib 800 mg/d	Synovial-sarkome	39	48 (28–59)	>33	13 % (5 PR)	10,3 (7,7 – 13,5)				
Pazopanib 800 mg/d	Non-Liposarkome	43	40 (24–54)	>33	7 % (3 PR)	10,0 (8,2 – 22,4)				
Temozolomid 75-100 mg/m <sup>2</sup> für 42 Tage, gefolgt von 21 Tagen Pause	Alle	43	42 (27–56)	25 (12–38)	16 % (7 PR)	8,1 (5,6 – 10,7)	79 %	0 %	0 %	(48)
Trabectedin 0,58 mg/m <sup>2</sup> über 3h (alle 7 Tage)	Leiomyosarkome und Liposarkome	134	45 (36–54)	27 (19–36)	2 % (n.a.)	11,8	24 %	< 1 %	< 1 %	(34)
Trabectedin 1,5 mg/m <sup>2</sup> über 24h (alle 21 Tage)	Leiomyosarkome und Liposarkome	136	53 (45–62)	37 (28–46)	6 % (n.a.)	13,9	47 %	< 1 %	< 1 %	(34)

Untersuchte Zytostatika (-kombinationen)	Eingeschlossene Subtypen	n	Drei-Monats-PFR in % (95%-KI)	Sechs-Monats-PFR in % (95%-KI)	Ansprechrate	Medianes OS (Monate, 95%-KI)	Max. Myelotoxizität in %	Fieber Zytopenie in %	Ref.
Trabectedin 1,5 mg/m <sup>2</sup> über 24h (alle 21 Tage)	Alle	36	47 (31–63)	22 (8–35)	8 % (1 CR, 2 PR)	12,1 (8,1 – 26,5)	43 %	6 %	(50)
Trabectedin 1,5 mg/m <sup>2</sup> über 24h (alle 21 Tage)	Alle	99	52 (42–62)	29 (20–38)	8 % (8 PR)	9,2 (7,9 – 12,1)	53 %	9 %	(112)
Ifosfamid 1,5g/m <sup>2</sup> , Carboplatin 100 mg/m <sup>2</sup> , Etoposid 150 mg/m <sup>2</sup> d1-d4 (alle 28 Tage) <sup>2</sup>	Alle	20	60	45	20 % (4 PR)	14,6 (10,6 – 16,1)	70 %	45 %	(44)

**Tabelle 1-1** Wahrscheinlich wirksame Therapieprotokolle in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen (ausgewählte Publikationen der letzten 10 Jahre; PFR: progressionsfreie Überlebensrate, KI: Konfidenzintervall, OS: Gesamtüberleben)  
grün hinterlegte Zeile: abweichende Einteilung des Wirkstoffes (im Vergleich zur Arbeit von Penel et al.(158)), hier ursprünglich als „nicht sicher zu beurteilen“ eingeteilt

<sup>1</sup> Übernahme der Ergebnisse aus Penel et al.(158), Daten im Originaltext nicht angegeben  
<sup>2</sup> retrospektive Analyse

Untersuchte Zytostatika (-kombinationen)	Eingeschlossene Subtypen	n	Drei-Monats-PFR % (95%-KI)	Sechs-Monats-PFR in % (95%-KI)	Ansprechrate	Medianes OS (Monate, 95%-KI)	Max. Myelo-toxizität in %	Fieber Zytopenie in %	in Ref.
Temozolomid 150 mg/m <sup>2</sup> d1-d5 (alle 28 Tage)	Alle	31	n.a.	5 (0-16) <sup>1</sup>	3,3 % (1 PR)	7	3 %	0 %	(207)
Gemcitabin 250 mg/m <sup>2</sup> d1, 15 (alle 28 Tage)	Alle	18	n.a.	3 (0-9) <sup>1</sup>	11 % (2 PR)	n.a.	n.a.	n.a.	(179)
Gemcitabin 1250 mg/m <sup>2</sup> d1, 8 (alle 21 Tage)	Alle	32	n.a.	17 (14-20) <sup>1</sup>	3,2 % (1 PR)	8,6 (4,2 - 12,2)	12,5 %	n.a.	(185)
Raltitrexed, 3 mg/m <sup>2</sup> d1 (alle 21 Tage)	Alle	23	n.a.	6 (0-18)	0 %	n.a.	5 %	5 %	(10)
Topotecan, 1,5 mg/m <sup>2</sup> d1-d5 (alle 21 Tage)	Alle	16	31 (10-53)	6 (0-18)	0 %	5,5 (1,5 - 13,5)	69 %	6 %	(165)
Bryostatin, 120 mg/m <sup>2</sup> / 72h (alle 14 Tage)	Alle	10	n.a.	n.a.	0 %	n.a.	0 %	n.a.	(17)
TZT-1027, 2,4 mg/m <sup>2</sup> d1, 8 (alle 21 Tage)	Alle	29	< 30 <sup>3</sup>	3	0 %	5,8 (4,3 - 10,2)	32 %	0 %	(154)
Semaxanib, 145 mg/m <sup>2</sup> 2x wöchentlich	Alle (inkl. GIST)	31	23 <sup>3</sup>	6 <sup>3</sup>	0 %	n.a.	2,5 %	n.a.	(105)
Semaxanib, 145 mg/m <sup>2</sup> 2x wöchentlich	Alle (inkl. GIST)	13	8 (1-54)	0 (0-22)	0 %	22,8	0 %	0 %	(70)
Geftitinib, 500mg/d	HER-1-exprimierende Synovialsarkome	48	21 <sup>4</sup>	6	0 %	n.a.	2 %	2 %	(163)
Exatecan 0,5 mg/m <sup>2</sup> d1-d5 (alle 21 Tage)	Nicht-Leiomyosarkome	23	26 (8-44) <sup>2</sup>	8 (0-20) <sup>1</sup>	0 %	n.a.	65 %	15 %	(166)

**Tabelle 1-2** Wahrscheinlich unwirksame Therapieprotokolle in der Zweitlinientherapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen (ausgewählte Publikationen der letzten 10 Jahre; PFR: progressionsfreie Überlebensrate, KI: Konfidenzintervall, OS: Gesamtüberleben)  
Orange hinterlegte Zeile: abweichende Einteilung des Wirkstoffs (im Vergleich zur Arbeit von Penel et al.(158)), hier ursprünglich als „nicht sicher zu beurteilen“ eingeteilt

<sup>1</sup> Übernahme der Ergebnisse aus Penel et al.(158), Daten im Originaltext nicht angegeben

<sup>2</sup> Anteil aller behandelten Patienten in der Studie (n=18), inklusive Patienten mit Knochensarkomen

<sup>3</sup> Eigene Berechnung

<sup>4</sup> Anteil nach vier Monaten

Untersuchte Zytostatika (-kombinationen)	Eingeschlossene Subtypen	n	Drei-Monats-PFR in % (95%-KI)	Sechs-Monats-PFR in % (95%-KI)	Ansprechrate	Medianes OS (Monate, 95%-KI)	Max. Grad III/IV Myelo-toxizität in %	Fieber Zytopenie in %	in Ref.
Trabectedin 1,5 mg/m <sup>2</sup> über 24h (alle 21 Tage)	Alle	54	39 (25–51)	24 (12–34)	4 (2 PR)	12,8	61 %	7 %	(209)
Gemcitabin 1000 mg/m <sup>2</sup> d1, 8, 15 (alle 28 Tage)	Alle	14	33 (12–48)	28 (16–40)	7 % (1 PR)	11,8	14 %	0 %	(42)
Gemcitabin 1000 mg/m <sup>2</sup> d1, 8, 15 (alle 28 Tage)	Uterine Leiomyosarkome	48	>38 (–) <sup>1</sup>	n.a.	20,5 % (1 CR, 8 PR)	n.a.	34 %	18 %	(119)
Gemcitabin 1000 mg/m <sup>2</sup> wöchentlich für 7 Wochen, gefolgt von 1 Woche Pause	Alle	8	25 (3–46) <sup>1</sup>	22 (3–41) <sup>1</sup>	12,5 % (1 PR)	n.a.	16 % <sup>2</sup>	n.a.	(126)
Gemcitabin 1000 mg/m <sup>2</sup> d1, 8, 15 (alle 28 Tage)	Alle	15	47 (21–72)	13 (0–30)	7 % (1 PR)	n.a.	33 %	7 %	(65)
Pazopanib 800 mg/d	Liposarkome	19	26 (6–46) <sup>1</sup>	>5	0 %	6,4 (4,1 – 19,7)	4 %	n.a.	(176)
Imatinib 400 mg/d	Alle	24	29 (11–47) <sup>1</sup>	n.a.	0 %	n.a.	23 %	0 %	(199)
Docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> (alle 21 Tage)	Alle	15	31 (8–59) <sup>1</sup>	n.a.	0 %	n.a.	45 %	12 %	(198)
Docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> d1 (alle 21 Tage) oder 40 mg/m <sup>2</sup> (wöchentlich)	Alle	27	29 (12–46) <sup>1</sup>	22 (6–37) <sup>1</sup>	15 %	7,7 (7,3 – 17,1)	37 %	7 %	(103)
DTIC 1200 mg/m <sup>2</sup> d1 (alle 21 Tage)	Alle	52	37 (23,5–50)	n.a.	4 % (2 PR)	8,2	31 %	6 %	(49)
Exatecan 0,5 mg/m <sup>2</sup> d1–d5 (alle 21 Tage)	Leiomyosarkome	16	56 (32–80) <sup>2</sup>	12 (0–28) <sup>1</sup>	0 %	n.a.	65 %	15 %	(166)
Bendamustin 100 mg/m <sup>2</sup> d1&d2 (alle 28 Tage)	Alle	36	35 (19–51)	21 (7–34)	3 % (1 PR)	n.a.	11 %	3 %	(64)
Ifosfamid 5g/m <sup>2</sup> d1 (alle 21 Tage)	Alle	36	36 (20–51) <sup>1</sup>	11 (0–21) <sup>1</sup>	6 % (1 CR, 1 PR)	11	32 %	0 %	(194)
Sunitinib 50mg/d (alle 42 Tage)	Uterine Leiomyosarkome	25	30 (10–45) <sup>1</sup>	17 (6–35)	9 % (2 PR)	15,1	17 %	0 %	(68)

**Tabelle 1-3** Nicht sicher zu beurteilende Therapieprotokolle in der Zweitlinientherapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen (ausgewählte Publikationen der letzten 10 Jahre; PFR: progressionsfreie Überlebensrate, Ki: Konfidenzintervall, OS: Gesamtüberleben)

Orange hinterlegte Zelle: abweichende Einteilung des Wirkstoffes (im Vergleich zur Arbeit von Penel et al.(158)), hier ursprünglich als „wahrscheinlich wirksam“ eingeteilt  
 Grün hinterlegte Zeilen: abweichende Einteilung des Wirkstoffes (im Vergleich zur Arbeit von Penel et al.(158)), hier ursprünglich als „wahrscheinlich unwirksam“ eingeteilt  
<sup>1</sup>Übernahme der Ergebnisse aus Penel et al. (158), Daten im Originaltext nicht angegeben  
<sup>2</sup>Übernahme der Konfidenzintervalle aus Penel et al. (158), Daten im Originaltext nicht angegeben

Aus den Tabellen ist zu erkennen, dass in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen wurden, um wirksame Substanzen und Therapieprotokolle für Patienten mit Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen zu identifizieren.

Ifosfamid ist wiederholt auf seine Wirksamkeit in der Therapie dieser Erkrankungen getestet worden. Erste Berichte über die Anwendung in der Therapie von STS stammen aus den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts, als in kleinen Studien vielversprechende Ergebnisse publiziert werden konnten.(182) Bereits wenig später wurde Ifosfamid in Kombination mit Doxorubicin angewendet, mit dem Ziel, höhere Remissionsraten zu erzielen.(206) In einer Reihe von Studien konnte bestätigt werden, dass in der Erstlinientherapie die Kombination der beiden Substanzen mehr Remissionen induziert als Doxorubicin alleine. Jedoch zeigten sich keine Effekte in Bezug auf die Verbesserung des Überlebens.(39, 174)

Unabhängig von den Effekten einer Kombination mit Doxorubicin ist Ifosfamid als Monotherapie ein wirksames Zytostatikum in der Therapie von STS und in der Lage, Remissionen zu erzielen.(120) Dies gilt auch für Patienten, die bereits mit Anthrazyklinen oder auch Ifosfamid-haltigen Kombinationschemotherapien behandelt wurden. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Ifosfamid zu Nutze, dass die Substanz, verabreicht in signifikant höheren Dosierungen, auch dann noch Remissionen erzeugen kann, wenn ein Rezidiv oder ein Progress der Erkrankung nach beziehungsweise unter Therapie mit Ifosfamid in Standarddosierung auftritt.(2, 111) Ifosfamid ist somit ein relevantes Medikament in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS.(194) Insbesondere bei Patienten mit Synovialsarkomen konnten sehr gute Remissionsraten bei Therapie mit hochdosiertem Ifosfamid dokumentiert werden.(111, 152, 152) Zuletzt wurden von Lee et al.(114) Ergebnisse einer retrospektiven Analyse zur Anwendung von Hochdosis-Ifosfamid in der Zweitlinientherapie von Sarkomen veröffentlicht (allerdings unter Einschluss von Osteo- und Ewingsarkomen). Die resultierenden PFR-Raten nach drei und sechs Monaten lassen auch hier auf eine ausreichende Wirksamkeit dieser Therapieoption schließen.

Dennoch existieren auch nach vielen Jahren intensiver Forschung nach wie vor keine ausreichend belegten Vorgaben sowohl zur Dosierung als auch zur Infusionsdauer von Ifosfamid (Dauerinfusion vs. Kurzinfusion). Ergebnisse von Phase III-Studien zur Anwendung von hochdosiertem Ifosfamid in der Therapie von

Patienten mit Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen sind nicht publiziert. Nichtsdestotrotz findet Ifosfamid in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen auch heute noch sehr häufig Anwendung.

Auch Dacarbazin gehört zu den Substanzen, die in der Therapie von Weichteilsarkomen häufig appliziert werden, wenn ein Rezidiv nach Anthrazyklin-basierter Therapie auftritt. Hier sind die verfügbaren Studienergebnisse ebenfalls insgesamt begrenzt. In einer Arbeit von 1991 zeigte sich eine Ansprechraten von 18%; die PFR nach definierten Zeitpunkten wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt.(18) In den letzten Jahren sind keine neuen Arbeiten zur Monotherapie mit Dacarbazin veröffentlicht worden, mit Ausnahme einer randomisierten Phase II-Studie, in der Dacarbazin als Monotherapie des Standardarms eingesetzt wurde. Die hier dokumentierten PFR-Daten erlauben keine sichere Einordnung der Wirksamkeit, erreichen jedoch Werte, die den durch die Van Glabbeke-Arbeit festgelegten Grenzwerten zur Sicherung der Wirksamkeit sehr nahe kommen. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Dacarbazin-Monotherapie bei insgesamt guter Verträglichkeit in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS weiterhin ihre Berechtigung hat.(49)

Für die Kombinationstherapie mit Dacarbazin und Gemcitabine liegen inzwischen zwei Phase II-Studien vor, die eine ausreichende Wirksamkeit nachweisen.(49, 121) Aus den Tabellen 1-1 und 1-3 lässt sich erkennen, dass Trabectedin die in den letzten zehn Jahren am umfangreichsten evaluierte Substanz in der Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen ist. Dabei werden in den Studien trotz insgesamt sehr niedriger Remissionsraten mit einer Ausnahme (Yovine et al. (209)) stets PFR-Werte erreicht, die eine Wirksamkeit der Substanz im Sinne einer Krankheitsstabilisierung belegen. Die myelotoxische Wirkung der Substanz ist in den Arbeiten stets substantiell, dennoch ist die Rate an Infektionen mit Fieber in der Phase der Zytopenie niedrig. Trabectedin besitzt als einzige Substanz die Zulassung der europäischen Zulassungsbehörden für die Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen und ist somit neben Hochdosis-Ifosfamid und Dacarbazin aktuell der Wirkstoff, der am ehesten als Standard anzusehen ist.

Für alle weiteren untersuchten Wirkstoffe beziehungsweise Wirkstoffkombinationen ist die Datenlage wesentlich weniger eindeutig. Allenfalls Gemcitabine in Kombination mit Docetaxel kann für Patientinnen mit uterinen Leiomyosarkomen in

der Zweitlinientherapie als gut wirksame Therapieoption mit entsprechenden Studienergebnissen angenommen werden.(66, 67)

Darüber hinaus existieren Studien, die für klassische Chemotherapeutika und Zytostatikakombinationen sowie neuere Wirkstoffe eine gute Wirksamkeit annehmen lassen. Grundlage dieser Daten sind jedoch stets – zum Beispiel in der Untersuchung von Panzopanib, Brostallicin oder Trofosfamid – Ergebnisse einzelner Phase II-Studien, so dass die Datenlage für diese Wirkstoffe als noch nicht ausreichend gesichert angenommen werden kann. Weitere randomisierte Untersuchungen, auch an größeren Patientenkollektiven, sind geplant oder bereits in der Durchführung. Ergebnisse dieser Studien liegen noch nicht vor.

Die Mehrzahl der untersuchten Chemotherapeutika zeigt, wie den Tabellen 1-2 und 1-3 zu entnehmen ist, nur unzureichende oder unsichere Wirksamkeit. Zu den hier einzuordnenden Substanzen gehören Gemcitabin und Docetaxel (jeweils als Monotherapie) ebenso wie neue Wirkstoffe wie Gefitinib, Semaxanib oder Bryostatin.

Neben den bisher zusammengefassten Phase II-Studien wurde auch eine Vielzahl an Phase I-Studien, insbesondere zur Anwendbarkeit von Antikörper- und *small molecule*-basierter Therapie refraktärer Sarkome, in den letzten Jahren mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen zumindest in bestimmten Sarkom-Subentitäten durchgeführt. Zu den untersuchten Wirkstoffen gehören *Insulin-like growth factor 1*-Rezeptor (IGF1R)-Inhibitoren (106, 147) ebenso wie *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*-(TRAIL)-Rezeptor-Agonisten (69) und der G1-Phase-Inhibitor Rexin-G (25). Auch hier steht jedoch die Bestätigung der ersten Ergebnisse in größeren Patientenpopulationen noch aus.(183) *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Inhibitoren wurden, in Folge einer in vielen Sarkom-Subentitäten nachweisbaren Dysregulation dieses intrazellulären Signalwegs, ebenfalls in der Therapie von Sarkomen getestet, wobei für Ridaforolimus einige vielversprechende Ergebnisse zu dokumentieren sind.(1) Daraufhin wurde eine Phase III-Studie zur Erhaltungstherapie mit dieser Substanz bei Sarkomen initiiert, deren erste Ergebnisse eine geringgradige Verlängerung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Placebo zeigen.(164)

Aus den vorangegangenen Ausführungen lässt sich erkennen, dass trotz substantieller Fortschritte in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS,

insbesondere durch Definition von PFR-Zielwerten zur sicheren und vergleichbaren Beurteilung von Therapieoptionen und durch Identifikation von Trabectedin als wirksamer Substanz, weiterhin großer Bedarf an alternativen Therapieoptionen besteht.

#### **1.1.4 Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) in der Therapie von Weichteilsarkomen**

Eine Polychemotherapie, die seit einigen Jahren in der Therapie von Anthracyklin-refraktären Weichteilsarkomen zum Einsatz gebracht wird, kombiniert Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE). Es existieren bereits Vorpublikationen zur Wirksamkeit dieses Therapieprotokolls (45), teilweise auch untersucht als Kombinationsbehandlung in Verbindung mit regionaler Hyperthermie (44). Diese Analysen wurden jedoch an relativ kleinen Patientenpopulationen durchgeführt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die positiven Ergebnisse der Vorpublikationen in einer größeren Patientenpopulation zu bestätigen.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.2 (S. 9) erwähnt, stellt die Stickstoff-Lost-Verbindung Ifosfamid eine von insgesamt nur sehr wenigen chemotherapeutischen Substanzen mit erwiesener, jedoch eingeschränkter Wirksamkeit in der Therapie von Weichteilsarkomen dar.(142) Ifosfamid wirkt als alkylierende Substanz DNA-schädigend und verhindert so eine weitere Teilung der Tumorzellen. Carboplatin, ein Platinderivat, das durch Quervernetzung der DNA antineoplastisch wirkt, zeigt als Monotherapie keine relevante Aktivität in der Therapie von Weichteilsarkomen.(56) Auch Etoposid, ein Topoisomerase II-Inhibitor, ist, als Monotherapie verabreicht, unwirksam in der Therapie von Weichteilsarkomen.(37, 90, 115, 189) Die Ergänzung von Ifosfamid um Etoposid ergab in einer Studie von Blair et al. (9) keine der Monotherapie mit Ifosfamid überlegene Ansprechraten, während eine Studie aus dem Jahr 1997 vielversprechende Ergebnisse dieser Kombinationstherapie veröffentlichen konnte.(172)

Bei Kombination der drei hier genannten Wirkstoffe, erstmals von Fields et al. publiziert im Jahr 1994, wird eine relativ hohe Ansprechraten von 20% bei bereits vorbehandelten Weichteilsarkomen berichtet.(45) Darüber hinaus existieren Daten zu Ifosfamid, Cisplatin (anstelle von Carboplatin) und Etoposid in der Therapie von chemonaiven Patienten mit STS, die eine hohe Ansprechraten dokumentieren.(156)

Auch liegen Studien zu ICE (unter Verwendung von Carboplatin) in Kombination mit *Ganzkörperhyperthermie* vor, die eine außergewöhnlich hohe Ansprechrate von 58% bei jedoch geringer Fallzahl (n=13) und nur teilweise vorbehandelten Patienten nahelegen.(205)

Die Arbeit von Fields et al. war Anlass dazu, ICE in geringfügig abweichender Dosierung der Einzelsubstanzen in Kombination mit regionaler Hyperthermie auf Wirksamkeit und Verträglichkeit in der Therapie von STS am Klinikum Großhadern zu testen. In der hieraus resultierenden, 2004 veröffentlichten Analyse waren die Ergebnisse der Therapie mit ICE, in einem Teil der Patienten verabreicht in Kombination mit regionaler Hyperthermie, mit einer Ansprechrate von 20% in 20 bereits vorbehandelten Patienten erneut so vielversprechend (44), dass das Therapieprotokoll weiter Anwendung am Klinikum Großhadern und in assoziierten Therapieeinrichtungen fand. Die generierten Daten sind Grundlage dieser Arbeit.

### **1.1.5 Regionale Hyperthermie (RHT)**

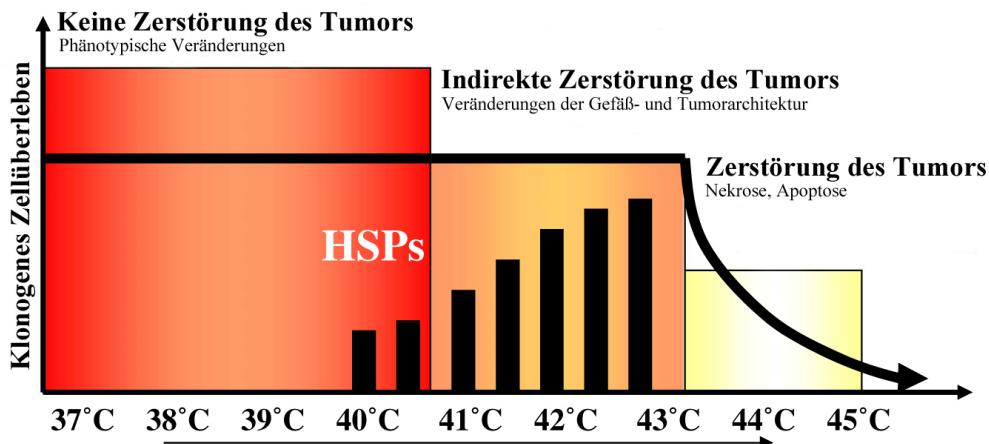
Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirksamkeit von ICE in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS in Verbindung mit regionaler Hyperthermie (RHT). Die Rationale für die Anwendung der regionalen Hyperthermie in Tumorerkrankungen und verfügbare Vorpublikationen zu ihrer Wirksamkeit in STS sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### **1.1.5.1 Grundlagen**

Die Hyperthermie ist ein Therapieverfahren für die kontrollierte Erhöhung der Körpertemperatur, das zur Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt wird. Dabei wird die Temperaturerhöhung entweder durch Verhinderung der Wärmeabgabe des Körpers erreicht oder durch Einstrahlung von Energie von außen. Eine Einstrahlung der Energie erfolgt durch Verwendung von Mikrowellen, Ultraschall oder durch Induktion nach Injektion von magnetischen Nanopartikeln in den Tumor. Ziel ist eine kontrollierte Temperaturerhöhung des Gewebes auf Werte zwischen 40 und 44°C.

Grund der Anwendung von Wärme in der Therapie von Tumorerkrankungen ist die Beobachtung, dass es bei einer Erhöhung der Temperatur in Zellkulturen ab Erreichen einer bestimmten Schwellentemperatur zur Zerstörung der Zellen im Sinne

der Induktion einer Nekrose oder Apoptose kommt. Dabei ist die Schwellentemperatur für jede Zelllinie unterschiedlich (vgl. Abbildung 1-1).(79)



Molekulare Mechanismen	Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen Induktion von Hitzeschockproteinen/Expression von hsp70 auf der Zellmembran	Apoptose/Nekrose
Klinische Anwendung	Thermosensibilisierung für Chemotherapie und/oder Strahlentherapie	

**Abbildung 1-1** Prinzipien der Wirksamkeit der Hyperthermie in der Therapie von Tumorerkrankungen. Bei Temperaturen unterhalb der Schwellentemperatur (40-43 °C) zeigt Hyperthermie keine direkte zytotoxische Wirkung, jedoch kommt es zu Sensibilisierung des Tumors für Chemotherapeutika oder Bestrahlung (modifiziert nach Issels (79)).

Mit einem Anstieg der Temperatur im Milieu kommt es zunächst zu einer Reaktion der Zellen, die als „*stress response*“ bezeichnet wird und die mit der Synthese bestimmter Proteine, sogenannter Hitzeschockproteine (hsp) einhergeht. Inzwischen ist eine ganze Reihe von Hitzeschockproteinen bekannt, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Entsprechend werden die Hitzeschockproteine zum Beispiel als hsp27, hsp70 und hsp90 bezeichnet. Dabei ist hsp70 der Vertreter, dessen Synthese am stärksten im Rahmen der *stress response* induziert wird.(84, 201)

Hitzeschockproteine gewährleisten in ihrer Funktion als *chaperones* die regelrechte Faltung von Proteinen in der Zelle. Eine deutliche Temperaturerhöhung bewirkt intrazellulär eine Störung der Proteininfaltung beziehungsweise Proteindenaturierung, die beim Überschreiten der oben genannten Schwellentemperatur schließlich zur Zerstörung der Zelle führt. Damit wirkt die Synthese von Hitzeschockproteinen den Auswirkungen der Hitze entgegen und vermittelt somit eine sogenannte Thermotoleranz, das heißt, es kommt zu keiner wesentlichen Einschränkung des

klonogenen Überlebens der Zellen *in vitro*, obwohl bereits Effekte der Hitze auf molekularer Ebene festzustellen sind. Bei Überschreiten der Schwellentemperaturen kommt es jedoch zu einer Dekompensation der Ausgleichsmechanismen der Zelle, so dass schließlich eine Nekrose beziehungsweise Apoptose der Zellen eintritt.(79) Tumorzellen und nicht transformierte, normale Körperzellen zeigen keine grundsätzlichen Unterschiede in der Reaktion auf Hitzestress. Aufgrund der chaotischen Vaskularisierung maligner Tumore treten in diesen jedoch Areale auf, die hypoperfundiert sind, was in einer reduzierten Oxygenierung und Veränderungen des pH-Werts im Gewebe hin zu sauren Werten resultiert. Diese Veränderungen bedingen eine verstärkte Empfindlichkeit der Zellen für die Wirkung der Hyperthermieanwendung, was die zytotoxischen Effekte der Hyperthermie nahezu ausschließlich auf Tumorzellen beschränkt.(117, 196)

Neben direkten Schäden an den Tumorzellen kommt es im Rahmen der Anwendung der Hyperthermie jedoch auch zur Sensibilisierung des Tumors für Effekte, die durch Verabreichung einer Chemotherapie oder einer Strahlentherapie vermittelt werden. So führt die Anwendung einer Hyperthermie, zumindest dann, wenn sie lokal im Bereich des Tumors appliziert wird, zu einer vermehrten Durchblutung des Tumorareals und zu einer Störung der Barrierefunktion des Endothels. Dies resultiert in einer relativ vermehrten Freisetzung der Zytostatika im hyperthermierten Areal.(117) Außerdem verstärkt eine gleichzeitige Hyperthermieanwendung die Wirkung einiger Chemotherapeutika. Dieser Effekt wird erfasst durch die Berechnung der sogenannten „*thermal enhancement ratio*“ (TER), die einen Faktor für die Verstärkung der zytotoxischen Wirksamkeit des Zytostatikums unter hyperthermen Bedingungen darstellt. Die TER ist dabei je nach Substanz unterschiedlich und spezifisch für das Therapeutikum.(191) In Tabelle 1-4 werden die TERs für verschiedene Chemotherapeutika dargestellt. Aus den hier zu entnehmenden Werten ist ersichtlich, dass unter Hyperthermieanwendung die zytotoxische Wirkung verschiedener Chemotherapeutika, zum Beispiel Ifosfamid, Cisplatin oder Melphalan, bis zu dreifach verstärkt ist im Vergleich zur Wirkung ohne begleitende Hyperthermie. Andere Substanzen zeigen jedoch keine Wirksamkeitsverstärkung, so zum Beispiel Doxorubicin oder 5-Fluorouracil.

Medikament	Behandlungszeit (Minuten)	TER	
		41,5 °C	43,5 °C
Cisplatin	30	1,48	1,59
Cyclophosphamid	30	2,28	2,74
Ifosfamid	30	1,52	-
	90	3,60	-
Melphalan	30	3,60	-
BCNU	30	2,27	2,71
Bleomycin	30	1,24	1,65
Mitomycin C	30	1,05	-
5-Fluorouracil	30	1,0	1,0
Doxorubicin	30	1,0	1,0

**Tabelle 1-4** TERs verschiedener Zytostatika (modifiziert nach Urano (191) und Issels (79))

Bei Kombination von Hyperthermie und Strahlentherapie kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Verstärkung der Wirksamkeit der Strahlentherapie. Involvierte Mechanismen sind die verbesserte Oxygenierung von Tumorgewebe unter Hyperthermie(178) und die Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen, was die Effekte von strahleninduzierten DNA-Schäden verstärkt.(35)

### 1.1.5.2 Technik

Wie bereits erwähnt, existieren unterschiedliche Methoden zur Erhöhung der Körpertemperatur von Tumorpatienten. Auf Methoden der Ganzkörperhyperthermie soll hier nicht eingegangen werden, da sie für die in dieser Arbeit analysierten Patienten nicht zur Anwendung kommen.

Bei Anwendung von Nicht-Ganzkörperhyperthermie unterscheidet man regionale und lokale Verfahren. Regionale Verfahren haben zum Ziel, größere Areale des Körpers zu erwärmen (zum Beispiel das Abdomen), während lokale Verfahren nahezu ausschließlich in der Therapie von Extremitätentumoren mit relativ oberflächlicher Lage des Tumors zur Anwendung kommen.

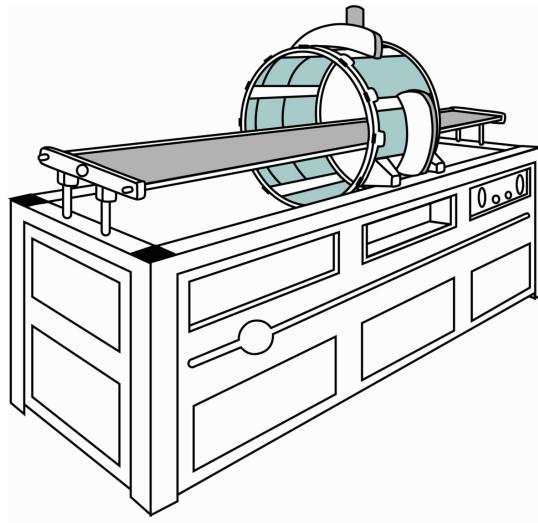
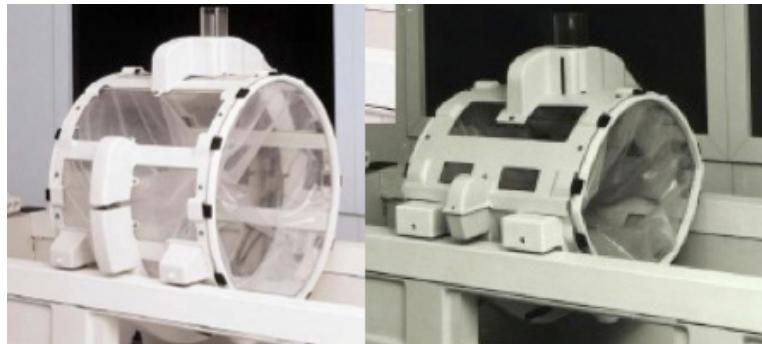


Abbildung 1-2      BSD-2000-System

Durch Generierung eines elektromagnetischen Radiofrequenz-Feldes (Frequenzbereich 60-110 MHz) mittels paarweise angeordneter Antennen wird im Hyperthermie-System BSD 2000, das bei den hier untersuchten Patienten zur Anwendung kam, Energie in den Körper des Patienten eingestrahlt, wodurch regional Wärme entsteht. Dabei wird durch die Steuerung der Leistung jedes Antennenpaares derjenige Bereich festgelegt, in dem das Maximum der Leistung generiert wird.(139) Zur Anwendung wird der Patient in einem sogenannten Applikator platziert, der je nach Lokalisation des Tumors ausgewählt wird. Die Applikatoren unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Antennen, was wiederum Einfluss auf die Positionierung des Temperaturerhöhungsareals hat. Eine schematische Darstellung eines BSD 2000-Systems ist Abbildung 1-2 zu entnehmen; die Abbildung 1-3 zeigt verschiedene Applikatoren zur Anwendung in der regionalen Hyperthermie. Einen sogenannten Spiralapplikator, wie er zur Hyperthermiebehandlung von Tumoren im Bereich der Extremitäten zur Anwendung kommt, zeigt Abbildung 1-4.



**Abbildung 1-3** Sigma 60- (links) und SigmaEye-Applikator (rechts)



**Abbildung 1-4** Spiral-Applikator

Üblicherweise wird eine regionale Hyperthermie über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt, wobei die ersten 30 Minuten der Erwärmung dienen. Nach Beendigung der Aufwärmphase folgt dann die sogenannte „therapeutische Stunde“.

Die RHT-Anwendung wurde entsprechend publizierter und standardisierter Qualitätsstandards durchgeführt, um reproduzierbare Behandlungsergebnisse zu erreichen.(108) Dabei erfolgte eine Überwachung der erreichten Temperaturen mittels Kathetern, die direkt im Tumor platziert werden, zum Beispiel nach CT-gesteuerter Anlage der Katheter. Temperaturmessungen im Tumor mittels operativ oder CT-gesteuert eingebrachter Thermosonden sind nur einer Minderheit der untersuchten Patienten zumutbar, und assoziiert mit einer relativ hohen Komplikationsrate.(192, 208) Deshalb werden bei der Mehrzahl der Patienten ausschließlich endoluminale Temperaturmessungen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden (36, 161, 208), dass eine endoluminale Temperaturmessung insbesondere bei Tumoren des kleinen Beckens ausreichend ist, um die Wirksamkeit einer Hyperthermiebehandlung im Sinne einer ausreichenden Temperaturerhöhung zu überwachen. Die Katheter erlauben die Temperaturbestimmung über ihre gesamte Länge. Es wird also eine Temperaturmatrix erzeugt, die den zeitlichen

Ablauf der Temperaturentwicklung an einer Vielzahl von Orten widerspiegelt. Aus diesen Daten lassen sich Indizes errechnen, die eine Einordnung der Qualität der Hyperthermiebehandlung erlauben. Üblicherweise werden die maximale und die minimale erreichte Temperatur ( $T_{\max}$  bzw.  $T_{\min}$ ) dokumentiert und darüber hinaus die Temperaturen, die in 20, 50 und 90% des Tumor(-bettes) mindestens erreicht wurden ( $T_{20}$ ,  $T_{50}$  und  $T_{90}$ ). Ein komplexeres Konzept zur Beurteilung der Qualität einer RHT-Behandlung ist die „*thermal isoeffect dose*“ (TID), die die erreichten Temperaturen und die Dauer der Temperaturerhöhung in äquivalente Minuten bei 43 °C umrechnet.(117) Diese Daten lassen nicht nur Rückschlüsse auf die erreichten Temperaturen zu, sondern ermöglichen auch eine Beurteilung der Homogenität des Temperaturanstieges.(190)

#### **1.1.5.3      *Regionale Hyperthermie in der Therapie von STS***

Inzwischen existiert eine ganze Reihe an Veröffentlichungen, die sich mit der Wirksamkeit der regionalen Hyperthermie in der Therapie von Weichteilsarkomen beschäftigen – beginnend mit einer Arbeit von Issels et al. (78) aus dem Jahr 1990, in der unter Behandlung mit Ifosfamid und Etoposid in Kombination mit regionaler Hyperthermie eine Ansprechratenrate von 37% bei überwiegend bereits vorbehandelten Patienten gezeigt werden konnte. Als Hinweis auf den Beitrag, den die RHT an diesen Behandlungsergebnissen hatte, konnte in einer retrospektiven Analyse dieser Patientenpopulation gezeigt werden, dass die im Tumor erreichten Temperaturen bei Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie zeigten, signifikant höher waren als in den Patienten, bei denen keine Remission unter Behandlung zu verzeichnen war. In der Folge wurden zwei Phase II-Studien initiiert, die sich mit der neoadjuvanten Chemotherapie in Kombination mit RHT befassten. Eine Polychemotherapie, bestehend aus Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin (EIA) wurde in Kombination mit RHT in Patienten mit Hochrisikosarkomen ohne Nachweis einer Metastasierung über vier Zyklen präoperativ verabreicht. Nach Resektion und eventueller Bestrahlung wurden dann weitere vier Zyklen der Kombinationstherapie gegeben. Für die erste dieser Studien (RHT-91) war bei Untersuchung der Langzeitergebnisse eine 5-Jahres-Überlebensrate von 49% zu dokumentieren, eine bei Vergleich mit historischen Kontrollen hohe Überlebensrate, insbesondere in Anbetracht des relativ hohen Anteils an Patienten mit Sarkomen des Körperstamms, die üblicherweise eine

schlechtere Prognose haben als Sarkome im Bereich der Extremitäten, und Patienten mit rezidivierter Erkrankung in dieser Studie.(76) Bei der zweiten Studie (RHT-95) wurden die postoperativen Chemotherapiezyklen ohne RHT verabreicht. Hierunter zeigte sich, als erneuter Hinweis auf die Relevanz der RHT in der lokalen Tumorkontrolle, ein im Vergleich zur RHT-91-Kohorte signifikant schlechteres lokalprogressionsfreies Überleben, bei jedoch nicht signifikant unterschiedlichem fernprogressionsfreiem Überleben oder Gesamtüberleben.(202)

Diese Ergebnisse führten zur Initiierung einer großen randomisierten Phase III-Studie, in die ab 1997 insgesamt 341 Patienten eingeschlossen werden konnten. Hier wurde das oben bereits genannte Therapieschema einer neoadjuvanten Chemotherapie in Kombination mit regionaler Hyperthermie, unter Fortsetzung der Hyperthermiebehandlungen postoperativ beziehungsweise nach Abschluss der Bestrahlung, mit der gleichen, weiterhin EIA-basierten Chemotherapie ohne parallele RHT verglichen, um den Effekt der RHT am Gesamtbehandlungsergebnis einordnen zu können. Die Ergebnisse wurden im Jahr 2010 veröffentlicht (77) und zeigen ein signifikant verbessertes lokalprogressionsfreies Überleben, ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben und eine signifikant auf mehr als das doppelte verbesserte Ansprechraten von 28,8% für die Patienten, die in Kombination mit RHT behandelt wurden. Der Anteil an Patienten mit früher Krankheitsprogression<sup>1</sup> ist in der Patientengruppe, die mit der Kombinationsbehandlung therapiert wurde, signifikant niedriger.

Während das Gesamtüberleben für die *intention-to-treat*-Population in beiden Therapiearmen vergleichbar ist, lässt sich ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben für jene Patienten nachweisen, die in Kombination mit RHT behandelt wurden und die die ersten vier Therapiezyklen komplett erhalten (*per-protocol-induction*-Population). Insbesondere Patienten mit einer Tumormanifestation im Bereich des Körperstamms profitieren von der Kombinationsbehandlung (LPFS nach zwei Jahren 64 % vs. 45 % für EIA+RHT beziehungsweise EIA), ebenso wie Patienten, bei denen nur eine R1 oder R2-Resektion durchführbar oder keine Strahlentherapie möglich ist. Allerdings finden sich zwischen diesen Subpopulationen sicherlich Überschneidungen, da Patienten mit retroperitonealer Tumorlokalisierung

---

<sup>1</sup> definiert als Krankheitsprogression noch vor Operation bzw. unmittelbar vor Start der postoperativen [Thermo-]Chemotherapie

mit höherer Wahrscheinlichkeit keiner R0-Resektion oder Strahlentherapie zugänglich sind.

In Folge der Veröffentlichung dieser Studie fand die Kombinationsbehandlung Eingang in die 2010 neu aufgelegten Richtlinien der *European Society for Medical Oncology* (ESMO) zur Behandlung von Weichteilsarkomen. Die Therapie in Kombination mit RHT wurde hier als zu erwägende Therapiealternative in Patienten mit Infiltration regionaler Lymphknoten und in der adjuvanten Therapie von Hochrisikosarkomen genannt.(23) In der Erstlinientherapie von Patienten mit Hochrisiko-Weichteilsarkom ist die Therapie in Kombination mit RHT inzwischen also als Standard anzusehen. Dies kann für die Therapie von Patienten mit weiter fortgeschrittenen STS-Erkrankungen noch nicht gelten. Dennoch wurden die Patienten, deren Daten in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, auch in Kombination mit RHT behandelt. Der Einfluss der Hyperthermie kann durch das Fehlen eines Kontrollarmes mit Patienten, die nicht in Kombination mit RHT behandelt wurden, nicht mit Sicherheit ausgemacht werden. Dennoch soll anhand indirekter Hinweise versucht werden, den Anteil der RHT am Gesamtbehandlungserfolg abzuschätzen.

## 1.2 Natürliche Killerzellen

In Ergänzung zur Analyse klinischer Ergebnisse von Patienten mit STS wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Immunkompetenz von STS-Patienten durchgeführt. Im Speziellen wurde die Funktion natürlicher Killerzellen dieser Patienten betrachtet. Diese Funktion ist für Tumorpatienten deshalb von Bedeutung, weil diese Zellen eine entscheidenden Rolle in der Kontrolle entarteter Zellen im menschlichen Körper spielen und als Teil des angeborenen Immunsystems transformierte Zellen weitgehend unabhängig von T- und B-Lymphozyten erkennen und selektiv zerstören können. Zunächst werden einige Grundlagen zur Funktion der natürlichen Killerzellen vorgestellt.

### 1.2.1 Grundlagen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bilden eine Lymphozyten-Subpopulation, die morphologisch meist großen, granulierten Lymphozyten (*large granular lymphocytes*, LGL) entspricht. Dieses Aussehen ist jedoch nicht spezifisch für NK-Zellen, sie können auch die Morphologie normaler kleinzelliger Lymphozyten im Blutausstrich

aufweisen.(184) Immunphänotypisch werden sie definiert durch die Abwesenheit von CD3 und den Nachweis von CD16 und CD56 auf ihrer Zelloberfläche.(173) Sie machen etwa 10-15% aller Lymphozyten im peripheren Blut aus und finden sich auch in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben wie Leber oder Peritoneum. Nach Aktivierung verlassen sie das Blut und migrieren zu infiziertem oder transformiertem Gewebe.(184) NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Infektionen (insbesondere viraler Natur) und Neoplasien durch das Immunsystem.

### **1.2.2 NK-Zellen in der Immunosurveillance von malignen Erkrankungen**

NK-Zellen sind in der Lage, maligne Zellen unabhängig von anderen immunkompetenten Zellen (insbesondere T-Lymphozyten) zu erkennen und zu lysieren. Dabei ist dieser Mechanismus nicht nur von großer Bedeutung in der Kontrolle der Entartung von Zellen eines Primärtumors, sondern spielt auch eine maßgebliche Rolle in der Elimination zirkulierender Tumorzellen und somit in der Verhinderung einer Metastasierung.(204) So konnten Barlozzari et al. bereits 1983 zeigen, dass eine Inaktivierung von NK-Zellen mittels Verabreichung NK-spezifischer Antikörper zu unkontrolliertem Tumorwachstum nach Injektion von Tumorzellen in immuninkompetenten Ratten führt. Die Gabe von aufgereinigten NK-Zellen vor Injektion der Tumorzellen resultierte in einer signifikant verbesserten Tumorkontrolle und somit in der Verhinderung einer Metastasierung in den Tieren.(4) In der Arbeit von Stangl et al. konnte durch wiederholte Gaben von IL-2/TKD-aktivierten NK-Zellen eine vollständige Eradikation von Pankreaskarzinom-Zellen und eine Verhinderung ihrer Metastasierung in Mäusen erreicht werden.(180)

In einer großen prospektiven Längsschnittstudie konnte zudem eine reduzierte Aktivität der NK-Zellen im peripheren Blut mit einer erhöhten Inzidenz an Krebserkrankungen korreliert werden.(74) Darüber hinaus zeigte sich in einer weiteren Studie eine Korrelation des Grades der Infiltration von Colonkarzinomen durch NK-Zellen mit dem Gesamtüberleben – eine hochgradige Infiltration des Tumors durch NK-Zellen ging hier mit einem besseren Gesamt- und ereignisfreien Überleben einher.(27) All diese Ergebnisse geben Hinweise auf die große Bedeutung, die NK-Zellen in der Verhinderung der Entstehung von

Krebserkrankungen beziehungsweise in deren Kontrolle im menschlichen Körper zukommt.

### **1.2.3 Die konstitutionelle Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten**

Veränderungen der lytischen Funktion von NK-Zellen im peripheren Blut sind für Patienten bekannt, die unter einer Reihe von Erkrankungen leiden. So sind Patienten, die aufgrund von Depressionen behandelt werden, erniedrigte NK-Zellzahlen beziehungsweise eine erniedrigte Aktivität der NK-Zellen nachweisbar.(204) Dies mag insbesondere für Patienten mit Krebserkrankungen eine Rolle spielen, da bei ihnen ein hohes Maß an psychosozialer Belastung in Folge der Diagnosestellung zu erwarten ist.(122) Darüber hinaus führen Noxen wie Zigarettenrauch (43) oder bekannte Risikofaktoren wie Adipositas zu einer Reduktion der lytischen Funktion von NK-Zellen.(144)

Besonders ausgeprägt und häufig scheint eine Reduktion der lytischen Aktivität von NK-Zellen bei Patienten zu sein, die unter malignen Erkrankungen leiden. Teilweise ist die Reduktion der Aktivität in weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien ausgeprägter als bei Patienten mit weniger weit fortgeschrittenem Tumorstadium. Beispiele hierfür sind Patienten mit Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphomen (96), Magenkarzinomen (186), Mammakarzinomen (97), Ovarialkarzinomen (122), malignen Melanomen (98), Kopf-Hals-Karzinomen (14) und einer Reihe hämatologischer Neoplasien.(88, 124) Die Reduktion der NK-Zell-Aktivität scheint zumindest teilweise bedingt durch Mechanismen von Tumorzellen, die einen „Immun-Escape“, also die Umgehung einer Abwehr der transformierten Zellen durch Immunzellen des Patienten, ermöglichen. Es ist davon auszugehen, dass Patienten mit dieser reduzierten NK-Zell-Aktivität eine höhere Wahrscheinlichkeit einer metastatischen Aussaat der Erkrankung haben.(204)

Die Gründe für diese scheinbar konstitutionelle Reduktion der lytischen Aktivität von NK-Zellen bei Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen sind noch nicht abschließend geklärt. Es erscheint möglich, dass eine durch Tumorzellen initiierte vermehrte Produktion von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )(62), *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF $\beta$ )(186) und Prostaglandin E2 (5) zu diesem Phänomen beiträgt. Darüber hinaus sind bei den entsprechenden NK-Zellen

Veränderungen ihrer Rezeptor-Ausstattung festzustellen, die zum Beispiel aktivierende Rezeptoren wie NKG2D oder CD161 betreffen.(98). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in NK-Zellen von Tumopatienten der Gehalt an  $\xi$ -Ketten, die relevant für die Funktion aktivierender NK-Zell-Rezeptoren sind, reduziert ist.(32)

#### 1.2.4 NK-Zell-Aktivierung

Die Mechanismen, die zu einer Aktivierung der NK-Zellen und nachfolgenden Zerstörung der Zielzellen führen, sind komplex. Diese Zerstörung geschieht entweder durch Freisetzung von Proteinen, die die Integrität der Zellmembran stören (Perforin, Granzyme) oder durch Expression von Liganden auf NK-Zellen, die nach Bindung an der Zielzelle zur Apoptose der Zelle führen. Die wichtigsten Vertreter dieser Liganden sind *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und *Fas ligand* (FasL).(177)

Eine Aktivierung der lytischen Aktivität der NK-Zellen wird dabei durch das Wechselspiel beziehungsweise die Balance zwischen einer Reihe aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren und ihrer Liganden auf den Zielzellen erreicht. Dieses komplexe und immer noch nicht vollständig verstandene Wechselspiel ermöglicht eine Erkennung transformierter Zellen unabhängig von Zellen der adaptiven Immunabwehr, das heißt, es muss keine Sensibilisierung der NK-Zellen gegen solche Zellen stattfinden. Die Fähigkeit, transformierte Zellen zu erkennen, ist NK-Zellen also immanent. NK-Zellen nutzen verschiedene Rezeptoren, um Veränderungen an der Zelloberfläche zu erkennen, die mit einer malignen Transformation verknüpft sein können. Daneben existieren Rezeptoren, die bei Aktivierung, zum Beispiel durch physiologisch exprimierte Antigene auf humanen Zellen, inhibitorisch auf die lytische Aktivität von NK-Zellen wirken. Schlägt die „Summe“ dieser aktivierenden und inhibierenden Informationen auf die Seite der Aktivierung, kommt es zur Ausschüttung der Effektorproteine und in der Folge zur Lyse der Zielzelle.(71, 109)

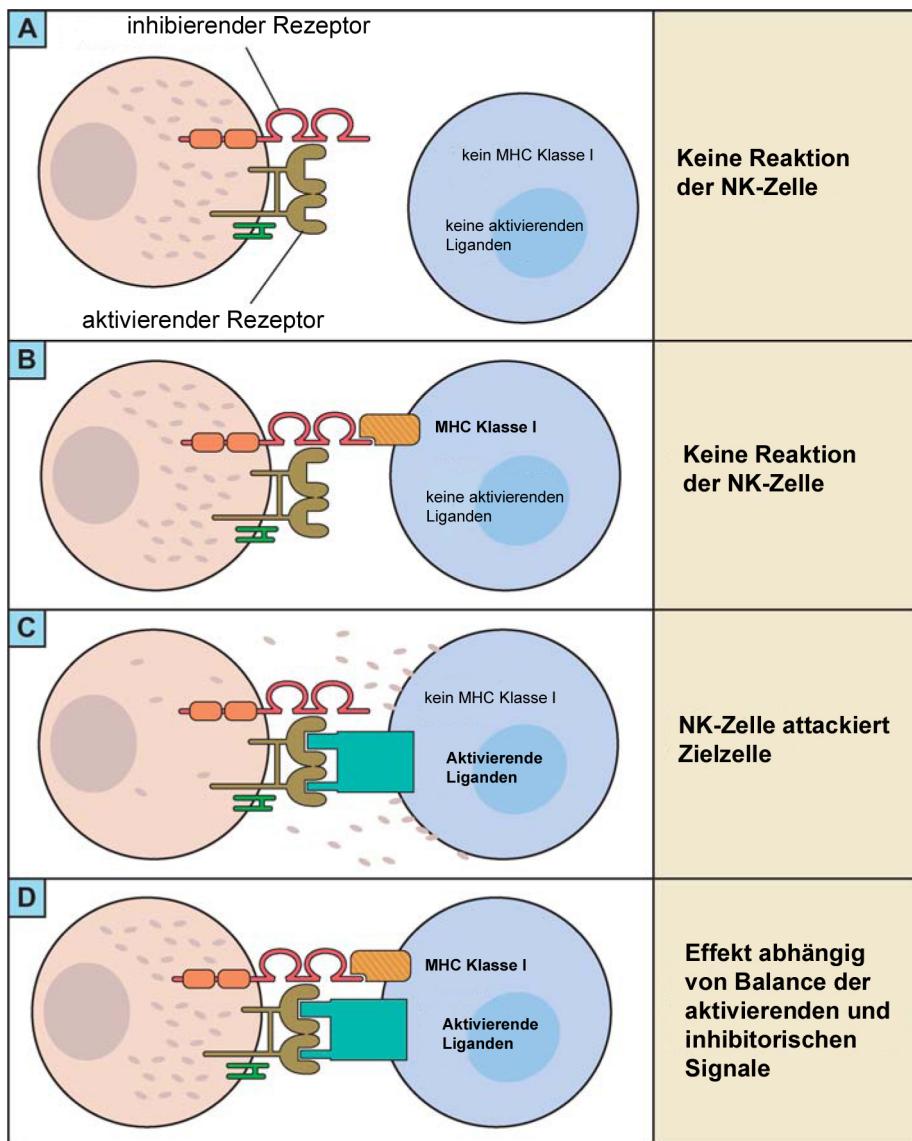
Die wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen sind die sogenannten *killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs) sowie CD94/NKG2A, die überwiegend humanes Leukozyten-Antigen (HLA; *major histocompatibility complex*, MHC Klasse I) oder HLA-E auf den Zielzellen erkennen. Werden also MHC-Moleküle der Klasse I auf der Zielzelle exprimiert, schützt dies die Zelle in den meisten Fällen vor einer NK-

vermittelten Lyse. Im Rahmen der malignen Entartung der Zellen kommt es jedoch nahezu immer zu einer Veränderung des MHC I-Gehaltes der Zellmembran.(51) Dabei können NK-Zellen aufgrund der differenzierten Expression unterschiedlicher KIRs auch den Verlust einzelner MHC-Allele erkennen.(131) Damit nimmt der inhibitorische Einfluss über die KIRs ab und es kommt zu einem Überwiegen aktivierender Signale (*missing-self*-Hypothese, vgl. Abbildung 1-5).(89)

Häufig ist das Ausbleiben der inhibitorischen Signale jedoch nicht ausreichend, um eine Aktivierung der lytischen NK-Funktion zu erreichen.(109) Zusätzlich werden aktivierende Signale benötigt, die über verschiedene Rezeptorsysteme vermittelt werden. Neben einzelnen aktivierenden KIRs sind die wichtigsten hier zu nennenden Rezeptorsysteme NKG2D und die *Natural cytotoxicity receptors* (NCR) NKp30, NKp44 und NKp46. Die Liganden des NKG2D-Rezeptors sind, im Gegensatz zu vielen anderen inzwischen bekannten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, identifiziert und werden als *MHC class I chain-related protein A/B* (MICA bzw. MICB) bezeichnet. Weitere von NKG2D erkannte Liganden entstammen der *UL16-binding proteins* (ULBP)-Familie. Diese Liganden werden auf einer Reihe von Tumorzelllinien vor allem epithelialen Ursprungs exprimiert (181) und können so eine NK-Zell-vermittelte Lyse dieser Zellen auslösen.

Weniger klar identifiziert sind die Liganden der NCRs. NKp30 und NKp46 werden konstitutionell auch von ruhenden, nicht aktivierten NK-Zellen exprimiert, während NKp44 nur auf durch Interleukin 2 (IL-2) aktvierten NK-Zellen nachweisbar ist. Bisher identifizierte Liganden sind hauptsächlich virale Agglutinine.(173) Welche Liganden an der durch NCRs vermittelten Lyse von Tumorzellen beteiligt sind, ist nicht bekannt.(131)

Relevant sind die vorangegangenen Ausführungen für diese Arbeit vor allem deshalb, weil als Korrelat für die NK-Zell-Aktivität die lytische Funktion der NK-Zellen bei Weichteilsarkompatienten an einer erythroleukämischen Zelllinie untersucht werden soll. Diese Zelllinie, sogenannte K562-Zellen, sind ein klassisches Target für NK-Zellen, da ihnen die Expression von MHC I-Molekülen fehlt und darüber hinaus hsp70 auf den Zellen exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.2.6, S. 33). Insofern fehlt der Zelllinie einerseits ein inhibitorisches Signal, andererseits exprimiert sie einen aktivierenden Liganden, so dass es zur effektiven Lyse der K562-Zellen durch NK-Zellen kommt.



**Abbildung 1-5** NK-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus der Zielzelle. Bei fehlender MHC-I-Expression auf der Zielzelle sind häufig weitere aktivierende Liganden zur Initierung einer zytotoxischen Wirkung der NK-Zelle erforderlich. Exprimiert die Zielzelle neben aktivierenden Liganden auch MHC-I, entscheidet das Gleichgewicht aus inhibierenden und aktivierenden Liganden über eine Aktivierung der NK-Zelle (modifiziert nach Lanier (109)).

Neben der von der Funktion des adaptiven Immunsystems weitgehend unabhängigen lytischen Funktion der NK-Zellen (184) beeinflussen NK-Zellen zum Beispiel durch Ausschüttung von Zytokinen oder durch Interaktion mit antigen-präsentierenden Zellen auch das adaptive Immunsystem.(85, 130)

### 1.2.5 Stimulation der NK-Zell-Funktion durch IL-2

Im Rahmen dieser Arbeit soll nicht nur die Aktivität der direkt aus Patientenblut isolierten NK-Zellen bestimmt werden – also die unstimulierte NK-Zell-Aktivität – ,

darüber hinaus werden auch Stimulationsassays durchgeführt, um einen möglichen Weg der Augmentation der NK-Zell-Aktivität aufzuzeigen und den Umfang der möglichen Aktivitätssteigerung abschätzen zu können. Hierzu wird Interleukin 2 (IL-2) eingesetzt. Bei IL-2 handelt es sich um ein Peptidhormon, das insbesondere von T-Helfer-Zellen im Rahmen der Immunantwort auf verschiedene Noxen ausgeschüttet wird und das eine Reihe immunkompetenter Zellen aktiviert, unter anderem B- und T-Lymphozyten, aber auch NK-Zellen.(169) NK-Zellen proliferieren nach Inkubation mit IL-2 und zeigen eine signifikante Zunahme der zytotoxischen Aktivität pro Einzelzelle. Dies geht einher mit Veränderungen der Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D oder CD16.(99) Außerdem zeigen NK-Zellen nach Inkubation mit IL-2 eine Zunahme der Expression des aktivierenden Rezeptors NKp44, der auf ruhenden NK-Zellen nicht exprimiert wird (33, 91), und eine Zunahme des Gehalts an Perforin.(212)

Ruhende, also nicht mittels Zytokinen wie IL-2 aktivierte, NK-Zellen zeigen zytotoxische Aktivität nur gegen bestimmte Tumorzelllinien und können in einer Reihe von Tumorzellen keine Lyse induzieren. Nach Inkubation mit IL-2 erweitert sich das Spektrum der durch diese NK-Zellen lysierten Tumorzelllinien; die so generierten Zellen werden als *lymphokine activated killer cells* (LAK) bezeichnet.(169)

### **1.2.6 Beeinflussbarkeit der NK-Zell-Aktivität durch Hyperthermie**

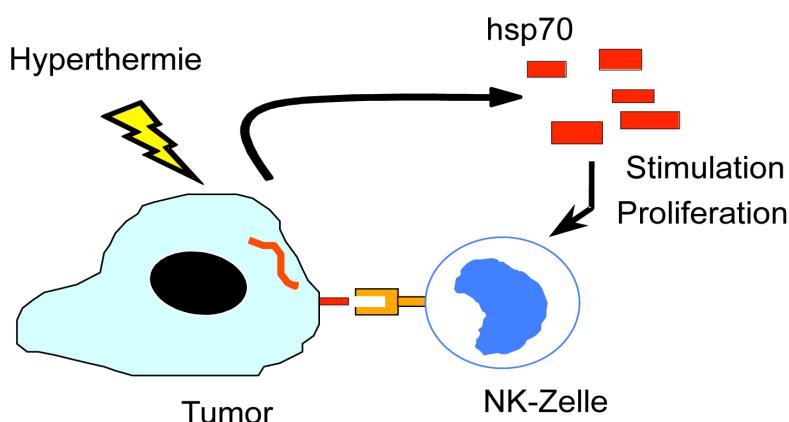
Ergebnisse zum Einfluss von Hyperthermie auf die Aktivität der NK-Zellen *in vitro* und *in vivo* sind in begrenztem Umfang in den letzten Jahrzehnten publiziert worden. In einem Fallbericht aus dem Jahr 1982 berichten Zänker und Lange von einem ausgeprägten Anstieg der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen nach Durchführung einer Ganzkörperhyperthermiebehandlung in einem Patienten mit Ewing-Sarkom.(211) In anderen Arbeiten war eine Zunahme der Zytotoxizität zum Beispiel unter Anwendung der hyperthermen Extremitäten-Perfusion (140) oder unter Anwendung der transrektaLEN Prostatahyperthermie zu beobachten.(187)

Präklinische Daten zeigen jedoch kein eindeutiges Bild: in einigen Studien konnte unter Hyperthermie eine Zunahme der NK-Zell-Aktivität *in vitro* und im Mausmodell nachgewiesen werden (46, 151), während andere Studien keinen solchen Effekt belegen konnten.(3, 93, 143) In der Arbeit von Dayanc et al. (31) werden

unterschiedliche Mechanismen zur Verstärkung der NK-Zell-Aktivität unter Hyperthermie diskutiert. Einerseits scheint eine Temperaturerhöhung Einfluss auf die Membranlokalisation von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D zu haben, andererseits bewirkt eine Hyperthermiebehandlung unter Umständen auch eine Hochregulation der MICA-Expression auf Tumorzellen, was als unabhängiges aktivierendes Signal zu sehen ist.

Eine weitere Struktur, deren aktivierende Wirkung auf die lytische Funktion von NK-Zellen in verschiedenen Publikationen nachgewiesen werden konnte, ist das bereits weiter oben erwähnte Hitzeschockprotein hsp70. Da es sich um eine Struktur handelt, deren Expression offensichtlich in Abhängigkeit von der Temperatur des Milieus variiert, sollen die hierzu veröffentlichten Daten im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Multhoff und Kollegen konnten nachweisen, dass hsp70 nicht nur intrazellulär zu finden ist, sondern dass Tumorzellen im Gegensatz zu nicht transformierten, normalen humanen Zellen das Protein auch auf ihrer Zellmembran exprimieren.(135) Diese Expression ist bislang nur unzureichend verstanden; insbesondere sind die Mechanismen des Transports von hsp70 an die Zelloberfläche bislang nicht erklärt. Globotriaosylceramid (Gb3), ein Glycolipid, scheint an der Expression des Hitzeschockproteins auf der Zelloberfläche beteiligt zu sein.(53)



**Abbildung 1-6** Einfluss der Hyperthermie auf die NK-Zellaktivierung. Erhöhte Temperaturen führen zur Zunahme der hsp70-Expression auf Tumorzellen. Hsp70 ist Ligand aktivierender NK-Zell-Rezeptoren. Im Rahmen der Tumorbehandlung kommt es zum Zerfall von Tumorzellen. Das dabei freigesetzte hsp70 wirkt ebenfalls aktivierend auf NK-Zellen.

Es konnte in Folge dieser Beobachtungen auch dokumentiert werden, dass hsp70 als Trigger für die lytische Funktion der NK-Zellen wirken kann. Dabei wurde gezeigt,

dass im Rahmen einer Hyperthermieanwendung die Expression von hsp70 auf bestimmten Tumorzelllinien zunimmt und diese Zunahme der Expression mit einer vermehrten Lyse durch NK-Zellen einhergeht. Diese verstärkte Lyse ist *nicht* durch eine ebenfalls beobachtete transiente Abnahme der MHC-Expression zu erklären, sondern mit der hsp70-Expression assoziiert (siehe Abbildung 1-6).(134)

Die vermehrte intrazelluläre Synthese von hsp70 in hyperthermierten Körpergeweben ist Teil der universellen Antwort aller Körperzellen auf Hitzestress(146). Die hitzeinduzierte Expression von hsp70 auf der Zelloberfläche ist aber nur in transformierten Zellen nachweisbar und wurde für verschiedene Tumorentitäten berichtet, insbesondere auch für Osteosarkom- und Ewing-Sarkom-Zelllinien sowie bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen.(135, 159)

In der weiteren Erforschung der Aktivierung von NK-Zellen durch hsp70 konnte ein Polypeptid, bestehend aus 14 Aminosäuren, als der signifikante Bestandteil der hsp70-Aminosäuresequenz identifiziert werden, der zur Aktivierung der NK-Zellen führt. Dieses Oligopeptid wird als TKD bezeichnet (137) und wurde in verschiedenen Publikationen zur Stimulation der NK-Zell-Aktivität eingesetzt, weshalb es auch im Rahmen der Stimulationsassays in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

Eine Hyperthermieanwendung führt *in vitro* also einerseits zu einem intrazellulären Anstieg des hsp70-Gehalts, was durch die *chaperone*-Funktion des Hitzeschockproteins zur Vermittlung einer Thermotoleranz führt, andererseits macht die Anwendung die Zellen durch eine vermehrte Expression von hsp70 an der Zelloberfläche suszeptibler für eine NK-Zell-vermittelte Lyse der Zelle. Welcher der genannten Effekte für die klinische Anwendung der Hyperthermie eine größere Rolle spielt, ist nicht abschließend geklärt.

Ob sich ein Einfluss der Hyperthermieanwendung auf die Aktivität der NK-Zellen in Patienten nachweisen lässt, die aufgrund eines Weichteilsarkoms mit ICE in Kombination mit RHT behandelt werden, ist eine der Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen.

## Einleitung

## 2 Fragestellungen

Diese Arbeit befasst sich mit mehreren Teilbereichen der antineoplastischen Therapie bei Patienten, die aufgrund eines Weichteilsarkoms behandelt werden:

- Einerseits werden klinische Ergebnisse der Therapie von Patienten mit Weichteilsarkomen untersucht; im Speziellen Ergebnisse der Therapie mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie;
- Darüber hinaus werden Fragestellungen zur Immunologie bei Patienten mit Weichteilsarkomen bearbeitet; im Speziellen Fragen nach der Aktivität von Natürlichen Killerzellen bei diesen Patienten.

Für beide Teilbereiche der Arbeit sollen im Folgenden die bearbeiteten Fragestellungen und die zugrundeliegenden Hypothesen erläutert werden.

### 2.1 ***ICE + RHT in der Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Weichteilsarkomen***

Eine Standardtherapie für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Weichteilsarkomen, bei denen es zu einem Versagen der Erstlinientherapie gekommen ist, ist, wie oben dargestellt, nach wie vor nicht definiert. ICE in Kombination mit RHT zeigt in Vorpublikationen vielversprechende Ergebnisse in diesen Fällen.(44)

#### 2.1.1 **Fragestellungen**

Die Hauptfragestellung, die hierzu beantwortet soll, lautet demnach:

*Ist ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie eine wirksame Therapieoption in der Zweitlinientherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Weichteilsarkom?*

Diese Frage soll durch Berechnung der Häufigkeit eines bildgebenden Ansprechens und durch Erfassung der Zeit bis zur erneuten Progression beantwortet werden. Als relevante Größen für die Wirksamkeit einer Zweitlinientherapie wird darüber hinaus die PFR nach drei und sechs Monaten berechnet. Außerdem wird das Gesamtüberleben der behandelten Patienten im Vergleich zu Vorwerten, die aus der Literatur bekannt sind, bewertet.

Darüber hinaus sollen folgende weiterführende Fragen beantwortet werden:

- Wie nebenwirkungsreich ist das genannte Therapieschema? Wie häufig tritt Fieber in der Neutropenie nach Therapiedurchführung auf? Sind therapieassoziierte Todesfälle zu dokumentieren?
- Wie häufig ist eine Dosisreduktion im Laufe der Therapie erforderlich?
- Welche Temperaturen können im hyperthermierten Areal erreicht werden?
- Ergeben sich Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens, der Zeit bis zur Progredienz der Erkrankung und des Gesamtüberlebens bei Patienten, die bereits bei Therapiestart eine Fernmetastasierung aufwiesen, und Patienten, die ausschließlich eine lokal fortgeschrittene Erkrankung bei Therapiestart aufweisen?
- Sind Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit der Therapie bei Patienten mit mäßig (G2) oder schlecht differenzierten (G3) Weichteilsarkomen festzustellen?
- Findet sich ein Unterschied im Gesamt- oder progressionsfreien Überleben zwischen den Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie zeigen und den Patienten, bei denen ein solches Ansprechen nicht nachweisbar war?
- Sind histologische Subentitäten zu identifizieren, die besonders gut auf die Therapie mit ICE + RHT ansprechen?

### 2.1.2 Hypothese

Basierend auf Vorpublikationen (siehe Abschnitt 1.1.4, S. 18) wurde folgende Hypothese generiert:

*ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie ist eine wirksame Therapieoption in der Zweitlinientherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Weichteilsarkom. Eine Wirksamkeit wird entsprechend der Vorarbeiten zur Beurteilung von Therapieprotokollen bei Weichteilsarkomen (siehe Abschnitt 1.1.3.1, S. 8) dann angenommen, wenn die progressionsfreie Überlebensrate (PFR) nach 3 Monaten  $\geq 40\%$  liegt.*

## 2.2 NK-Zell-Aktivität bei Patienten mit Weichteilsarkom unter Kombinationsbehandlung mit regionaler Hyperthermie

Es sind unterschiedliche Aktivierungsmechanismen für die NK-Zell-vermittelte Lyse bekannt (siehe Abschnitt 1.2.3, S. 30). Eine wichtige Rolle in dieser Aktivierung scheint wie einleitend ausgeführt hsp70 zuzukommen, da eine Expression des Moleküls auf der Zelloberfläche von Tumorzellen eine Lyse dieser Zellen durch NK-Zellen triggert (135) und frei im Medium vorkommendes hsp70 bzw. dessen Derivat TKD *in vitro* die lytische Aktivität der NK-Zellen steigert.(137)

Die Expression von hsp70 wird durch Stress induziert, wobei das sowohl für die intrazelluläre Expression wie auch für die Expression an der Zelloberfläche bei Tumorzelllinien gilt.(55) Als Stress können hierbei unterschiedliche Noxen gelten, unter anderem die Überwärmung der Zelle, wie sie bei einer Hyperthermieanwendung erreicht wird. RHT beeinflusst also die hsp70-Expression (zumindest *in vitro*) und könnte so auch die NK-Zell-Aktivität beeinflussen. Basierend auf diesen Überlegungen wurden die folgenden Fragestellungen und Hypothesen für diese Arbeit generiert:

### 2.2.1 Fragestellungen

Die Hauptfragestellung lautet:

*Zeigt sich unter Therapie mit ICE + RHT eine Änderung der spontanen lytischen Aktivität von NK-Zellen, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit Anthrazyklin-refraktärem Weichteilsarkom isolierten wurden?*

Hierfür wird die NK-Zell-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie gemessen.

Darüber hinaus sollen einige weitere Fragen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- *Ist bei Patienten mit Erstdiagnose eines Weichteilsarkoms vor Beginn der chemotherapeutischen Behandlung eine spontane NK-Zell-Aktivität nachweisbar?*
- *Ist diese spontan vorhandene NK-Zell-Aktivität durch Stimulation der Zellen mit Interleukin 2 und TKD beeinflussbar?*

- Ändert sich die Stimulierbarkeit der NK-Zellen im Verlauf der Therapie (das heißt ist die Stimulierbarkeit im letzten Therapiezyklus anders als bei Therapiebeginn)?
- Zeigt sich unter Therapie eine Änderung der absoluten Leukozyten-, Lymphozyten- und NK-Zell-Zahlen?

### 2.2.2 Hypothese

Basierend auf den oben ausgeführten Überlegungen wurde folgende Hypothese formuliert:

*Die spontane lytische NK-Zell-Aktivität, gemessen an NK-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Weichteilsarkom, steigt unter Therapie mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie signifikant an.*

### **3 ICE + RHT in der Therapie von Weichteilsarkomen**

Entsprechend der oben formulierten Hypothese soll im Rahmen der Arbeit die Frage beantwortet werden, ob eine Kombinationschemotherapie, bestehend aus Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) und appliziert in Kombination mit regionaler Hyperthermie eine vorteilhafte Therapieoption bei Patienten mit Weichteilsarkomen darstellt, die bereits mit Anthrazyklin-haltigen Chemotherapieprotokollen vorbehandelt worden sind.

#### **3.1 Patienten und Methoden**

Zu diesem Zwecke wurden zunächst alle Patienten identifiziert, die im Laufe der letzten Jahrzehnte in der Medizinischen Klinik III am Campus Großhadern des Klinikums der Universität München und in assoziierten Kliniken mit ICE behandelt worden waren. Nach Anwendung verschiedener Einschlusskriterien (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden die Daten der so ausgewählten Patienten hinsichtlich der unter Abschnitt 2.1.1 (S. 37) genannten Fragestellungen retrospektiv untersucht.

##### **3.1.1 Patientenrekrutierung & Einschlusskriterien**

Die Auswahl von Patienten für die vorliegende Analyse erfolgte anhand von existierenden Tabellen, die in der Abteilung für Hyperthermie in der Medizinischen Klinik III des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern, geführt wurden sowie durch Suche in einer abteilungsinternen Datenbank unter dem Stichwort „ICE“.

Auf diesem Wege konnten Patienten identifiziert werden, die zwischen 1997 und 2009 am Klinikum Großhadern und an kooperierenden Behandlungseinrichtungen (insbesondere in der Argirov Klinik Starnberger See, Berg) behandelt worden waren.

Für alle auf diese Weise erfassten Patienten wurde überprüft, ob sie folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Alter  $\geq 18$  Jahre zum Zeitpunkt des Therapiestarts
- Histologisch verifiziertes Weichteil- oder Knochensarkom (hierbei waren alle Weichteilsarkom-Subentitäten zugelassen, ebenso wie Osteosarkome und Ewing-Sarkome)
- Tumor-Grading  $\geq 2$  (also mäßig oder schlecht differenzierte Tumore)

- Nachweis eines progredienten Tumorleidens (im Sinne eines progredienten vorbestehenden Tumors oder eines neu aufgetretenen Rezidivs) vor Einleitung der Therapie mit ICE + RHT
- Behandlung in Kombination mit regionaler Hyperthermie

Alle Einschlusskriterien mussten erfüllt sein.

### 3.1.2 Therapieprotokoll

Die Therapie wurde nach folgendem Schema verabreicht:

Ifosfamid	1500 mg/m <sup>2</sup> KÖF	d1 - d4
Carboplatin	100 mg/m <sup>2</sup> KÖF	d1 - d4
Etoposid	150 mg/m <sup>2</sup> KÖF	d1 - d4
RHT		d1 & d3
G-CSF	5 µg/kg KG	ab d5 bis zum Durchschreiten des Leukozytennadirs und Erreichen von stabilen Leukozytenwerten > 2 G/l

Wiederholung ab Tag 29

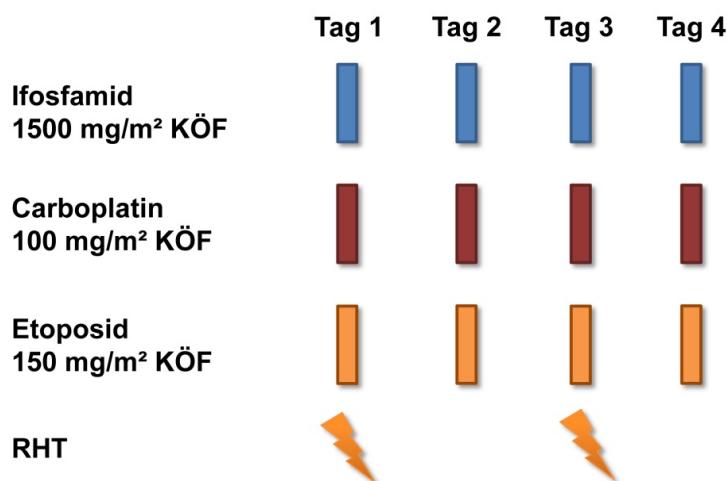


Abbildung 3-1

ICE-Therapieschema

Die oben genannten Chemotherapeutika wurden entsprechend der Fachinformation intravenös, bevorzugt über einen zentralvenösen Zugang, verabreicht; hierbei wurden Infusionszeiten von 30 Minuten bis zu einer Stunde pro Medikament angestrebt.

Zur Durchführung der Hyperthermiebehandlung wurden alle Patienten im BSD 2000-System<sup>2</sup> je nach Tumorlokalisation unter Verwendung unterschiedlicher Applikatoren wie Sigma Eye oder Sigma 60 behandelt. Nach einer Aufwärmphase von 30 Minuten, während der Etoposid und Carboplatin infundiert wurden, wurde die Temperatur über 60 Minuten hinweg stabil gehalten. In dieser „therapeutischen Stunde“ wurde Ifosfamid verabreicht.

Supportiv wurden Antiemetika (Steroide und 5-HT3-Antagonisten) verabreicht und auf eine ausreichende Volumenversorgung der Patienten zur Verhinderung einer Nephrotoxizität geachtet. Darüber hinaus wurden Benzodiazepine (zum Beispiel Lorazepam) vor Therapiebeginn zur Anxiolyse und Beruhigung verabreicht. Bei Auftreten von Schmerzen im Applikator wurde eine Schmerztherapie gemäß WHO-Stufenschema verabreicht. Handelte es sich um leistungsabhängige Schmerzen (waren die Schmerzen also nach Reduktion der Applikatorleistung rückläufig), wurde die für den Patienten maximal tolerable Leistung gewählt.

Zur Verkürzung der Zytopeniedauer wurde ab Tag 5 des Therapiezyklus bis zum Erreichen stabiler Leukozytenwerte über 2 G/I G-CSF subkutan verabreicht. Dabei war auch die Verwendung von pegyliertem G-CSF möglich, das einmalig an Tag 5 gegeben wurde.

Vor Applikation jedes Therapiezyklus' wurde auf eine ausreichende Nierenfunktion geachtet, abgeleitet nach der Cockcroft-Gault-Formel aus dem Kreatininwert im Serum. Außerdem wurde in regelmäßigen Abständen, zum Beispiel vor Verabreichung des ersten Zyklus und zu den Staginguntersuchungen, die Nierenfunktion direkt durch Bestimmung der Kreatinin-Clearance im 24-Stunden-Sammelurin gemessen.

Die Therapie wurde an Tag 29 mit einem weiteren Zyklus fortgesetzt. Voraussetzung für die Therapiefortsetzung war eine Neutrophilenzahl von  $\geq 1.500/\mu\text{l}$  und eine Thrombozytenzahl  $\geq 100.000/\mu\text{l}$ . Wurden diese Zahlen an Tag 29 nicht erreicht, erfolgte die Verschiebung des Therapiezyklus um eine Woche.

---

<sup>2</sup> BSD Medical Corporation, Salt Lake City, UT, USA

Eine weitere Kontraindikation zur Fortsetzung der Therapie waren floride Infekte und Fieber zum Zeitpunkt des Zyklusstarts. Bei fieberhaften Infekten in der Zytopeniephase erfolgte eine Dosisreduktion auf zunächst 75% der Ausgangsdosis (zum Beispiel durch Verkürzung des Therapiezyklus auf drei Tage); kam es hierunter zu erneuten Infekten, war eine weitere Dosisreduktion zum Beispiel auf 50% der Ausgangsdosis möglich. Eine Dosisreduktion war darüber hinaus bei schlechter Verträglichkeit der Therapie nach Maßgabe des behandelnden Arztes möglich. Bei umfangreich zytostatisch vortherapierten Patienten war eine Verringerung der applizierten Zytostatikadosis auch von Beginn der Therapie an möglich; auch hier erfolgte die Reduktion gegebenenfalls nach Maßgabe des behandelnden Arztes. Geplant waren zunächst stets sechs Zyklen der Therapie, ein Zwischenstaging wurde nach drei Zyklen – oder bei klinischem Verdacht auf Progression auch früher – durchgeführt. War in einem Zwischenstaging ein Ansprechen oder eine Erkrankungsstabilisierung dokumentiert, wurde die Therapie bei ausreichend guter Verträglichkeit im Regelfall bis zur Komplettierung von sechs beziehungsweise acht Zyklen fortgesetzt. Bei Auftreten einer Krankheitsprogression wurde die Therapie abgebrochen und – nach Maßgabe des behandelnden Arztes – in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten auf ein alternatives Therapieprotokoll umgestellt.

### **3.1.3 Therapieansprechen nach RECIST-Kriterien**

Das Therapieansprechen wurde in den meisten Fällen zunächst nach drei Therapiezyklen, bei Verdacht auf Progression der Erkrankung auch früher, mittels bildgebenden Verfahren erfasst. Vorzugsweise wurde hierfür das gleiche bildgebende Verfahren gewählt, das auch vor Therapiestart zur Anwendung gekommen war. Bei Tumoren im Bereich der Extremitäten war dieses Verfahren im Regelfall die Magnetresonanztomographie, bei Tumoren im Bereich des Körperstamms die Computertomographie. Die Bildgebung des Primärtumors wurde um Untersuchungen zum Ausschluss beziehungsweise zur Beurteilung einer vorhandenen Fernmetastasierung ergänzt, wobei dies im Regelfall mittels Computertomographie des Thorax und des Abdomens sowie mittels Sonographie des Abdomens erfolgte.

Eine Evaluation des Therapieansprechens erfolgte nach Maßgabe der *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours* (RECIST), Version 1.0 (188). Hierbei werden vor

Therapiestart – falls vorhanden – messbare Zielläsionen definiert, die dann unter Therapie hinsichtlich ihrer Größenveränderung untersucht werden. Dabei ist die Summe der längsten Durchmesser dieser Läsionen (im Schnittbildverfahren) entscheidend für die Beurteilung eines Therapieansprechens: Verschwinden die Zielläsionen komplett, wird von einer Vollremission (*Complete remission*, CR) gesprochen; nimmt die Summe der längsten Durchmesser um 30% oder mehr ab, spricht man von einer Teilremission (*Partial remission*, PR). Nimmt die Summe der Durchmesser jedoch um 20% oder mehr unter Therapie zu, muss von einer progredienten Erkrankung (*Progressive disease*, PD) ausgegangen werden. Treffen weder die Kriterien für ein Voll- noch Teilremission oder die einer Progredienz zu, ist von einer stabilen Erkrankungssituation (*Stable disease*, SD, oder *No change*, NC) auszugehen.

Der Anteil aller Patienten, die in Staginguntersuchungen ein Ansprechen des Tumors (also Teil- [PR] oder Vollremission [CR]) aufwiesen, wurde zur Errechnung der Ansprechraten (*objective response rate*) herangezogen. Darüber hinaus wurde auch der Anteil der Patienten berechnet, die keine weitere Progression der Erkrankung zeigten und mit der Ansprechraten zur Progressionsstoprate zusammengefasst (im Sinne eines *best clinical response*). Diese Rate umfasst also den Anteil aller Patienten, die unter Therapie keine weitere Progression der Erkrankung mehr aufweisen (also alle Patienten mit CR, PR oder NC).

Zur Berechnung der Remissionsraten wurde neben der Erfassung des Gesamtansprechens (das heißt unter Einbeziehung aller Tumormanifestationen, also lokalem Tumor und eventuell vorhanden Fernmetastasen) auch ein lokales Ansprechen evaluiert, bei dem ausschließlich das Verhalten des lokalen Tumors maßgeblich war.

### 3.1.4 Überlebensanalyse

Die Überlebenszeiten der Patienten wurden hinsichtlich des Gesamtüberlebens (*Overall Survival*, OS) und des progressionsfreien Überlebens (*Progression Free Survival*, PFS) mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven (57, 86) analysiert. Weiterhin wurde das des lokal progressionsfreie (*Local Progression Free Survival*, LPFS) und das fernprogressionsfreie (*Distant Progression Free Survival*, DPFS) Überleben berechnet, wobei für das fernprogressionsfreie Überleben bei Patienten, die vor

Beginn der ICE + RHT-Therapie bereits unter einer metastasierten Erkrankung litten, ein Progress der Metastasen und ein Neuaufreten von zusätzlichen Metastasen als nicht-lokales Ereignis definiert wurde.

Zusätzlich zur medianen progressionsfreien Überlebenszeit wurde die progressionsfreie Überlebensrate (*Progression Free Rate*, PFR) berechnet, die den Anteil nicht-progredienter Patienten nach einem definierten Zeitintervall (drei und sechs Monate) angibt. Im Gegensatz zum progressionsfreien Überleben werden für die progressionsfreie Überlebensrate therapieassoziierte Todesfälle zensiert.(193)

Darüber hinaus wurden Subgruppenanalysen durchgeführt. Die Unterschiede hinsichtlich der oben genannten Überlebenszeiten wurden sowohl bei Patienten mit und ohne Fernmetastasierung vor Start der Therapie mit ICE und RHT als auch bei Patienten mit mäßig (G2) und schlecht (G3) differenzierten Tumoren auf Signifikanz geprüft. Außerdem wurden entsprechende Berechnungen für histologische Subgruppen (Leiomyosarkome vs. Liposarkome vs. andere Subentitäten) und für Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT gezeigt hatten im Vergleich zu Patienten ohne Ansprechen durchgeführt.

Alle Zeitintervalle zur Analyse der Überlebenszeiten wurden ab dem Startdatum der Behandlung mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie berechnet.

### **3.1.5 Thermometrie**

Zielwert der Temperaturerhöhung im Bereich des Tumors waren 42°C. Es erfolgte ein Monitoring der Temperaturen durch Thermometrie-Katheter, wie bereits unter 1.1.5.2 (S. 22) ausgeführt.

Die Überwachung der erreichten Temperaturen erfolgte nach Maßgabe der publizierten Qualitätsstandards.(108) Bei den intratumoral und endoluminal eingebrachten Kathetern handelt es sich um sogenannte mappbare Katheter, die die Temperatur nicht nur an einem Punkt erfassen, sondern wiederholte Messungen, im Regelfall einmal pro Minute, an unterschiedlichen Positionen des Zugangsweges, jeweils unter Rückzug um einen Zentimeter, vornehmen. Daraus resultiert ein Temperaturprofil, das Aussagen über die Temperaturverteilung im Tumor (bei intratumoraler Katheterlage) und im umgebenden Gewebe (bei endoluminaler Lage) zulässt.

Aus den so erhobenen Temperaturwerten (nur von intratumoralen und -luminalen Kathetern, nicht jedoch von Haut- und Blasenkathetern) können Durchschnittswerte errechnet werden, die eine Aussage über die Qualität der Hyperthermiebehandlung zulassen. Es werden die erreichte Maximaltemperatur ( $T_{\max}$ ), die Minimaltemperatur ( $T_{\min}$ ) und die in 20%, 50% und 90% der Messungen ( $T_{20}$ ,  $T_{50}$  und  $T_{90}$ ) erreichten Temperaturen angegeben. Die Differenz aus  $T_{50}$  und  $T_{90}$  ist dabei ein Gradmesser für die Homogenität der im Tumor (oder im Tumorbett) erreichten Temperaturerhöhung.

Vorhandene Tumorkatheter wurden im Regelfall nach dem ersten Behandlungszyklus entfernt; danach wurde keine erneute Katheteranlage veranlasst, sondern die folgenden Therapien anhand der beim ersten Zyklus erhobenen Temperaturdaten geplant.

### **3.1.6 Toxizität**

Die Erfassung der Nebenwirkungen der Therapie erfolgte analog zur *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, Version 3.0.(213) Da es sich um eine retrospektive Analyse handelt, wurde die Toxizität anhand der verfügbaren Arztbriefe und Laborwerte ausgewertet. Nebenwirkungen der Hyperthermiebehandlung wie Schmerzen, Bolusdruck etc. wurden aus den Behandlungsprotokollen entnommen. Informationen über die applizierten Chemotherapiedosen wurden ebenfalls den Arztbriefen und Hyperthermiebehandlungsprotokollen entnommen.

### **3.1.7 Statistische Analyse**

Die erhobenen Daten wurden zunächst in einer Tabelle in Microsoft Excel 2003/2007<sup>3</sup> zusammengefasst und zur weiteren Analyse in SPSS Version 19<sup>4</sup> exportiert.

Der Test auf Signifikanz im Hinblick auf die Verteilung der Patientencharakteristika erfolgte mittels t-Test bei intervallskalierten Merkmalen und mittels Vierfelder- $\chi^2$ -Test bei nominalskalierten Merkmalen. Die Thermometriedaten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede getestet.

---

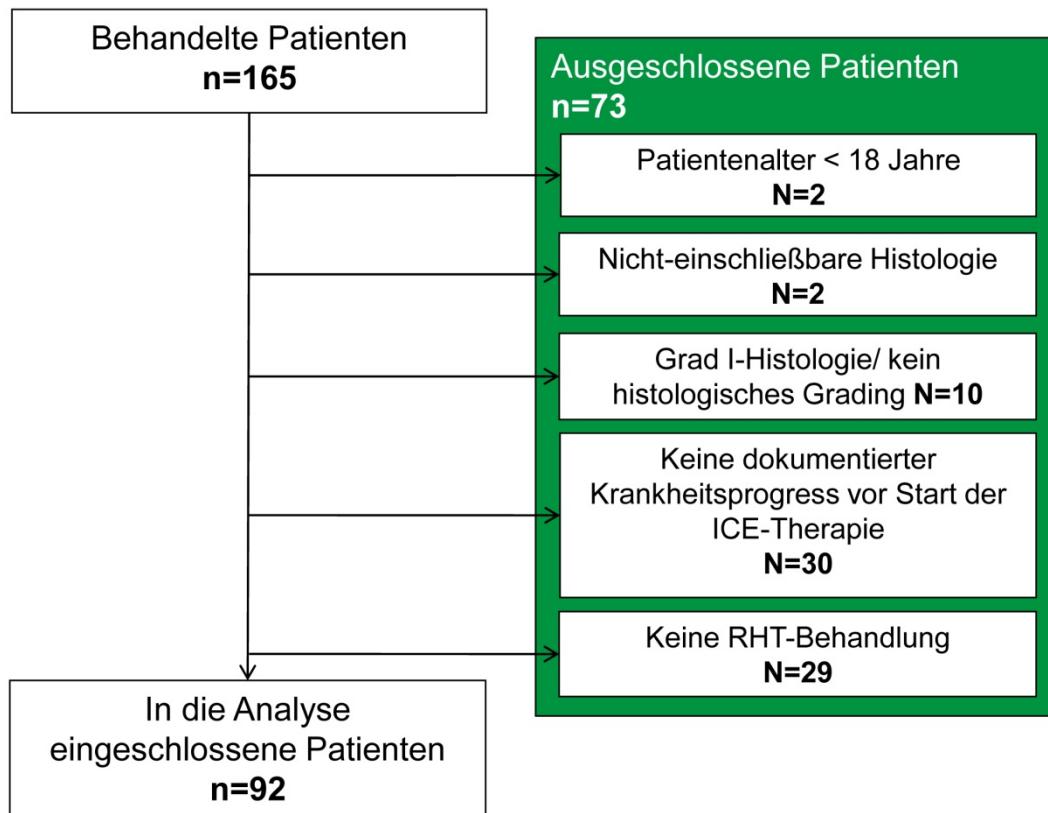
<sup>3</sup> Microsoft Corp., Redmond, USA

<sup>4</sup> IBM Corp., Armonk, USA

Unterschiede der einzelnen Überlebenskurven wurden mithilfe des Log Rank-Tests auf Signifikanz überprüft. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn  $p<0,05$  war.

### 3.2 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der retrospektiven Auswertung des Krankheitsverlaufs der Patienten dargestellt werden, die zur Analyse nach den oben genannten Kriterien ausgewählt wurden. Abbildung 3-2 gibt Auskunft über die Ergebnisse des Selektionsprozesses.



**Abbildung 3-2** Auswahl des analysierten Patientenkollektivs

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass im Zeitraum zwischen 1997 und 2009 insgesamt 165 Patienten am Klinikum Großhadern sowie an den kooperierenden Behandlungseinrichtungen mit ICE behandelt worden waren. Eines der unter Punkt 3.1.1 (S. 41) aufgeführten Einschlusskriterien war bei insgesamt 73 Patienten nicht erfüllt, sodass diese Patienten von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Es wurden 92 Patienten identifiziert, die in die Analyse eingeschlossen wurden. Die beiden Patienten, die aufgrund einer nicht-einschließbaren Histologie behandelt wurden, litten beide unter einem neuroendokrinen Karzinom. Hervorzuheben ist, dass dreißig Patienten von der Analyse ausgeschlossen wurden, weil bei ihnen keine

progrediente Tumorerkrankung vorlag (zum Beispiel bei Patienten, die nach Ende einer Erstlinientherapie und Erreichen der Anthrazyklin-Grenzdosis eine stabile, nicht-operable Tumormanifestation hatten). Alle untersuchten Patienten litten also an einem fortschreitenden Sarkom vor Beginn der Therapie mit ICE + RHT. Gründe für die Verabreichung von ICE ohne begleitende Hyperthermie waren Ablehnung der RHT-Behandlung durch den Patienten oder fehlender Nachweis einer lokalen, hyperthermierbaren Tumormanifestation.

### 3.2.1 Patientencharakteristika

In Tabelle 3-1 (S. 51) werden die Charakteristika der 92 analysierten Patienten dargestellt. Alle erfassten Charakteristika werden sowohl für das Gesamtkollektiv angegeben wie auch für die beiden Subgruppen der Patienten mit ausschließlich lokal fortgeschrittenen Erkrankung zum Zeitpunkt des Therapiebeginns sowie der Patienten mit lokal fortgeschrittenen Erkrankung, bei denen Fernmetastasen nachweisbar waren.

In der Zusammenschau ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für die beiden Patientengruppen, abgesehen von einem deutlich höheren Anteil vorbestrahlter Patienten in der Gruppe nicht-metastasierter Patienten. Der Anteil an voroperierten Patienten ist jedoch in der Gruppe mit metastasierter Erkrankung signifikant höher. Sowohl für die Alters- als auch die Geschlechterverteilung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, ebenso wenig wie für den Anteil an Extremitäten-Tumoren im Vergleich zu Tumoren des Körperstamms. Auch der Differenzierungsgrad (mäßig/schlecht differenziert, G2/G3) der Tumore war in den beiden Subgruppen nicht signifikant unterschiedlich, jedoch ist der Anteil an G3-Tumoren in der metastasierten Gruppe tendenziell höher.

Die Mehrheit der Patienten mit metastasierter Erkrankung litt unter pulmonalen Metastasen, wobei in Tabelle 3-1 nur die primäre Metastasenlokalisierung angegeben ist. Nicht einzeln aufgeführte Metastasenlokalisationen umfassen zum Beispiel Haut-, Weichteil- und ossäre Metastasen.

Die häufigsten für diese Auswertung diagnostizierten STS-Subentitäten waren Liposarkome und Leiomyosarkome. Andere Subentitäten kamen insgesamt seltener vor, zum Beispiel NOS (*not otherwise specified* Sarkome) oder maligne periphere Nervenscheidenentumore (MPNST).

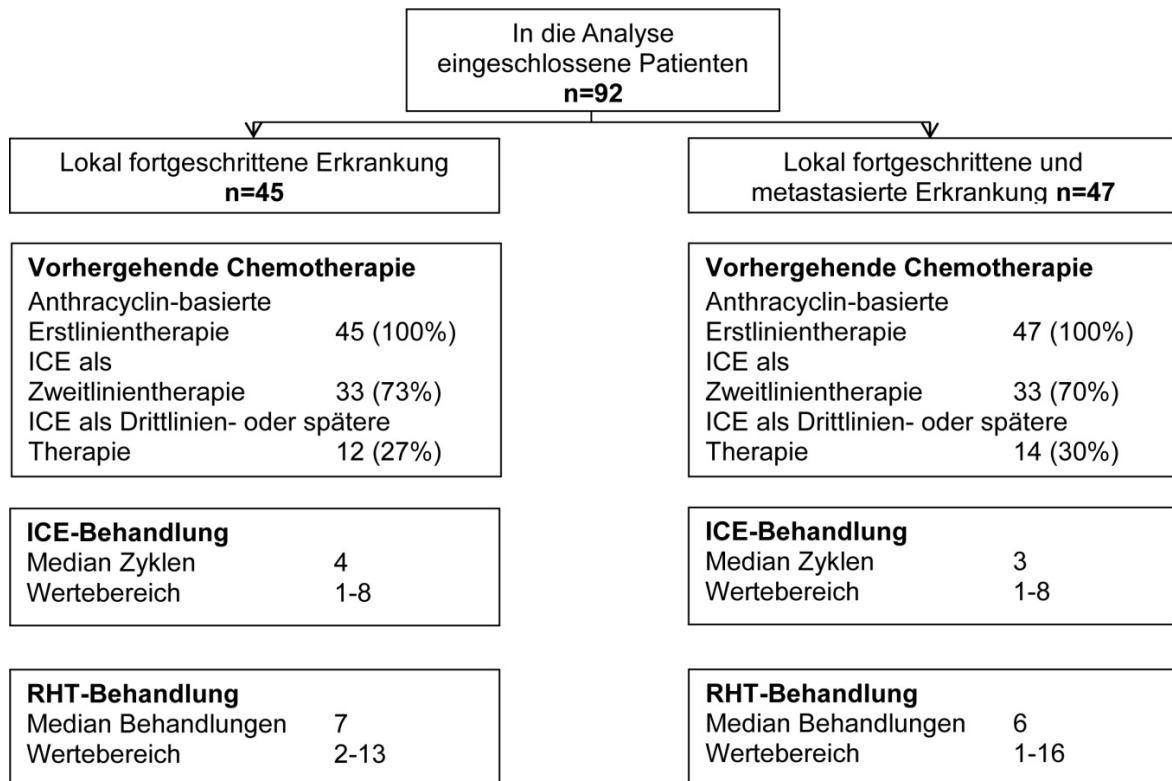
## ICE in der Therapie von Weichteilsarkomen

	Lokal fortschritten (n=45)	Lokal fortgeschritten + metastasiert (n=47)	Alle Patienten (n=92)	p-Wert
<b>Medianes Alter</b>				
Jahre (Wertebereich)	56 (18 – 74)	48 (22 – 77)	52 (18 – 77)	0,09
≥ 50 Jahre	31 (69%)	21 (45%)	52 (57%)	
< 50 Jahre	14 (31%)	26 (55%)	40 (43%)	
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	24 (53%)	21 (45%)	45 (49%)	0,53
Weiblich	21 (47%)	26 (55%)	47 (51%)	
<b>Vortherapien</b>				
<b>Voroperation</b>				
Ja	33 (73%)	44 (94%)	77 (84%)	0,01
Nein	12 (27%)	3 (6%)	15 (16%)	
<b>Vorbestrahlung</b>				
Ja	29 (64%)	15 (32%)	44 (48%)	0,003
Nein	16 (36%)	32 (68%)	48 (52%)	
<b>Tumorlokalisation</b>				
Extremitäten	13 (29%)	12 (26%)	25 (27%)	0,82
Nicht-Extremitäten	32 (71%)	35 (74%)	67 (73%)	
<b>Art der Progression</b>				
Progression eines vorbestehenden Tumors	21 (47%)	32 (68%)	53 (58%)	0,06
Rezidiv	24 (53%)	15 (32%)	39 (42%)	
<b>Metastasenlokalisation vor Start der ICE-Therapie</b>				
Lunge	27 (58%)			
Leber	10 (21%)			
Andere	10 (21%)			
<b>Tumor-Grading</b>				
2	21 (47%)	13 (28%)	34 (37%)	0,08
3	24 (53%)	34 (72%)	58 (63%)	
<b>Histologie</b>				
Liposarkom	15 (33%)	4 (9%)	19 (21%)	
Leiomyosarkom	5 (11%)	12 (26%)	17 (18%)	
NOS	4 (9%)	5 (11%)	9 (10%)	
MPNST	5 (11%)	3 (6%)	8 (9%)	
Rhabdomyosarkom	2 (4%)	3 (6%)	5 (5%)	
Synovialsarkom	1 (2%)	3 (6%)	4 (4%)	
Andere	13 (30%)	17 (36%)	30 (33%)	

**Tabelle 3-1**

Patientencharakteristika

Informationen zu den durchgeführten Vortherapien sind Abbildung 3-3 zu entnehmen.



**Abbildung 3-3** Details zu Vortherapien und applizierte ICE+RHT-Zyklen

Alle Patienten waren mit Anthracyklin-haltigen Vortherapien behandelt worden. In beiden Patientengruppen erhielten etwa drei Viertel der Patienten ICE in Kombination mit RHT als Zweitlinientherapie nach Progress unter oder Rezidiv nach Durchführung einer Erstlinientherapie. Bei den verbleibenden Patienten wurde ICE + RHT im späteren Krankheitsverlauf, zum Beispiel als Dritt- oder Viertlinientherapie verabreicht.

Die Anzahl an applizierten ICE-Zyklen und an RHT-Behandlungen war für die Patientengruppe mit metastasierter Erkrankung im Median etwas geringer als bei den Patienten ohne Nachweis von Metastasen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. (p=0,136 für die Anzahl der Therapiezyklen bzw. p=0,377 für die Anzahl der RHT-Behandlungen)

### 3.2.2 Thermometrie

Die Auswertung der Thermometriedaten hat zum Ziel, einerseits eine Einschätzung der Qualität der Hyperthermiebehandlung zu ermöglichen und andererseits Rückschlüsse auf den Anteil abzuleiten, den die Hyperthermiebehandlung am Behandlungserfolg insgesamt hat. Die hierbei zu betrachtenden Größen sind die Temperaturen, die im Tumor maximal erreicht werden (abgebildet durch  $T_{\max}$  und  $T_{20}$ ) sowie die Temperaturverteilung als Maß für die Homogenität der Temperaturerhöhung im vordefinierten Behandlungsfeld.

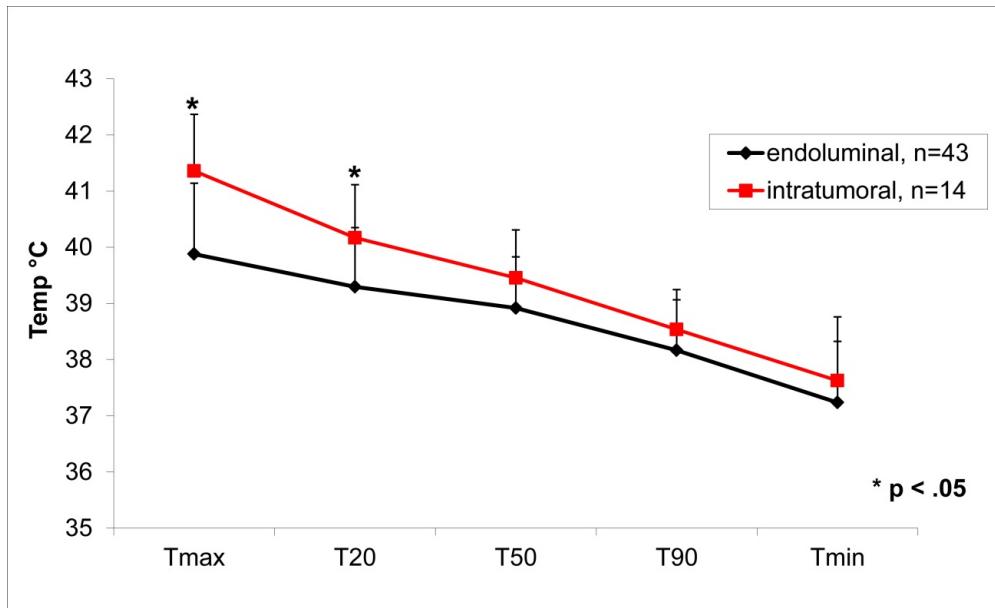
Eine Auswertung der Thermometriedaten war bei 48 der insgesamt 92 behandelten Patienten möglich. Bei 14 Patienten war eine intratumorale Thermometrie erfolgt; bei 43 Patienten wurden Daten mittels endoluminaler Messungen (vergleiche Abschnitt 1.1.5.2, S. 22) erhoben. Bei neun Patienten waren demnach sowohl intratumorale als auch endoluminale Messungen durchgeführt worden.

Gründe für die Nichtverfügbarkeit von Thermometriedaten waren insbesondere Tumore, die nicht durch endoluminale Katheter erreichbar waren (zum Beispiel im Bereich der Extremitäten oder im Bereich der Brustwand). Bei diesen Patienten wurde die Einbringung eines Katheters in den Tumor als zu invasiv angesehen. Eine routinemäßig bei allen Patienten erfolgte Überwachung der Hauttemperatur im Hyperthermieareal eignete sich nicht für eine thermometrische Auswertung.

In Abbildung 3-4 und in Tabelle 3-2 werden die im Durchschnitt aus allen Messungen berechneten Werte für  $T_{\max}$ ,  $T_{20}$ ,  $T_{50}$ ,  $T_{90}$  und  $T_{\min}$  angegeben. Die im Tumor erreichten Temperaturen waren für alle angegebenen Werte durchschnittlich höher als bei endoluminaler Messung.

	$T_{\max}$	$T_{20}$	$T_{50}$	$T_{90}$	$T_{\min}$
Mittelwert intratumoral	41,36	40,17	39,46	38,53	37,63
Mittelwert endoluminal	39,88	39,29	38,92	38,16	37,24

**Tabelle 3-2** Erreichte Durchschnittstemperatur im Hyperthermieareal bei intratumoraler und endoluminaler Messung



**Abbildung 3-4** Erreichte Durchschnittstemperatur im Hyperthermieareal bei intratumoraler (rot) und endoluminaler (schwarz) Messung

Zielwert der Temperaturerhöhung im Tumor waren 42 °C. Dieser wurde bei insgesamt vier Patienten als  $T_{\max}$  mit intratumoraler Temperaturbestimmung erreicht, also bei insgesamt 29% der Patienten. Bei endoluminaler Messung wurden 42 °C (wiederum als  $T_{\max}$ ) bei zwei Patienten erreicht, das entspricht einem Anteil von 5%. Als Maß für die Homogenität der Temperaturerhöhung erfolgt die Berechnung der Differenz aus den Durchschnittswerten für  $T_{50}$  und  $T_{90}$  aus allen Hyperthermiebehandlungen in einem Patienten. Je kleiner die Differenz ist, umso homogener ist die Temperaturverteilung im Tumor beziehungsweise im Hohlorgan in der Nähe des Tumors. Durch Auftragung der Differenz gegen  $T_{20}$  (als Maß für die erreichte Temperatur) in Abbildung 3-5 ergibt sich ein Scattergramm, das die Temperaturverteilung veranschaulicht. Es erfolgte wiederum eine getrennte Erfassung der Ergebnisse für intratumorale und endoluminale Messung. Einzelne Messungen zeigen Differenzen im Bereich von knapp unter 2 °C, die Mehrheit liegt jedoch im Bereich von  $\leq 1$  °C.

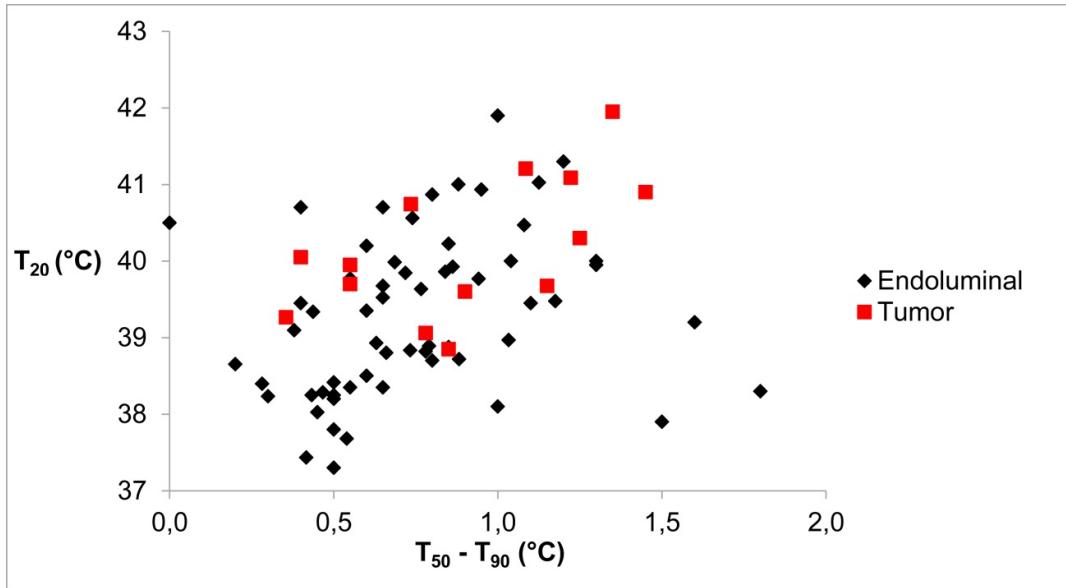


Abbildung 3-5 Temperaturverteilung intratumoral (rot) und endoluminal (schwarz)

Abbildung 3-6 zeigt die durchschnittlichen Temperaturen an, die bei Patienten mit Nachweis eines radiologischen Ansprechens erreicht wurden, und setzt diese in Verhältnis zu den Temperaturen, die in Patienten dokumentiert wurden, die kein Ansprechen auf ICE + RHT zeigen. Signifikante Unterschiede waren hier nicht nachweisbar. Sowohl für  $T_{20}$  als auch für die Homogenität der Temperaturwerte wurden für alle Patienten mit bildgebendem Ansprechen durchschnittliche Werte erreicht.

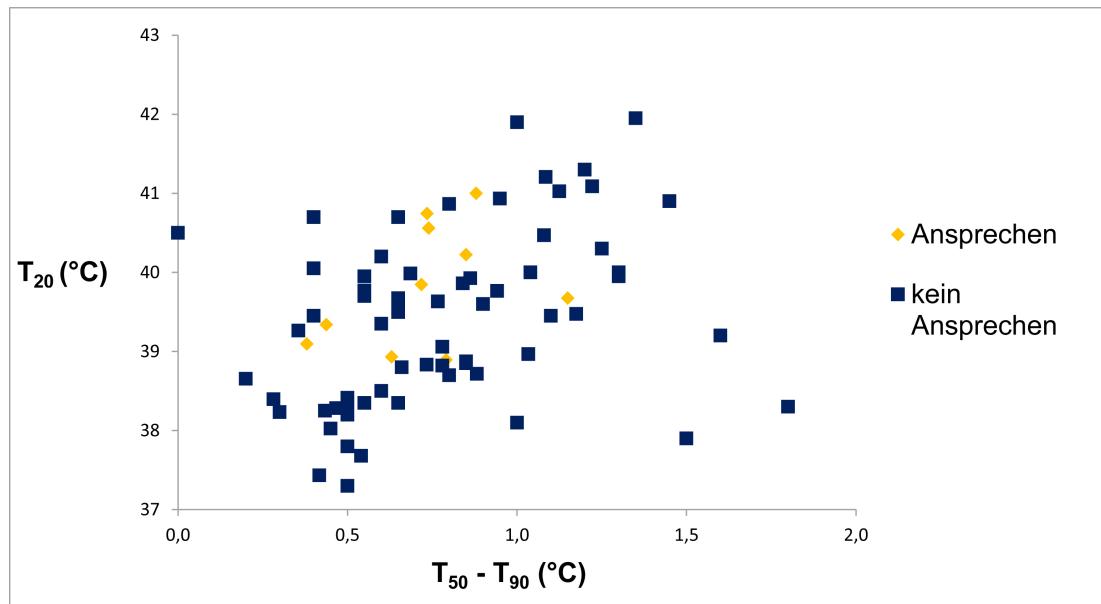


Abbildung 3-6 Temperaturverteilung bei Patienten mit radiologischer Remission unter ICE+RHT (gelb) und ohne radiologisches Ansprechen (blau)

### 3.2.3 Toxizität

Die Häufigkeit von Komplikationen und Nebenwirkungen eines Therapieprotokolls stellt eine wichtige Größe zur Beurteilung der Anwendbarkeit dieser Therapie dar. So können Patientengruppen identifiziert werden, für die diese Therapie in Frage kommt. Die Erfassung des Nebenwirkungsprofils war bei retrospektiver Datenerhebung jedoch erschwert, da eine Analyse nur anhand vorliegender Arztbriefe und Labordaten möglich war.

Tabelle 3-3 (S. 57) zeigt die Häufigkeit von hämatologischen Nebenwirkungen der Therapie. Bei zwei Dritteln der Patienten traten Grad III- oder Grad IV-Nebenwirkungen auf. Eine hämatologische Toxizität Grad III ist hierbei definiert als Abfall der Leukozyten auf Werte < 1.000/ $\mu$ l und/oder Abfall der Thrombozyten auf Werte < 50.000/ $\mu$ l. Eine viertgradige Toxizität (als „lebensbedrohlich“ eingeschätzt) liegt vor, wenn die Leukozytenwerte < 500/ $\mu$ l abfallen und/oder Thrombozytenwerte von < 25.000/ $\mu$ l auffallen.

Eine solche viertgradige Toxizität trat im Verlauf der Therapie mindestens einmalig bei etwa der Hälfte der Patienten auf, bei weiteren 20% kam es zu drittgradigen Hämatotoxizitäten.

Ein Drittel der Patienten entwickelte unter Therapie Fieber in einer Zytopeniephase. Es traten zwei Chemotherapie-assoziierte Todesfälle auf, beide bedingt durch septische Komplikationen bei Zytopenie im Intervall. Einer dieser Patienten entwickelte die septischen Komplikationen, die schlussendlich zum Tod führten, nach dem ersten Behandlungszyklus; der zweite betroffene Patient verstarb nach dem dritten Zyklus.

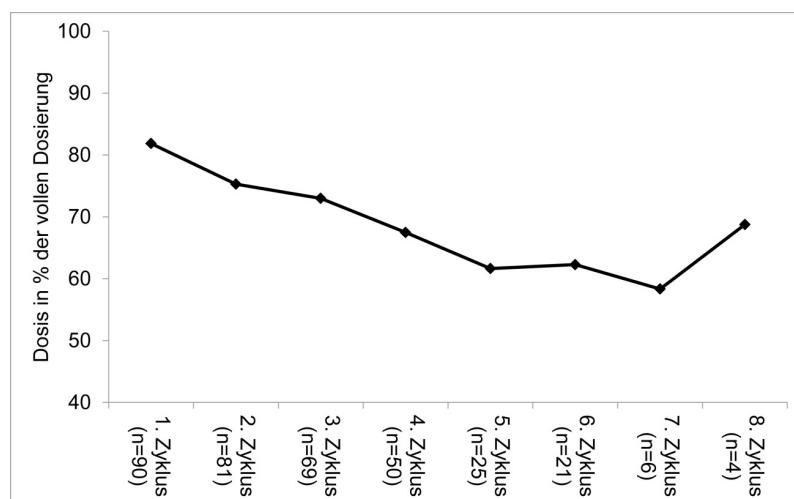
Darüber hinaus verstarb ein Patient an Komplikationen einer Operation nach einem Zyklus ICE + RHT, die jedoch nicht in Zusammenhang mit der Chemotherapie zu sehen sind.

Bei der Hälfte der Patienten war aufgrund der oben ausgeführten Nebenwirkungen eine Dosisreduktion erforderlich. Bei einem erheblichen Anteil der Patienten war jedoch von vorne herein bereits eine Dosisreduktion nach Maßgabe des behandelnden Arztes erfolgt, zum Beispiel bei ausgeprägten Vortherapien, sodass 50% der Patienten nie einen volldosierten Chemotherapiezyklus erhielten. Weitere Dosisreduktionen waren auch bei diesen Patienten möglich.

	Lokal fortgeschritten (n=45)	Lokal fortgeschritten + metastasiert (n=47)	Alle Patienten (n=92)	p-Wert
<b>Hämatologische Toxizität</b>				
III°				
	8 (18%)	9 (19%)	17 (18%)	1,0
IV°	23 (51%)	22 (48%)	45 (49%)	0,84
<b>Fieber in Zytopenie</b>	16 (36%)	13 (28%)	29 (32%)	0,50
<b>Chemotherapie-assoziierte Todesfälle</b>				
	2 (4%)	-	2 (2%)	0,24
<b>Dosisreduktion erforderlich</b>	23 (51%)	24 (51%)	47 (51%)	1,0
<b>Patienten, die nie 100% der Dosis erhalten haben</b>	24 (53%)	22 (47%)	46 (50%)	0,68

**Tabelle 3-3** Nebenwirkungsprofil der Chemotherapie und resultierende Dosisreduktion

Abbildung 3-7 fasst die durchschnittlich applizierte Dosis für alle behandelten Patienten zusammen. Während im ersten Zyklus durchschnittlich knapp über 80% der Gesamtdosis verabreicht worden waren, fiel dieser Wert für den vierten Zyklus bereits unter 70% ab. Im sechsten applizierten Zyklus war die Durchschnittsdosis auf knapp über 60% reduziert worden.



**Abbildung 3-7** Durchschnittliche verabreichte Chemotherapedosis für die einzelnen Zyklen

### 3.2.4 Tumoransprechen

Trotz Definition neuer Zielgrößen zur Beurteilung des Therapieerfolges in der Behandlung von Weichteilsarkomen (siehe Abschnitt 1.1.3.1, S. 8) ist das bildgebende Ansprechen des Tumors, das heißt das Erreichen einer Tumorvolumenreduktion, unverändert Ziel einer jeden zytostatischen Behandlung. Dieses Ansprechen wurde, wie oben beschrieben (siehe 3.1.3, S. 44), nach den RECIST-Kriterien retrospektiv erfasst. Dabei wurde stets das Ergebnis des zuletzt während oder unmittelbar nach Therapie durchgeführten Stagings als relevant erfasst, das heißt das Ansprechen bei einem Patienten, der in einem Abschlussstaging nach sechs Zyklen ICE in Kombination mit RHT eine Teilremission aufwies, wurde als PR gewertet, während bei einem Patienten, der nach zwei Zyklen der Therapie eine partielle Remission zeigte, bei dem jedoch nach sechs Zyklen eine progrediente Erkrankung auffiel, eine Einteilung des Ansprechens in PD erfolgte. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

	Lokal fortgeschritten (n=45)	Lokal fortgeschritten + metastasiert (n=47)	Alle Patienten (n=92)
<b>Keine messbaren Läsionen</b>	8 (18%)	1 (2%)	9 (10%)
<b>Messbare Läsionen</b>	37 (82%)	46 (98%)	83 (90%)
<b>Vollremission</b>	1 (3%)	0	1 (1%)
<b>Teilremission</b>	7 (18%)	3 (7%)	10 (12%)
<b>Unverändert</b>	14 (39%)	12 (26%)	26 (31%)
<b>Progrediente Erkrankung</b>	8 (22%)	28 (60%)	36 (44%)
<b>Nicht evaluierbar</b>	7 (18%)	3 (7%)	10 (12%)
<b>Gesamtansprechensrate</b>	21%	7%	13%
<b>Progressionsstop-rate</b>	60%	33%	44%

Tabelle 3-4

Tumoransprechen auf die Kombinationstherapie

Bei durchschnittlich 90% aller Patienten lagen bei Start der Therapie messbare Läsionen vor, sodass nur diese Patienten in die Analyse mit eingeschlossen werden konnten. Bei den verbleibenden Patienten war unmittelbar vor Start der Therapie mit ICE in Kombination mit RHT eine Tumorresektion bei Lokalrezidiv erfolgt, so dass keine Zielläsion zur Beurteilung des Ansprechens vorhanden war.

Bei einem Patienten mit lokal fortgeschrittener Erkrankung ohne Nachweis einer Fernmetastasierung war eine Vollremission nach Durchführung der Therapie zu dokumentieren, dies entspricht einem Anteil von 1% aller Patienten. Teilremissionen wurden bei insgesamt 10 Patienten gesehen, diese waren überwiegend der nicht-metastasierten Patientengruppe zuzuordnen.

22% der nicht-metastasierten beziehungsweise 60% der Patienten mit Metastasen vor Therapiestart (insgesamt 44%) zeigten eine progrediente Erkrankung unter der Therapie mit ICE in Kombination mit RHT.

Bei 39% der nicht-metastasierten Patienten und 26% der metastasierten Patienten war keine Änderung der Läsionen unter Therapie feststellbar, sodass bei insgesamt 31% aller eingeschlossenen Patienten eine NC-Situation vorlag.

Aus den oben genannten Daten errechnet sich eine Gesamtansprechratrate (*objective response rate*) von 21% bei den nicht-metastasierten Patienten und von 7% bei den metastasierten Patienten, für die Gesamtpopulation lag diese Rate bei 13%. Remissionen waren in Patienten mit Leiomyosarkomen, not-otherwise-specified („NOS“)-Sarkomen, Rhabdomyosarkomen und jeweils einem Patienten mit Fibrosarkom, malignem Riesenzelltumor, Liposarkom und Synovialsarkom nachweisbar. Für Patienten mit NOS-Sarkomen ist dabei eine im Vergleich zur Gesamtpopulation überdurchschnittliche Ansprechratrate (33%, 3 PR in insgesamt 9 behandelten Patienten) nachweisbar.

Die Progressionsstoprate (*best clinical response rate*) lag bei den nicht-metastasierten Patienten bei insgesamt 60% und bei den Patienten mit Metastasen vor Therapiestart bei 33%. Für die gesamte Population errechnet sich eine Progressionsstoprate von 44%.

Von Interesse war auch die lokale Ansprechratrate bei Patienten mit metastasierter Erkrankung im Vergleich zur Ansprechratrate für alle Tumorläsionen, da mit Durchführung einer RHT-Behandlung ein lokales Therapieverfahren gewählt wurde, über dessen Einfluss auf nicht hyperthermierte Läsionen (zum Beispiel pulmonale

Metastasen) kein abschließend gesichertes Wissen vorhanden ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 dargestellt.

<b>Lokal fortgeschritten + metastasiert (n=47)</b>		
	Lokales Ansprechen	Ansprechen lokal + fern
<b>Keine messbaren Läsionen</b>	1 (2%)	1 (2%)
<b>Messbare Läsionen</b>	46 (98%)	46 (98%)
<b>Vollremission</b>	0	0
<b>Teilremission</b>	6 (14%)	3 (7%)
<b>Unverändert</b>	19 (40%)	12 (26%)
<b>Progrediente Erkrankung</b>	18 (39%)	28 (60%)
<b>Nicht evaluierbar</b>	3 (7%)	3 (7%)
<b>Gesamtansprechen</b>	14%	7%

**Tabelle 3-5** Lokale Ansprechraten bei Patienten mit metastasierter Erkrankung vor Therapiestart im Vergleich zur Ansprechraten aller Tumorlokalisierungen

Hier zeigt sich, dass die lokale Ansprechraten im Vergleich zur Ansprechraten aller Tumorlokalisierungen doppelt so hoch liegt, bei 14%. Dies ist bedingt durch die höhere Anzahl von lokalen partiellen Remissionen. Vollremissionen konnten in diesen Patienten auch lokal nicht dokumentiert werden.

### 3.2.5 Überlebensanalysen

Anhand der erhobenen Daten wurden Analysen zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben erstellt, wobei das progressionsfreie Überleben sowohl für alle Ereignisse als auch als Subanalyse für lokale und nicht-lokale Ereignisse berechnet wurde. Dies sollte erneut eine Einschätzung des Beitrages der RHT am Gesamtbehandlungserfolg erlauben. Darüber hinaus erfolgten gesonderte Berechnungen für Patienten mit metastasierter Erkrankung im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis von Fernmetastasen vor Beginn der Therapie.

### 3.2.5.1 Gesamtüberleben (OS)

Die Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben für die gesamte untersuchte Patientenpopulation ist in Abbildung 3-8 dargestellt. Die mediane Nachbeobachtungszeit für alle Patienten war 46 Monate (Wertebereich 0 – 144 Monate); nach 70 Monaten zeigt sich ein Plateau beim Gesamtüberleben von 17%. Das mediane Gesamtüberleben für alle Patienten beträgt 17 Monate (95%-Konfidenzintervall [KI] 11,5 – 22,5 Monate).

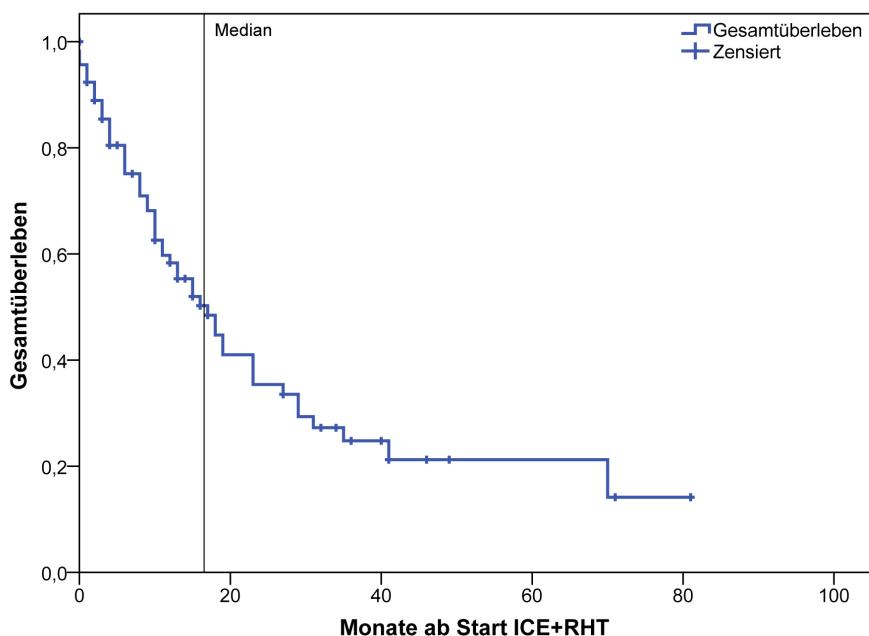
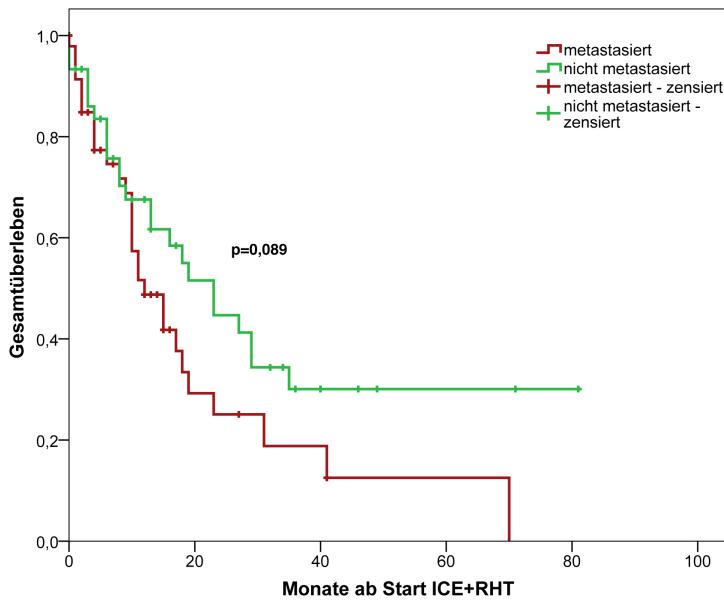


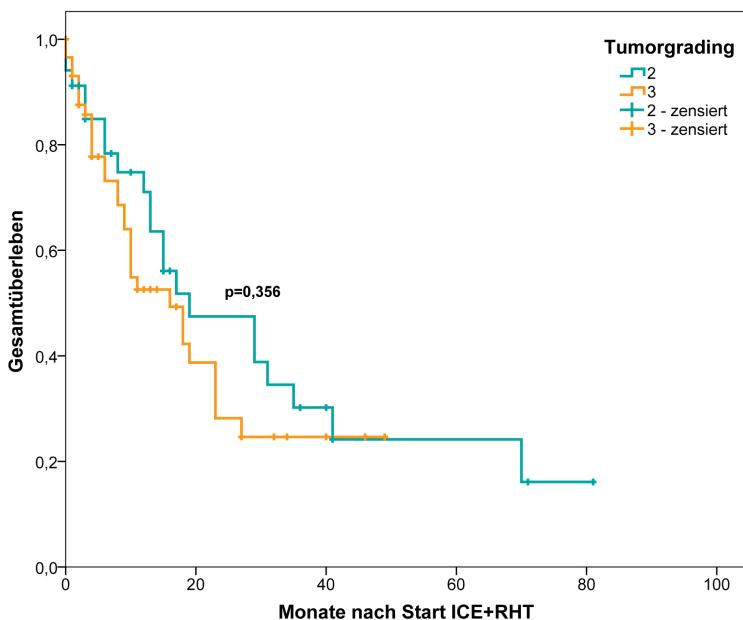
Abbildung 3-8 Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben für alle untersuchten Patienten

In Abbildung 3-9 werden die Gesamtüberlebenskurven der metastasierten und nicht-metastasierten Patientengruppen in Vergleich gesetzt. Bei nicht-metastasierten Patienten beträgt das mediane Gesamtüberleben nach Start der Kombinationstherapie mit ICE und regionaler Hyperthermie 23 Monate (95%-KI 14,8 – 31,2 Monate), während metastasierte Patienten ein Gesamtüberleben von im Median 12 Monaten (95%-KI 6,8 – 17,2 Monate) zeigen. Die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen sind nicht signifikant ( $p=0,089$ ), wenngleich das Gesamtüberleben bei nicht-metastasierten Patienten tendenziell, aber nicht signifikant besser ist als bei Patienten mit Metastasen bei Therapiestart.



**Abbildung 3-9** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für nicht-metastasierte (grün) und metastasierte Patienten (rot)

Auch beim Vergleich von Patientengruppen mit G2- und G3-Tumoren zeigen sich, wie der Abbildung 3-10 zu entnehmen ist, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens.

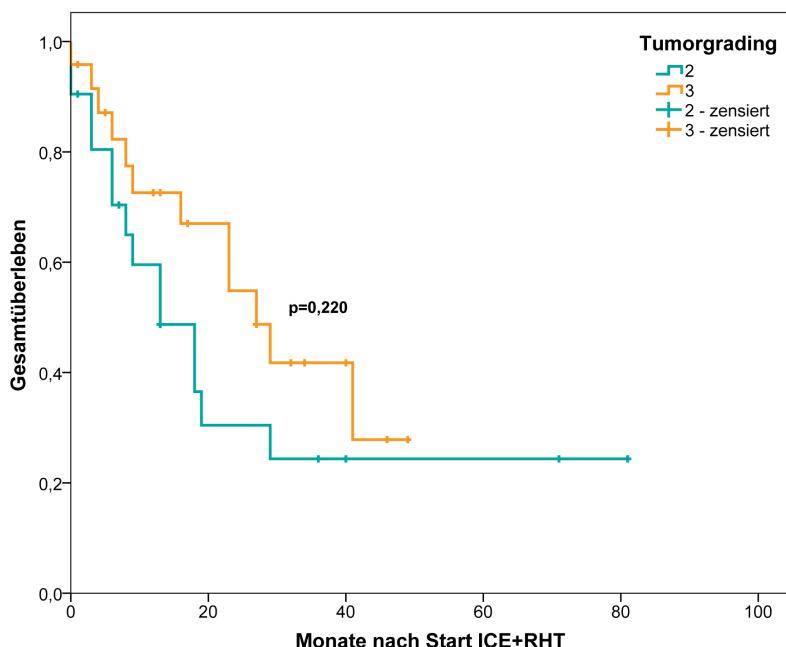


**Abbildung 3-10** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für Patienten mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

Im Median beträgt das Gesamtüberleben bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren (G3-Gruppe) 16 Monate (95%-KI 9,9 – 22,1 Monate), während bei

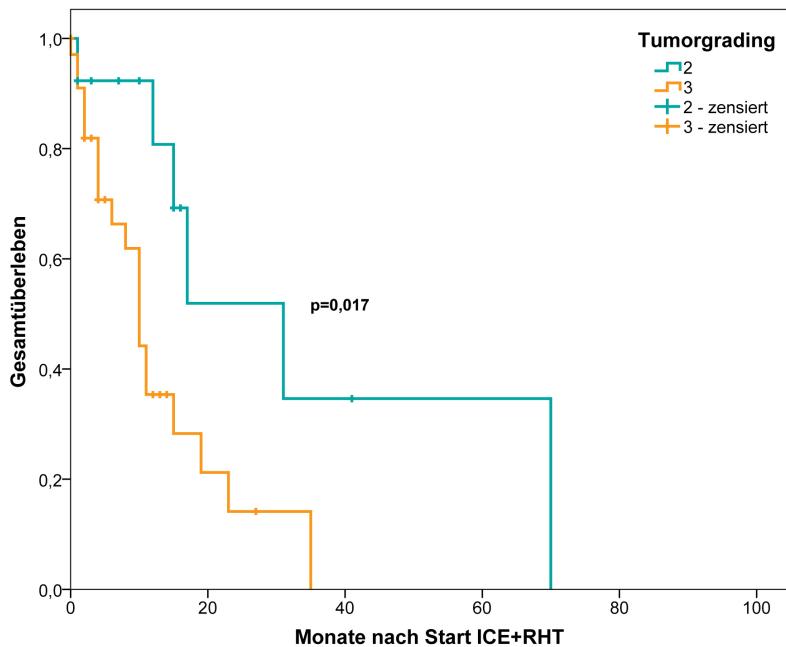
Patienten mit mäßig differenzierten Tumoren (G2-Gruppe) die entsprechende Überlebenszeit mit 19 Monaten (95%-KI 3,6 – 34,3 Monate) nicht signifikant länger ist.

Darüber hinaus wurde das Gesamtüberleben auch noch auf signifikante Unterschiede bei Vorliegen eines mäßig (G2) oder schlecht (G3) differenzierten Tumors in den Subgruppen für Patienten mit nicht-metastasierter und metastasierter Erkrankung geprüft. Die Kaplan-Meier-Kurven können den Abbildungen 3-11 (nicht-metastasierte Patienten) und 3-12 (metastasierte Patienten) entnommen werden.



**Abbildung 3-11** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für *nicht-metastasierte Patienten* mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

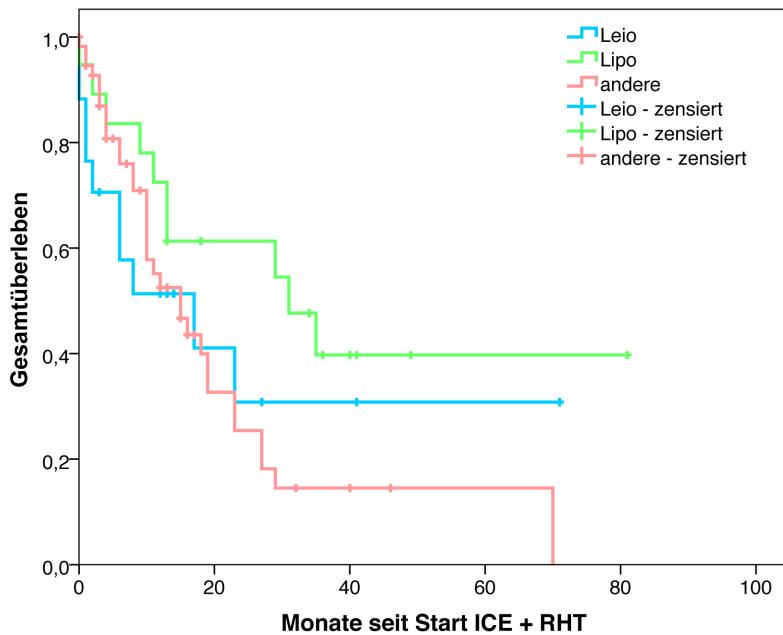
Bei den Patienten, die vor Therapiestart *keine Fernmetastasierung* aufweisen, zeigt sich kein signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des vorliegenden Tumors. Das Gesamtüberleben für Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren ist hier jedoch tendenziell länger als bei Patienten mit mäßig differenzierten Tumoren: Im Median beträgt dieses bei Patienten mit G2-Tumoren 13 Monate (95%-KI 4,2 – 21,8 Monate), bei Patienten mit G3-Tumoren 27 Monate (95%-KI 15,2 – 38,8 Monate).



**Abbildung 3-12** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für *metastasierte Patienten* mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

Für Patienten mit *metastasierter Erkrankung* vor Therapiestart zeigt sich ein signifikanter Unterschied für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des vorliegenden Tumors: Patienten mit mäßig differenziertem Tumor (G2) haben ein signifikant längeres Gesamtüberleben (im Median 31 Monate, 95%-KI 13,9 – 48,1 Monate) im Vergleich zu Patienten mit schlecht differenziertem Tumor (G3; im Median 10 Monate, 95%-KI 7,8 – 12,2 Monate).

Bei Analyse des Gesamtüberlebens nach Bildung von Subgruppen aufgrund der Sarkom-Subentität (Liposarkom vs. Leiomyosarkom vs. andere Subentität) ist eine signifikant längere Überlebenszeit für Patienten mit Liposarkomen zumindest im Vergleich mit Patienten mit Nicht-Lipo-/Nicht-Leiomyosarkomen nachweisbar ( $p=0,035$ ). Leiomyosarkom-Patienten zeigen im Vergleich zu Liposarkom-Patienten ebenso wie im Vergleich zu Patienten mit anderen Subentitäten keine signifikant unterschiedliche Gesamtüberlebenszeit. Die medianen Überlebenszeiten und die Signifikanzlevels können der Tabelle 3-6 entnommen werden, die Überlebenskurven sind in Abbildung 3-13 dargestellt.

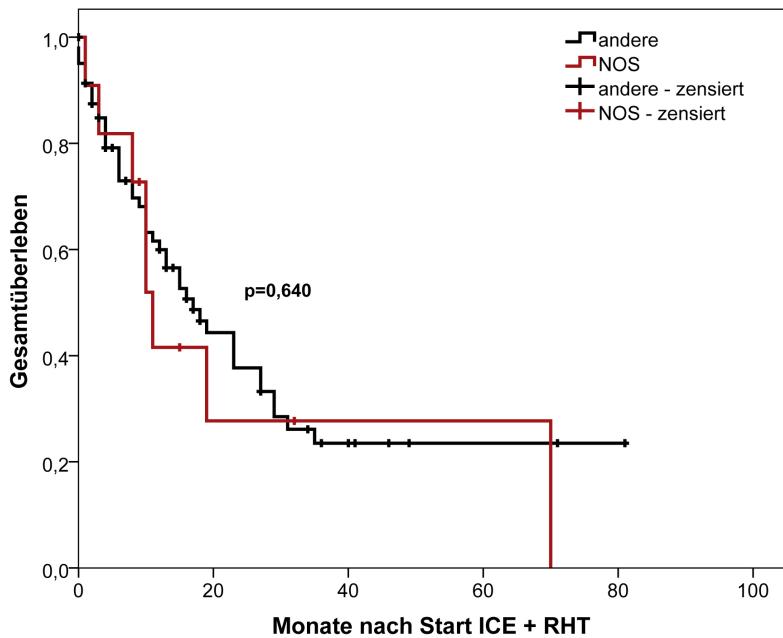


**Abbildung 3-13** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

	Liposarkom	Leiomyosarkom	Andere	p-Wert
Subentität				
Medianes	31 (6,4 – 55,6)	17 (0 – 34,5)	15 (8,3 – 21,7)	
Gesamtüberleben (Monate)				
Lipo vs. Leio				0,236
Leio vs. andere				0,824
<b>Lipo vs. andere</b>				<b>0,035</b>

**Tabelle 3-6** Medianes Gesamtüberleben (95%-Konfidenzintervalle) in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

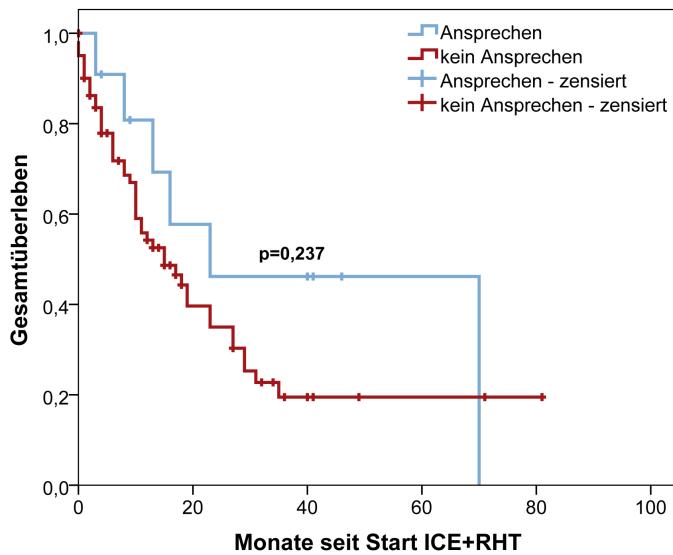
Bei Betrachtung der Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT gezeigt hatten, fiel auf, dass Patienten mit der histologischen Diagnose eines NOS-Sarkoms („not otherwise specified“) relativ viele dieser Patienten ausmachten. In NOS-Sarkomen war eine Ansprechraten von 33% zu dokumentieren (3 x PR), während für die Gesamtpopulation die Ansprechraten mit 13% deutlich niedriger lag. Daraufhin wurde eine Analyse des Gesamtüberlebens der NOS-Patienten im Vergleich zu den Patienten mit anderer Histologie durchgeführt. Die Ergebnisse können Abbildung 3-14 entnommen werden.



**Abbildung 3-14** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für Patienten mit NOS-Sarkom im Vergleich zu Patienten mit anderer Histologie

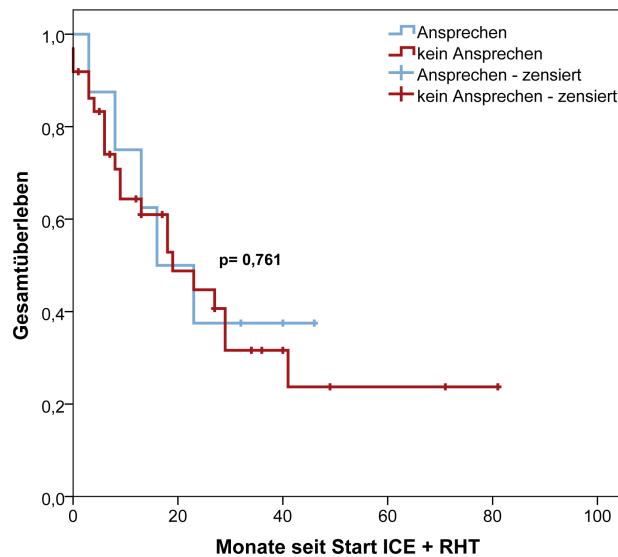
Das Gesamtüberleben für NOS-Patienten war mit im Median 11 Monaten (95%-KI 8,1 – 13,9 Monate) tendenziell kürzer als für Patienten mit anderer Histologie (Median 17 Monate, 95%-KI 10,8 – 23,2 Monate).

Um die Frage zu beantworten, ob ein Ansprechen (PR oder CR) auf die Therapie mit ICE + RHT zu einem längeren Gesamtüberleben der Patienten beitragen kann, wurden Analysen zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Kombinationstherapie durchgeführt. Dabei ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten, die ein objektives Ansprechen unter Therapie zeigen und denjenigen Patienten, bei denen eine Stabilisierung zu erreichen ist oder die einen Progress der Erkrankung erleiden. Im Median beträgt das Gesamtüberleben für Patienten mit Ansprechen auf die Therapie 23 Monate (95%-KI 0 – 53,5 Monate) und ist damit tendenziell länger als für Patienten ohne Ansprechen (im Median 15 Monate, 95%-KI 7,5 – 22,5 Monate, vgl. Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-15** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT

Aufgrund des fehlenden Nachweises eines Überlebensvorteils für Patienten mit Therapieansprechen wurde eine entsprechende Analyse auch ausschließlich für Patienten mit nicht metastasierter Erkrankung durchgeführt, da hier der Anteil an Patienten mit Nachweis eines Therapieansprechens höher ist als für Patienten mit Fernmetastasen. Die Ergebnisse können Abbildung 3-16 entnommen werden.



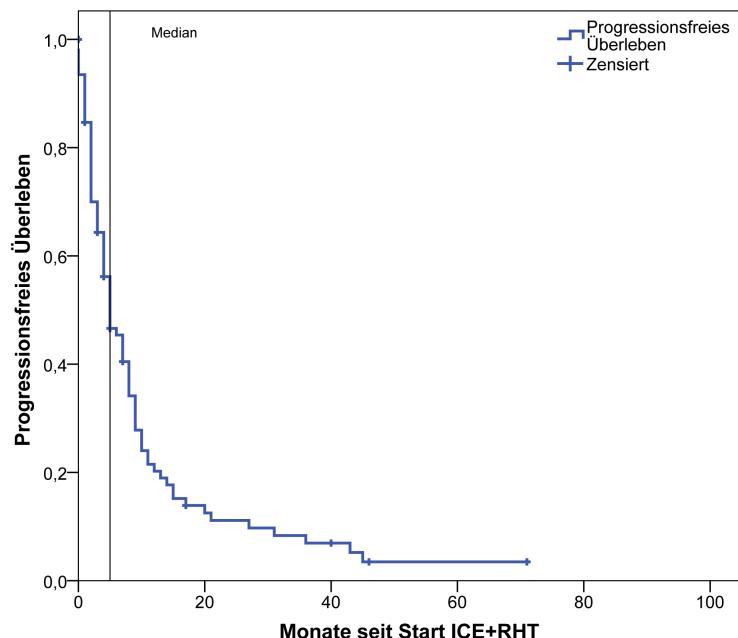
**Abbildung 3-16** Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT in *nicht metastasierten* Patienten

Auch hier zeigt sich kein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten, in denen durch ICE+RHT eine signifikante Tumormassenreduktion erreicht werden konnte. Im Median beträgt das Gesamtüberleben für Patienten ohne Fernmetastasierung nach Ansprechen auf die Therapie 16 Monate (95%-KI 2,1 – 29,9 Monate). Das Gesamtüberleben für Patienten ohne Ansprechen erreicht 19 Monate (95%-KI 7,8 – 30,2 Monate).

### 3.2.5.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Zur Berechnung des progressionsfreien Überlebens wurden sowohl eine Progredienz oder das Wiederauftreten eines lokalen Tumors als auch das Auftreten oder das signifikante Größenwachstum von Metastasen bei bereits vorbestehender Metastasierung als Ereignis gewertet. Der Tod des Patienten war ebenfalls ein Ereignis, das in der Berechnung des PFS Beachtung fand. Die Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben aller untersuchten Patienten ist in Abbildung 3-17 dargestellt.

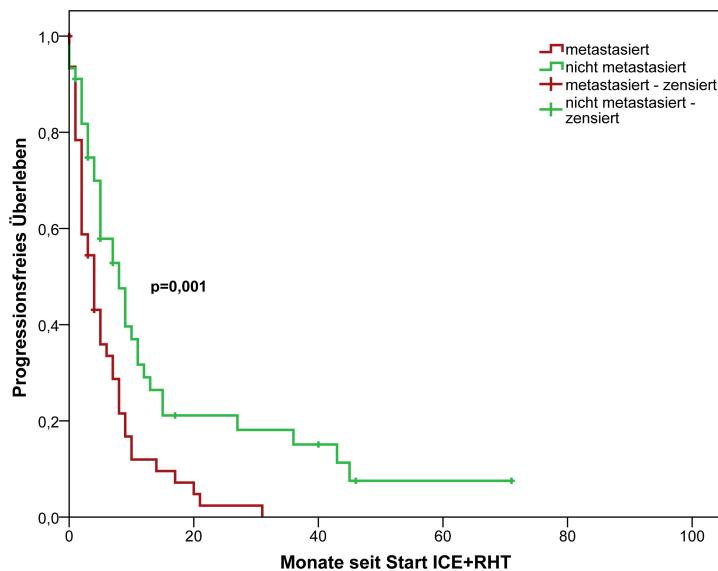
Das mediane progressionsfreie Überleben für alle untersuchten Patienten betrug 5 Monate (95%-KI 3,0 – 7,0 Monate).



**Abbildung 3-17**  
Patienten

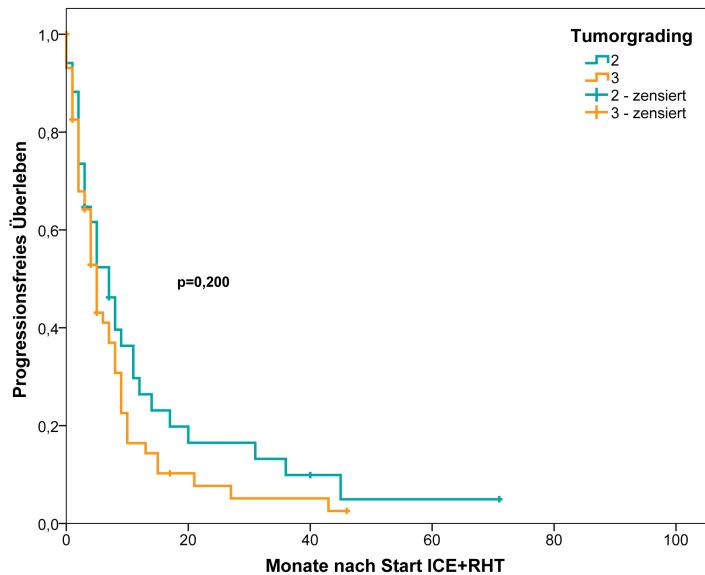
Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben für alle untersuchten

Bei Vergleich der bereits vor Therapiestart metastasierten Patienten mit der nicht-metastasierten Patientengruppe zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied: Patienten mit Metastasen zum Zeitpunkt des Therapiestarts haben ein medianes progressionsfreies Überleben von 4 Monaten (95%-KI 2,2 – 5,8 Monate), während für nicht metastasierte Patienten mit im Median 8 Monaten (95%-KI 4,6 – 11,4 Monate) ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben zu dokumentieren ist ( $p=0,001$ ). Die entsprechenden Kurven finden sich in Abbildung 3-18.



**Abbildung 3-18** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte (grün) und metastasierte Patienten (rot)

Der Unterschied im PFS für Patienten mit G2- und mit G3-Tumoren ist nicht signifikant. Im Median ist der progressionsfreie Zeitraum bei Patienten mit mäßig differenzierten Tumoren (G2-Gruppe; Median 7 Monate, 95%-KI 3,9 – 10,1 Monate) erneut tendenziell länger als bei Patienten mit schlecht differenzierten Weichteilsarkomen (G3-Gruppe; Median 5 Monate, 95%-KI 3,7 – 6,3 Monate). Die Kaplan-Meier-Kurven zu den Berechnungen finden sich in Abbildung 3-19.

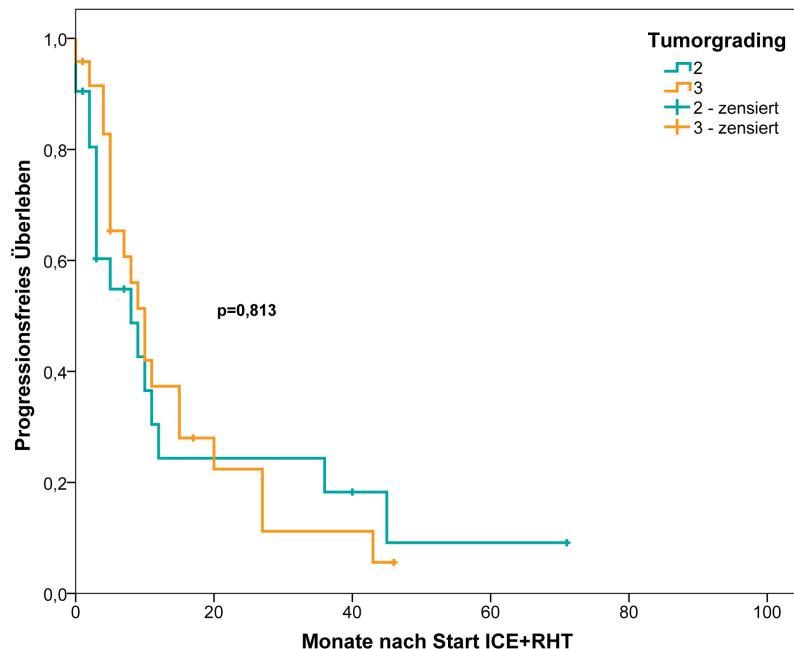


**Abbildung 3-19** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für Patienten mit G2-(türkis) und G3-Tumoren (orange)

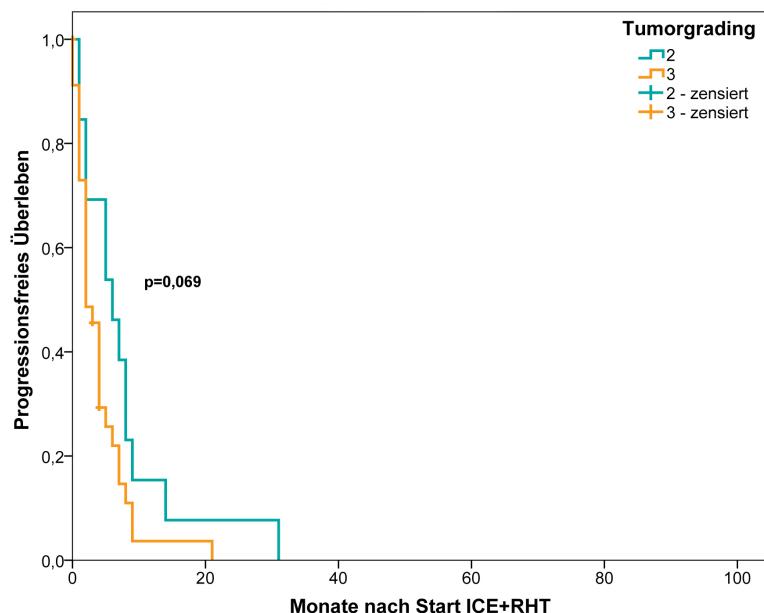
Auch für das progressionsfreie Überleben wurden wieder weiterführende Analysen in den Subgruppen der nicht-metastasierten und metastasierten Patienten hinsichtlich der Unterschiede bei Vorliegen eines G2- oder G3-Tumors durchgeführt. Die Ergebnisse können den Abbildungen 3-20 und 3-21 entnommen werden.

Für Patienten mit *nicht-metastasierter* Erkrankung beträgt das mediane progressionsfreie Überleben bei Diagnose eines mäßig differenzierten Tumors (G2) 8 Monate (95%-KI 0,3 – 15,7 Monate), bei schlecht differenziertem Tumor (G3) 10 Monate (95%-KI 7,1 – 12,9 Monate). Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Auch bei Patienten mit *metastasierter* Erkrankung ergibt sich kein signifikanter Unterschied: Patienten mit G2-Tumoren erreichen eine progressionsfreie Überlebenszeit von im Median 6 Monaten (95%-KI 1,6 – 10,4 Monate), bei Patienten mit G3-Tumoren ist diese mit 2 Monaten (95%-KI 0,8 – 3,2 Monate) tendenziell kürzer.

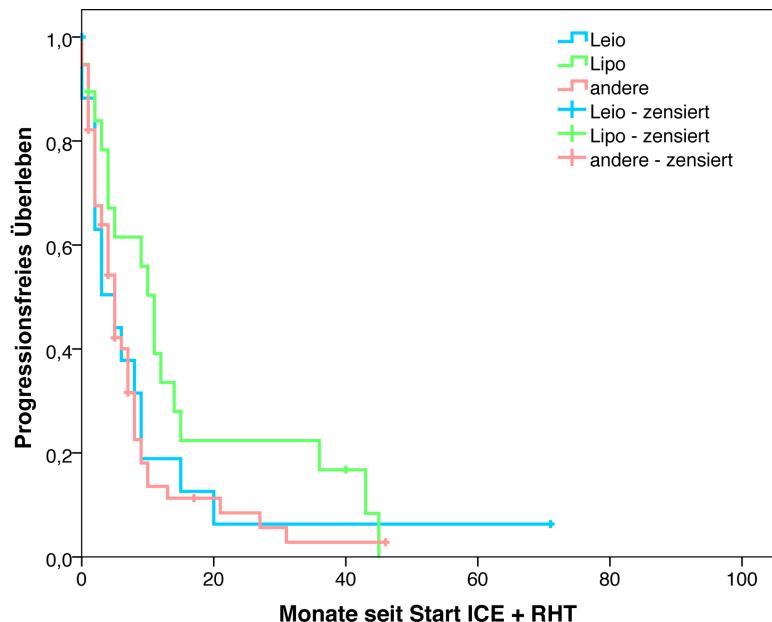


**Abbildung 3-20** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für *nicht-metastasierte Patienten* mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)



**Abbildung 3-21** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für *metastasierte Patienten* mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

In der Betrachtung des progressionsfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp ist diese für Liposarkome im Vergleich zu anderen Subentitäten erneut signifikant länger ( $p=0,041$ ); abgesehen davon finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 3-22 und Tabelle 3-7).

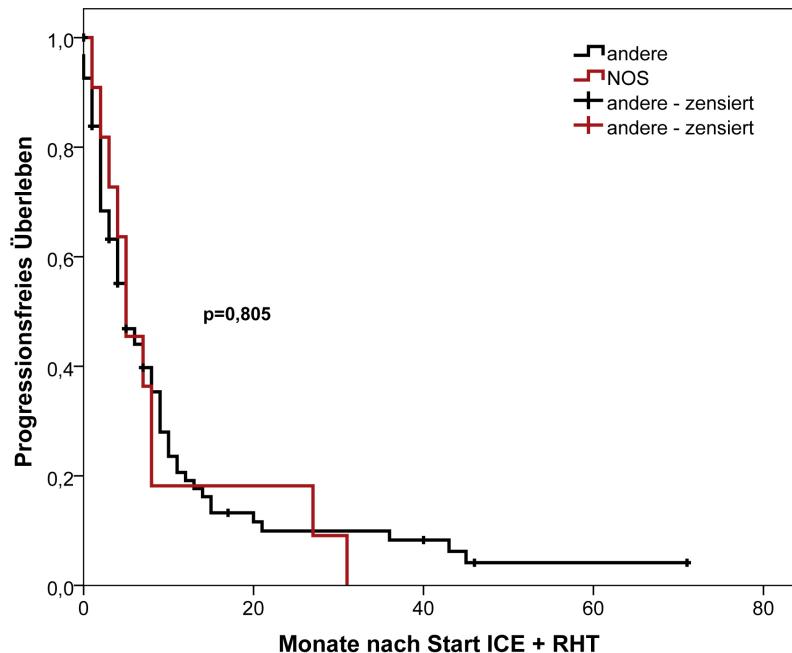


**Abbildung 3-22** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

	Liposarkom	Leiomyosarkom	Andere	p-Wert
	Subentität			
<b>MedIANES</b>	11 (8,3 – 13,7)	5 (1,1 – 8,8)	5 (83,8 – 6,2)	
<b>progressionsfreies Überleben (Monate)</b>				
<b>Lipo vs. Leio</b>				0,262
<b>Leio vs. andere</b>				0,855
<b>Lipo vs. andere</b>				<b>0,041</b>

**Tabelle 3-7** Medianes progressionsfreies Überleben (95%-Konfidenzintervalle) in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

Auch das progressionsfreie Überleben für Patienten mit NOS-Histologie wurde mit dem PFS anderer Subentitäten verglichen (siehe Abbildung 3-23). Auch hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Das PFS beträgt für NOS-Patienten im Median 5 Monate (95%-KI 1,8 – 8,2 Monate), während es für Patienten mit anderer Histologie ebenfalls 5 Monate beträgt (95%-KI 3,0 – 7,0 Monate)



**Abbildung 3-23** Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für Patienten mit NOS-Sarkom im Vergleich zu Patienten mit anderer Histologie

### 3.2.5.3 Progressionsfreie Überlebensrate (PFR)

Für die Bestimmung der progressionsfreien Überlebensrate wird der Anteil der Patienten, die nach einem definierten Zeitintervall nach Start der Behandlung mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie keine Progression zeigen, in Relation zu allen untersuchten Patienten berechnet. Hierbei gilt der Tod des Patienten nicht als Ereignis, das heißt nur Patienten mit dokumentiertem Fortschreiten der Erkrankung gehen in die Berechnung mit ein. Todesfälle ohne vorhergehenden Progress werden censiert. In dieser Arbeit betrifft dies ausschließlich Patienten mit therapieassoziiertem Todesursache, also nur drei Patienten. Entsprechend gering sind die Unterschiede zum PFS. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3-8 zu entnehmen.

**Progressionsfreie Überlebensrate (PFR)**

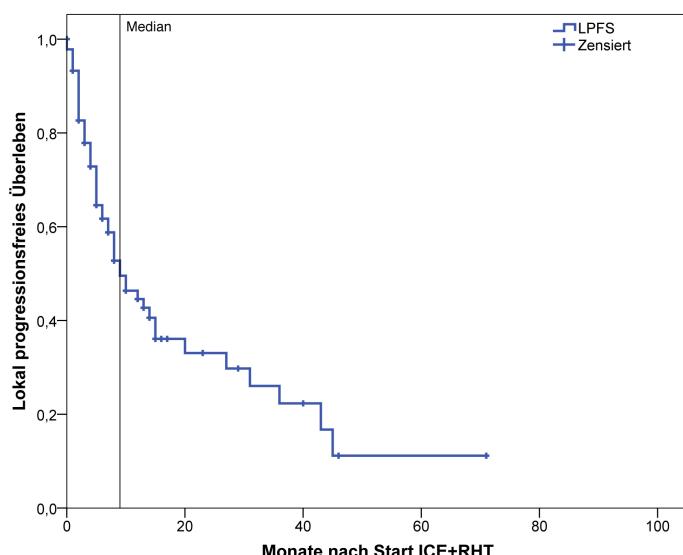
	<b>Nach 3 Monaten</b>	<b>Nach 6 Monaten</b>	<b>Nach 12 Monaten</b>
<b>Lokal fortgeschritten</b> <b>(n=45)</b>	80,8 %	65,1 %	32,7 %
<b>Lokal fortgeschritten + metastasiert</b> <b>(n=47)</b>	56,9 %	35,0 %	12,5 %
<b>Alle Patienten</b> <b>(n=92)</b>	68,5 %	49,6 %	22,1 %

**Tabelle 3-8** Progressionsfreie Überlebensrate nach 3, 6 und 12 Monaten für alle Patienten und die Subgruppen mit metastasierter und nicht-metastasierter Erkrankung

**3.2.5.4 Lokal progressionsfreies Überleben (LPFS)**

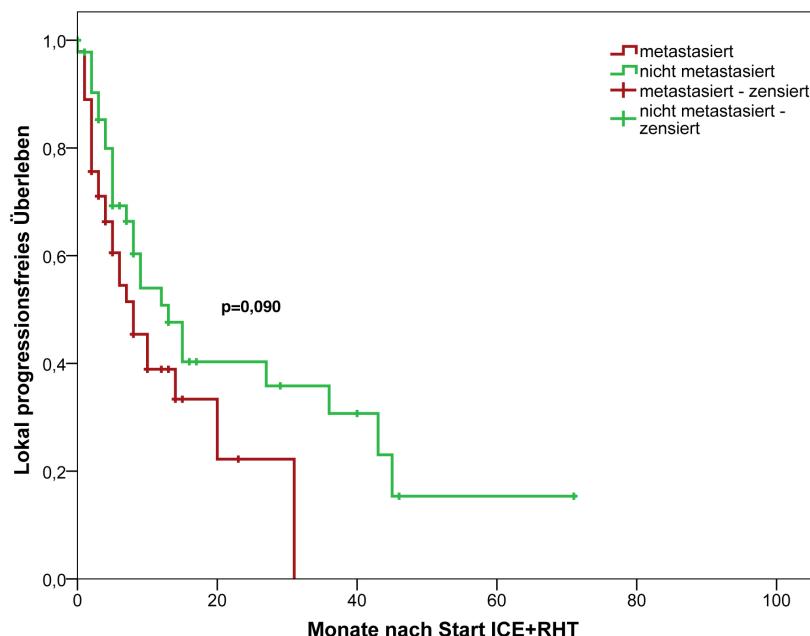
Das lokal progressionsfreie Überleben, bei dem nur ein Lokalrezidiv oder ein Progress des lokalen Tumors als Ereignis gewertet wurde, wurde berechnet, um den Grad der lokalen Kontrolle der Erkrankung zu erfassen. Dies ist von Bedeutung, weil mit Hinzunahme der RHT-Behandlung ein lokales Therapieverfahren bei den untersuchten Patienten Anwendung fand. Subanalysen wurden durchgeführt, um Patientengruppen zu identifizieren, die besonders von der Hyperthermiebehandlung (als mutmaßlich wirksame lokale Therapiemaßnahme) profitierten.

Im Median betrug das LPFS 9 Monate für alle Patienten (95%-KI 5,0 – 13,0 Monate). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist Abbildung 3-24 zu entnehmen.

**Abbildung 3-24**

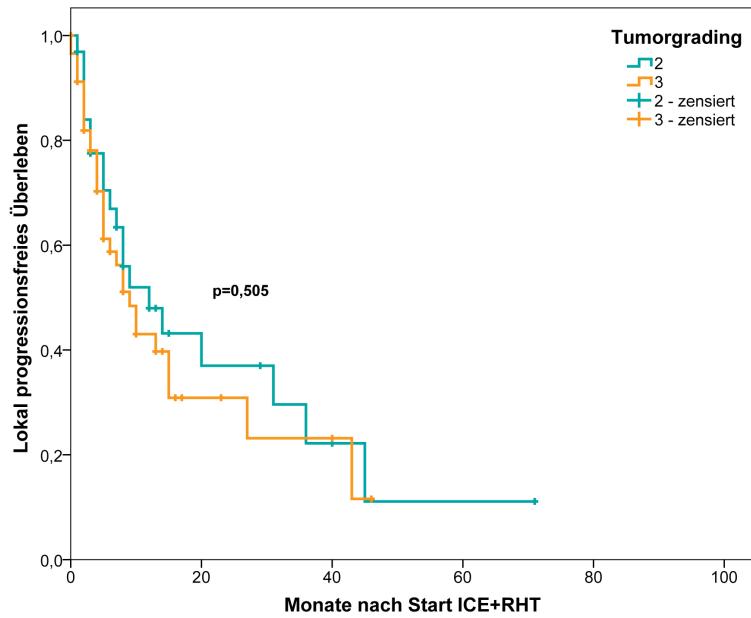
Kaplan-Meier-Kurve zum lokal progressionsfreien Überleben für alle Patienten

Zum Vergleich der Kurven bei vor Therapiestart metastasierten und nicht metastasierten Patienten ist Abbildung 3-25 eingefügt. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied des lokal progressionsfreien Überlebens bei den entsprechenden Patientengruppen ( $p=0,090$ ). Im Median war die Zeit bis zum lokalen Progress der Erkrankung bei metastasierten Patienten mit 8 Monaten (95%-KI 4,3 – 11,7 Monate) tendenziell kürzer als bei Patienten ohne Nachweis von Fernmetastasen, wo im Median nach 13 Monaten (95%-KI 7,1 – 18,8 Monate) eine lokale Progredienz nachzuweisen war.



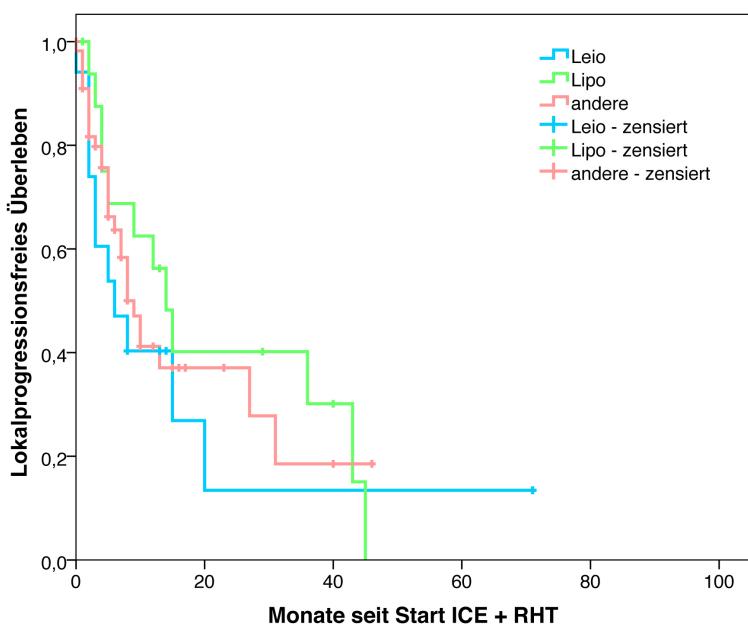
**Abbildung 3-25** Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte (grün) und metastasierte Patienten (rot)

Die Analyse der LPFS in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors erbringt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede: bei Patienten mit mäßig differenziertem Tumor (G2) beträgt das lokal progressionsfreie Überleben im Median 12 Monate (95%-KI 3,3 – 20,7 Monate), während es bei Diagnose eines schlecht differenzierten Tumors 9 Monate beträgt (95%-KI 5,7 – 12,3 Monate). Die entsprechenden Kurven können der Abbildung 3-26 entnommen werden.



**Abbildung 3-26** Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben für Patienten mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

Auch in der Analyse in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp ergeben sich für das lokale progressionsfreie Überleben keine signifikanten Unterschiede. Die Überlebenszeit ist erneut für Liposarkom-Patienten tendenziell länger. Die entsprechenden Kurven, Mediane und Signifikanzlevels können der Abbildung 3-27 und der Tabelle 3-9 entnommen werden.



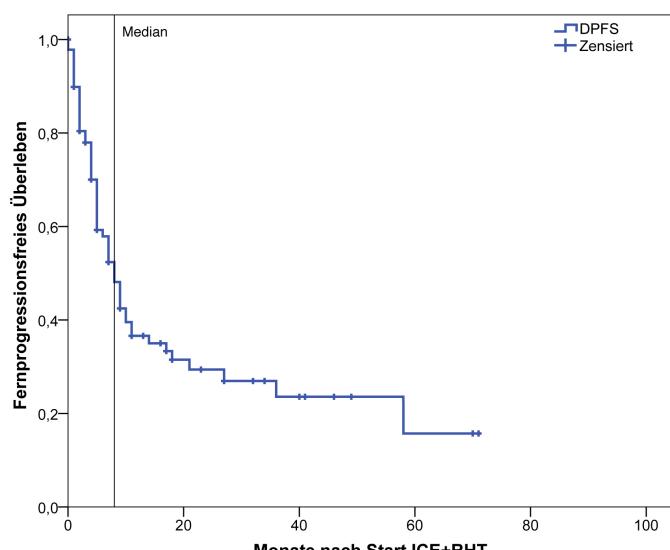
**Abbildung 3-27** Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

	Liposarkom	Leiomyosarkom	Andere Subentität	p-Wert
<b>Medianes lokal progressionsfreies Überleben (Monate)</b>	14 (9,3 – 18,7)	6 (0– 12,3)	9 (6,3 – 11,7)	
<b>Lipo vs. Leio</b>				0,389
<b>Leio vs. andere</b>				0,458
<b>Lipo vs. andere</b>				0,503

**Tabelle 3-9** Medianes lokal progressionsfreies Überleben (95%-Konfidenzintervalle) in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

### 3.2.5.5 Fernprogressionsfreies Überleben (DPFS)

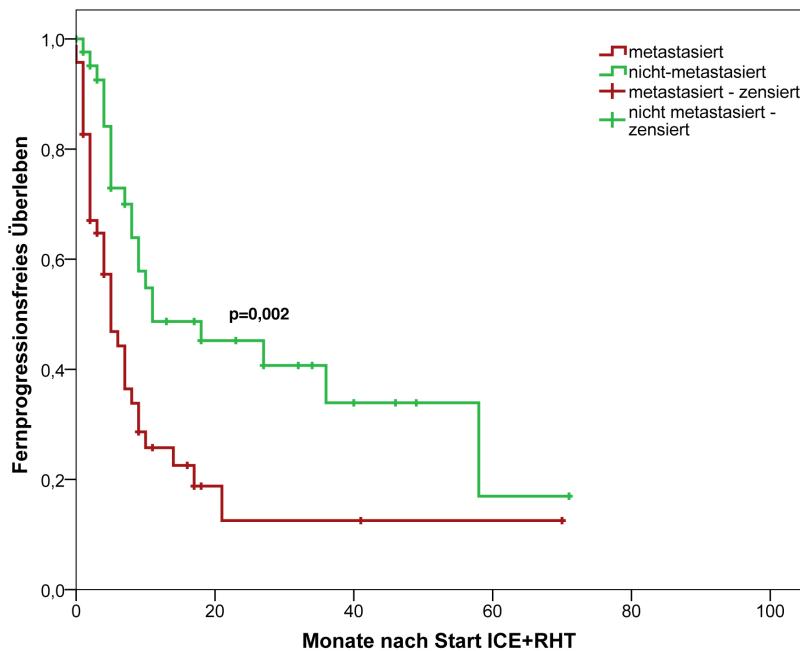
Die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen beziehungsweise bis zum Nachweis einer Größenzunahme bestehender Metastasen ermöglicht, betrachtet im Vergleich zum LPFS, eine Abschätzung des Einflusses der RHT-Behandlung auf den Gesamtbehandlungserfolg. Die Angaben zum fernprogressionsfreien Überleben beziehen alle Progressionsereignisse mit ein, die nicht an der ursprünglichen Tumorlokalisation dokumentiert wurden. Diese Ereignisse umfassen also sowohl das Neuauftreten von Fernmetastasen (bei allen Patienten) als auch die Progression von bereits bestehenden Metastasen (bei Patienten mit im Vorfeld dokumentierter Fernmetastasierung). Die Ergebnisse für alle Patienten sind der Abbildung 3-28 zu entnehmen.



**Abbildung 3-28** Kaplan-Meier-Kurve zum fernprogressionsfreien Überleben für alle Patienten

Im Median betrug die Zeit bis zum Neuaufreten von Fernmetastasen oder bis zum Progress einer bestehenden Metastasierung 8 Monate (95%-KI 5,8 – 10,2 Monate).

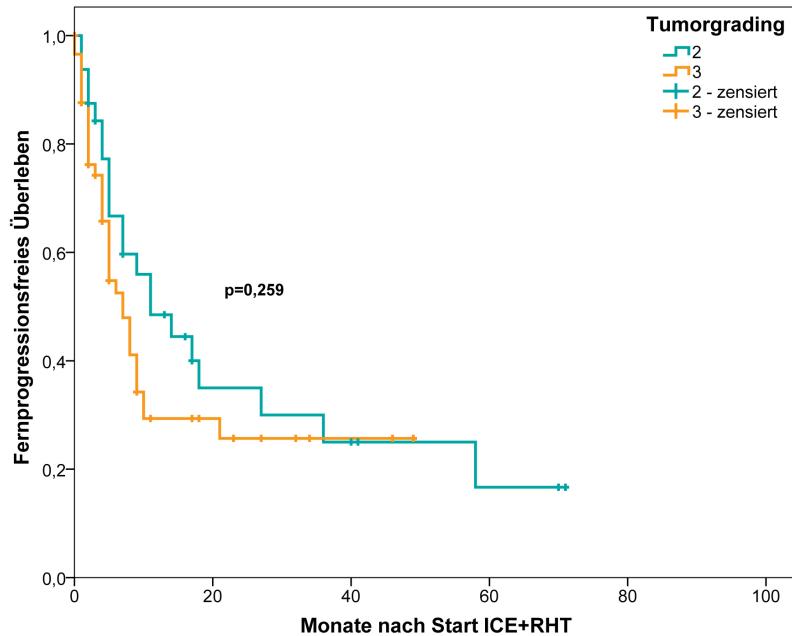
Abbildung 3-29 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das fernprogressionsfreie Überleben für Patienten ohne Nachweis von Fernmetastasen und für Patienten mit bestehender Fernmetastasierung vor Therapiestart im Vergleich. Hier zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ( $p=0,002$ ): die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen war bei Patienten ohne initial nachweisbare Metastasierung mit im Median 11 Monaten (95%-KI 0 – 28,6 Monate) signifikant länger als bei Patienten, bei denen vor Therapiestart eine Metastasierung nachweisbar war. Bei diesen Patienten war im Median nach 5 Monaten (95%-KI 2,7 – 7,3 Monate) ein Progress der Metastasierung festzustellen.



**Abbildung 3-29** Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte (grün) und metastasierte Patienten (rot)

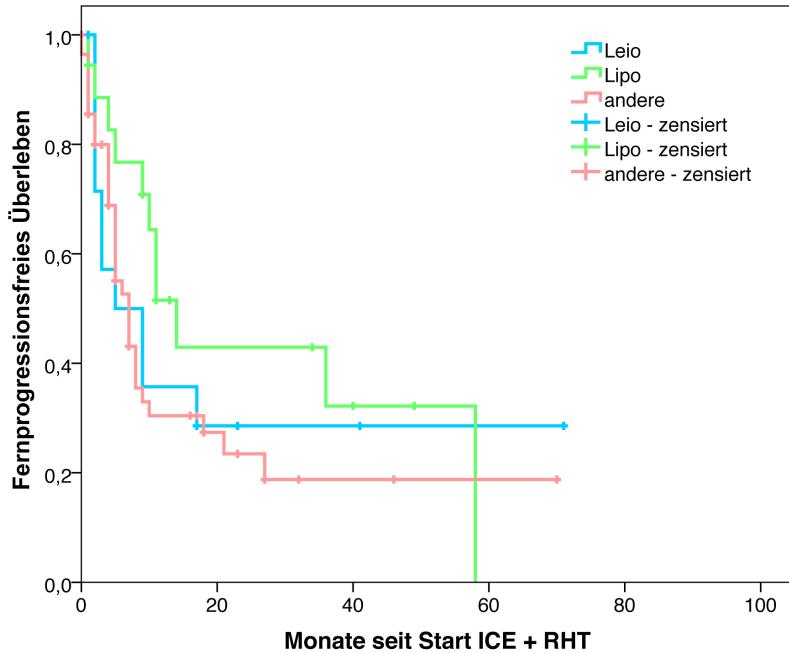
Die Analyse des fernprogressionsfreien Überlebens in Abhängigkeit von Differenzierungsgrad des vorliegenden Tumors erbringt keine signifikanten Unterschiede. Patienten mit mäßig differenziertem Primärtumor haben eine fernprogressionsfreie Überlebenszeit von im Median 11 Monaten (95%-KI 3,0 – 19,0 Monate), während diese bei Patienten mit schlecht differenziertem Tumor (G3)

sieben Monate (95%-KI 4,7 – 9,3 Monate) beträgt. In Abbildung 3-30 sind die Überlebenskurven dargestellt.



**Abbildung 3-30** Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben für Patienten mit G2- (türkis) und G3-Tumoren (orange)

Bei Betrachtung des fernprogressionsfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen. Erneut liegt die mediane fernprogressionsfreie Überlebenszeit bei Liposarkomen tendenziell höher als für die beiden anderen Subgruppen. Die entsprechenden Kurven, Mediane und Signifikanzlevels können der Abbildung 3-31 und der Tabelle 3-10 entnommen werden.



**Abbildung 3-31** Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

	Liposarkom	Leiomyosarkom	Andere Subentität	p-Wert
<b>Medianes lokal progressionsfreies Überleben (Monate)</b>	14 (9,3 – 18,7)	5 (0– 12,3)	7 (4,6 – 9,4)	
<b>Lipo vs. Leio</b>				0,481
<b>Leio vs. andere</b>				0,803
<b>Lipo vs. andere</b>				0,103

**Tabelle 3-10** Medianes fernprogressionsfreies Überleben (95%-Konfidenzintervalle) in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

## 4 Die Funktion natürlicher Killerzellen in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen

Wie unter Abschnitt 2.2.2 (S. 40) ausgeführt, wird in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese postuliert, dass eine Hyperthermiebehandlung zu einer messbaren Zunahme der lytischen Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut führt. Die hierzu durchgeführten Experimente sollen in ihrer Methodik und in ihren Ergebnissen auf den folgenden Seiten dargestellt werden.

### 4.1 Material und Methoden

Zur Ermittlung der lytischen Aktivität der NK-Zellen wurden die Lymphozyten (*peripheral blood lymphocytes*, PBL) von Patienten und gesunden Spendern aus Vollblut isoliert und mittels der Methode des  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Assays untersucht. Die entsprechenden Arbeitsschritte werden im Folgenden erklärt.

#### 4.1.1 Patienten- und Spenderproben

Bei Patienten, die am Klinikum Großhadern oder der Argirov Klinik Starnberger See aufgrund der Diagnose eines Sarkoms mit antineoplastischen Chemotherapeutika behandelt wurden, wurde Blut durch venöse Punktionsentnommen. Die gewonnenen Blutproben, im Regelfall ca. 35 ml, wurden in EDTA-Blutentnahmeflaschen antikoaguliert und ungekühlt der weiteren Verarbeitung zugeführt.

Alle beteiligten Patienten erklärten durch Unterschrift unter der im Anhang einzusehenden Erklärung (S. 175) ihr Einverständnis mit der Weiterverarbeitung und Analyse der von ihnen gewonnenen Proben.

Es wurden Proben von unterschiedlichen Patientenkollektiven gesammelt:

- *Nicht-Erstlinien-Patienten*: Patienten, bei denen ein Weichteilsarkom histologisch nachgewiesen worden war und die bereits chemotherapeutisch vorbehandelt waren. Bei Progress oder Persistenz der Grunderkrankung war die Indikation für eine erneute chemotherapeutische Behandlung durch die behandelnden Ärzte gestellt worden. Diese erneute Behandlung wurde mit Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid analog des ICE-Protokolls, im Regelfall in Kombination mit regionaler Hyperthermie, durchgeführt.

- *Erstlinienpatienten:* Patienten, bei denen die (Erst-)Diagnose eines Weichteilsarkoms gestellt worden war, das operativ nicht definitiv zu versorgen war (lokale Inoperabilität oder inadäquate Resektion des Tumors im Sinne einer R1- oder R2-Resektion). Bei diesen Patienten wurde ebenfalls die Indikation zur chemotherapeutischen Behandlung durch die behandelnden Ärzte gestellt, die sodann Doxorubicin und Ifosfamid (AI-Protokoll) oder mit Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin (EIA-Protokoll) in Kombination mit regionaler Hyperthermie durchgeführt wurde.

Die Blutentnahmen bei Patienten erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Abbildung 4-1):

- Bei *Erstlinienpatienten* wurde einmalig Blut unmittelbar vor Beginn der Chemotherapie entnommen.
- Bei *Nicht-Erstlinienpatienten* erfolgten mehrere Blutentnahmen im Laufe der Therapie. Eine erste Blutentnahme erfolgte ebenfalls unmittelbar vor Beginn der Zweitlinien-Chemotherapie; darüber hinaus wurde unmittelbar nach der zweiten Hyperthermiebehandlung des jeweiligen Zyklus (also im Regelfall an Tag 3 des Zyklus) Blut entnommen. Diese Blutentnahmen erfolgten im ersten und zweiten Therapiezyklus, danach dann bei jedem zweiten Zyklus (also im vierten und sechsten Zyklus) bis Therapieende oder -abbruch.

Durch Anwendung dieses Schemas war es möglich, bei Zweitlinienpatienten eine Kinetik der NK-Aktivität einerseits im kurzfristigen Verlauf unter chemotherapeutischer Behandlung und auch im längerfristigen Verlauf über mehrere Monate zu bestimmen.

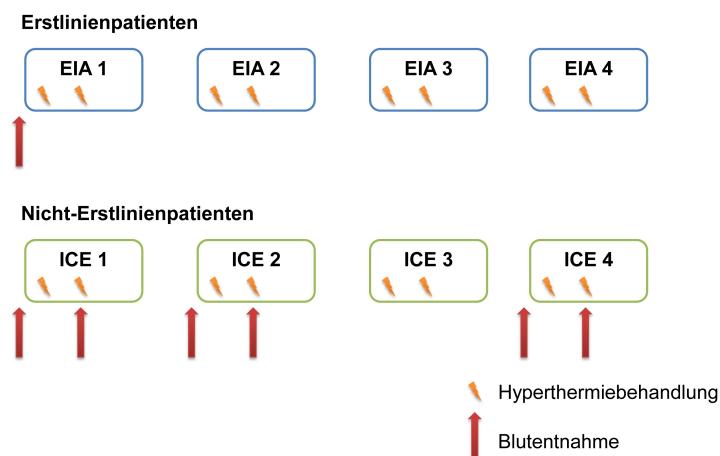


Abbildung 4-1

Zeitpunkt der Blutentnahmen unter Therapie mit ICE + RHT

Darüber hinaus wurden Proben von gesunden Spendern entnommen, um Referenzwerte für die NK-Zell-Funktion zu erhalten. Diese gesunden Spender rekrutierten sich aus den Mitarbeitern der Klinischen Kooperationsgruppe Hyperthermie am HelmholtzZentrum München. Durch venöse Blutentnahme wurden ca. 200 ml Blut gewonnen; die anschließend isolierten PBL wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Durchführung der Versuche wurden sie am Vortag aufgetaut und dann über Nacht in Medium gelagert.

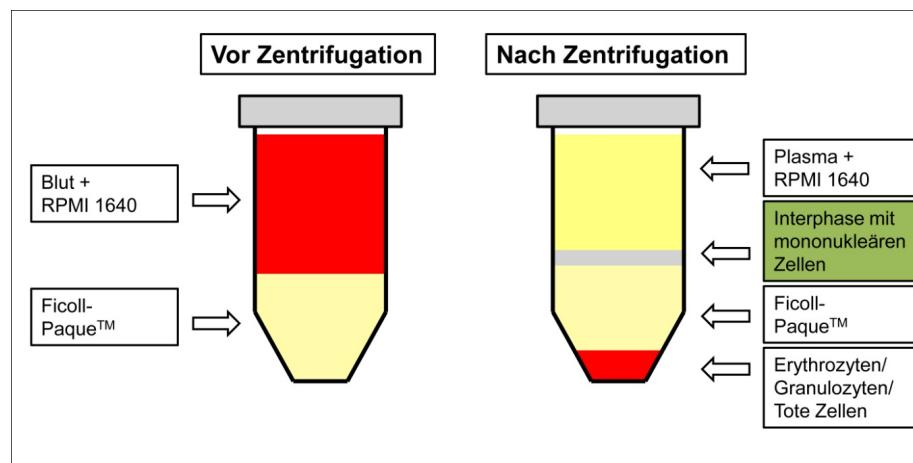
#### **4.1.2 Isolierung der PBL aus Patienten- und Spenderproben mittels Dichtegradientenzentrifugation**

##### Material:

EDTA-Monovette zur Blutentnahme, 9 ml, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland  
BD Falcon 50 ml, BD Biosciences, Canaan, USA  
Rotina 420 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland  
RPMI 1640-Zellkulturmedium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Pancoll human Zellseparationsmedium, Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

##### Methode:

Das von Patienten und Spendern entnommene Blut wurde am Tag der Blutentnahme weiterverarbeitet. Hierzu wurde das mit EDTA antikoagulierte Vollblut im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640-Zellkulturmedium versetzt. Jeweils 30 ml dieses Gemisches wurden auf 20 ml Pancoll-Separationsmedium geschichtet. Daraufhin wurde 25 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert.



**Abbildung 4-2** Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

## Die Funktion natürlicher Killerzellen in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen

Durch die Dichtegradientenzentrifugation werden mononukleäre Zellen, also Lymphozyten und Monozyten, in der Interphase zwischen Plasma-Zellmedium-Gemisch und Separationsmedium konzentriert. Diese Interphase („buffy coat“) wurde vorsichtig abpipettiert, die so gewonnenen Zellen wiederum in RPMI 1640-Medium aufgenommen und erneut für 7 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands erfolgte die Resuspension des Pellets in Kulturmedium.

### **4.1.3 Zellkultur**

#### Material:

Nunclon surface Zellkulturflaschen (75/25 cm<sup>2</sup>), Nunc, Roskilde, Dänemark

Nunclon surface 12-well Kulturplatten, Nunc, Roskilde, Dänemark

Nunc CryoTube Vials 1,8 ml, Nunc, Roskilde, Dänemark

Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene, Roskilde, Dänemark

RPMI 1640-Zellkulturmedium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fetales Kälberserum (FCS), Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

Penicillin/Streptomycin-Stocklösung (PenStrep), Gibco, Darmstadt, Deutschland

L-Glutamin, Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

Aminosäuren (BME solution), Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

Interleukin 2 human, Gibco, Darmstadt, Deutschland

TKD (Oligopeptid, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Multhoff, Technische Universität München)

#### Medien:

RPMI 1640	500 ml
+ Fetales Kälberserum (FCS)	50 ml
+ Penicillin/Streptomycin-Stocklösung	10 ml
+ L-Glutamin	10 ml

**Tabelle 4-1** PBL-Kulturmedium

Fetales Kälberserum (FCS)	10 ml
+ DMSO	1 ml

**Tabelle 4-2** Einfriermedium

RPMI 1640	500 ml
+ Fetales Kälberserum (FCS)	50 ml
+ Penicillin/Streptomycin-Stocklösung	10 ml
+ L-Glutamin	10 ml
+ Aminosäuren	10 ml

Tabelle 4-3

K562-Kultumedium

Methode:

PBL und K562-Zellen wurden zur Vorbereitung der Versuche in Kulturmedien suspendiert. Die Zusammensetzung der Medien ist den Tabellen oberhalb zu entnehmen. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank in Kulturflaschen inkubiert.

K562-Zellen sind Zellen einer erythroleukämischen Tumorzelllinie, die in Suspensionskultur gehalten werden können. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei oben genannten Bedingungen inkubiert. Für die K562-Zellen wurde regelmäßig ein Tausch des Mediums vorgenommen, üblicherweise alle drei bis vier Tage, um die Stoffwechselaktivität und die Mitroserate dieser Zellen hoch zu halten. Dazu wurden die Zellen dann in einer Konzentration von ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml Medium neu in Kulturflasche aufgenommen. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde hierfür auf 2-3 Aliquots verteilt, diese wurden abzentrifugiert (1400 rpm für 7 Minuten), der Überstand wurde verworfen und die Zellen im ursprünglichen Medienvolumen (in der Regel 20 ml) resuspendiert. Da es sich um Zellen handelt, die nicht-adhären im Medium kultiviert werden, war keine Trypsinierung nötig. Am Tag vor der Durchführung von <sup>51</sup>Chrom-Freisetzung-Assays wurden die Zellen stets gesplittet.

PBL wurden nach ihrer Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation in einer Konzentration von 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml Medium resuspendiert und über Nacht inkubiert. Anschließend konnten die Aktivitätsassays durchgeführt werden. Für PBL-Kulturen wurde das Medium üblicherweise nicht erneuert, da Versuche mit den PBL spätestens am fünften Tag nach Isolation erfolgten, wenn Stimulationsassays durchgeführt wurden.

War die Einhaltung dieses Zeitplans nicht möglich oder handelte es sich um PBL von gesunden Spendern, erfolgte die Vorbereitung zur Lagerung der PBL bei -80°C durch Aufnahme in Einfriermedium: Nach der Herstellung von Aliquots der PBL mit Zellzahlen von  $20 \times 10^6$  pro Aliquot erfolgte die Zentrifugation bei 1400 rpm für 7 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Eis schnell in 1 ml gekühltem (4°C) Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in Lagerungstubes überführt, die dann sofort in Einfrierhilfen zur Sicherung einer gleichmäßigen Abkühlgeschwindigkeit in den Gefrierschrank (-80°C) verbracht wurden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad (37°C); zur Vermeidung einer übermäßigen DMSO-Toxizität wurde das Aliquot sofort nach dem Auftauen in 40 ml RPMI 1640-Zellkulturmedium verdünnt. Diese Zellsuspension wurde für 7 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBL-Kulturmedium resuspendiert. Nach Zählung der viablen Zellen erfolgte dann eine Verdünnung auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Medium. Vor der Durchführung von Versuchen mit diesen PBL wurden sie über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Neben der Bestimmung der unstimulierten lytischen Aktivität der PBL, die die Zellen auch direkt nach Isolation aus dem peripheren Blut und Inkubation in Zytokin-freiem Medium zeigen, sollten auch Stimulationsversuche durchgeführt werden. Diese Stimulation erfolgte durch Zusatz von Interleukin 2 (IL-2, siehe Abschnitt 1.2.4, S. 32) zum Kulturmedium alleine oder durch Zusatz von IL-2 und TKD, einem 14-mer-Peptidderivat von Hsp70 (siehe Abschnitt 1.25, S. 33). Es wurden unterschiedliche IL-2-Konzentrationen (1000 U/ml, 100 U/ml, 25 U/ml, 0 U/ml) verwendet. Die zugesetzte TKD-Menge war für jeden TKD-haltigen Stimulationsansatz dagegen konstant und entsprach den Vorgaben aus der Literatur (2 µg/ml).(137) Die Zellen wurden nach Herstellung der Stimulationsmedien in definierter Konzentration ( $5 \times 10^6$ / ml Medium) für 96 Stunden in 12-well-Kulturplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen aus den Wells abpipettiert und für 7 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in normalem PBL-Zellkulturmedium ohne Zusatz von Stimulationsagenzien resuspendiert und den weiteren Versuchen zugeführt

#### 4.1.4 Zellzählung

##### Material:

Neubauer improved Zählkammer, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland  
Trypanblau 0,4%, Gibco, Darmstadt, Deutschland

##### Methode:

Zur Zählung der viablen Zellen wurde eine Standard-Zellzählkammer verwendet. Zunächst wurde die zu zählende Zellsuspension im Verhältnis 1:4 mit Trypanblau versetzt und dieses Gemisch in die Zählkammer eingebracht. Nur viable, also ungefärbte Zellen wurden gezählt. Nach der Auszählung von mindestens 4 Kleinquadrate (mindestens 8 Kleinquadrate zur Bestimmung der PBL-Zellzahl) wurden die Ergebnisse gemittelt und so die Zellkonzentration in der Suspension bestimmt.

#### 4.1.5 $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung-Assay

##### Material:

BD Falcon 15 ml, BD Biosciences, Canaan, USA  
Nunclon surface 96 U-Mikrowellplatten, Nunc, Roskilde, Dänemark  
LumaPlate, Szintillator-beschichtete 96-well-Platte, PerkinElmer, Waltham, USA

##### Methode:

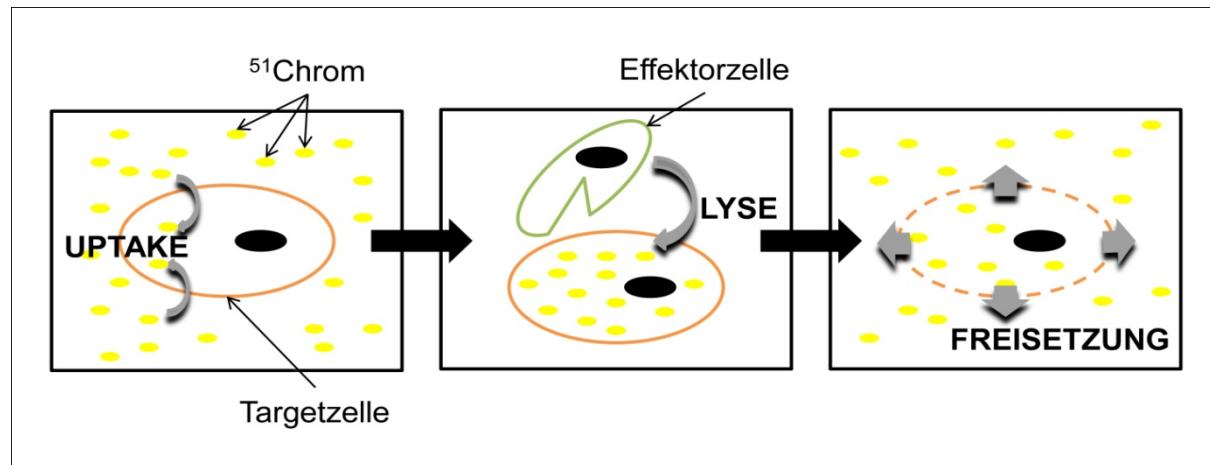


Abbildung 4-3 Prinzip des  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Assays

Ziel des  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung-Assays ist die Messung der lytischen Aktivität von Effektorzellen gegenüber Targetzellen. In dieser Arbeit wurden als Effektorzellen Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) eingesetzt; als Targetzellen dienten K562-Zellen. Bei K562-Zellen handelt es sich um Zellen, die einerseits keine MHC-Antigene der Klasse I auf der Zelloberfläche exprimieren, andererseits aber Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) an der Zelloberfläche präsentieren.(15) Damit sind K562-Zellen klassische Zielzellen für NK-Zellen, da diese gemäß der *missing-self*-Theorie (siehe 1.2.2, S. 30) Zellen lysieren, die keine MHC-I-Antigene präsentieren. Darüber hinaus wurde eine Expression von Hsp70 an der Zelloberfläche als Aktivierungssignal für NK-Zellen identifiziert (siehe Abschnitt 1.2.4, S. 33). Da in dieser Versuchsanordnung die ebenfalls in PBL enthaltenen zytotoxischen T-Zellen nur eine untergeordnete Rolle in der Lyse von K562-Zellen spielen, kann die in den Versuchen gemessene lytische Aktivität der PBL der lytischen Aktivität der NK-Zellen gleichgesetzt werden.(132)

Die Durchführung des Freisetzungsassays erfolgte entsprechend der bereits vielfach in der Literatur genannten Arbeitsanweisungen. (15, 123, 137)

Zunächst wurden die Zielzellen markiert. Hierfür wurden K562-Zellen zunächst abzentrifugiert, in 2 ml K562-Zellkulturmedium resuspendiert, gezählt und dann in eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium gebracht.  $3 \times 10^5$  K562-Zellen wurden mit  $100 \mu\text{Ci} \text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  (ein  $\gamma$ -Strahler) versetzt und für 90 Minuten in einem 15ml-Falcon bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. In dieser Zeit nehmen die Zellen der Leukämiezelllinie  $^{51}\text{Cr}$  aus dem Medium in das Zytoplasma auf (Uptake, Teil 1 Abbildung 4-3). Anschließend wurden die Zellen zweimal durch Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in frischem Medium gewaschen, um  $^{51}\text{Cr}$  aus dem Kulturmedium zu entfernen.

Die Effektorzellen, also PBL, wurden durch Zählen und entsprechende Verdünnung in eine Konzentration von  $1,2 \times 10^5$  PBL/ml Medium gebracht.  $100 \mu\text{l}$  dieser Suspension wurden in Triplikaten auf eine 96 U-well-Platte aufgebracht; durch mehrmalige 1:1-Verdünnungen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Auf diese vorgelegten PBL wurden dann jeweils  $3 \times 10^3$  K562-Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Medium aufgebracht, so dass sich eine Effektor-zu-Target-Ratio (E/T-Ratio) von 40:1 ergab. Durch die Verdünnungsreihe ergaben sich darüber hinaus abweichende E/T-Ratios (20:1, 10:1, 5:1).

In der Inkubationszeit (vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) erfolgt die Lyse der Targetzellen (K562-Zellen) durch die Effektorzellen. Durch diesen Schritt wird das ausschließlich intrazellulär gespeicherte <sup>51</sup>Cr der Targetzellen in den Überstand freigesetzt (Lyse, Teil 2 Abbildung 4-4), wobei der Umfang der Zerstörung der Zielzellen durch die Immunzellen direkt proportional zur im Überstand gemessenen γ-Aktivität ist. Sowohl Target- als auch Effektorzellen sinken im Verlauf der Inkubationszeit ab und bilden ein Zellpellet im Well.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden vorsichtig 50 µl des somit zellfreien Überstandes abpipettiert und auf die LumaPlate übertragen. Zur Ermittlung der minimal auftretenden Spontanlyse wurde Überstand aus einem Triplikat von Wells entnommen, das ausschließlich radioaktiv markierte Targetzellen enthielt (Minimum). Werte für die maximal mögliche Zelllyse (wenn also alle im Well enthaltenen Zellen lysiert wurden) wurden gemessen, indem Zellen, die ebenfalls in einem Triplikat ohne Effektorzellen inkubiert worden waren, nach Ablauf der vier Stunden resuspensiert und von dieser Suspension 50 µl auf die LumaPlate aufgebracht wurden (Maximum). Nach Trocknung der LumaPlate über Nacht unter dem Abzug erfolgte die Auswertung der Platten durch Messung der Aktivität im γ-Counter. Dabei ist die lytische Aktivität umso höher, je mehr γ-Aktivität pro Well gemessen wird. Die gemessenen Werte wurden für jedes Triplikat gemittelt. Nur Versuche, bei denen die Spontanfreisetzung (Minimum-Werte) nicht mehr als 20% der Maximalaktivität betrug, wurden ausgewertet. Der Umfang der lytischen Aktivität wurde in % der maximal möglichen Lyse angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Aktivität im untersuchten Well- Spontanaktivität (Minimum)}}{\text{Maximal mögliche Aktivität (Maximum)-Spontanaktivität (Minimum)}} \times 100$$

Als Positivkontrolle wurden bei jedem Versuch Proben gesunder Spender in Triplikaten parallel mitgemessen.

Alle Ergebnisse der Chrom-Freisetzung-Assays werden im Rahmen dieser Arbeit bei einer E/T-Ratio von 20:1 entsprechend den Vorgaben aus der Literatur dargestellt, um eine übersichtliche Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten.

#### **4.1.6 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurden mit der Software SPSS, Version 19<sup>5</sup> durchgeführt.

Es werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der erhobenen Daten dargestellt. Um signifikante Unterschiede der untersuchten Populationen zu ermitteln, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn  $p < 0,05$  war.

---

<sup>5</sup> IBM Corp., Armonk, USA

## **4.2           Ergebnisse**

Zur Beantwortung der Frage, ob eine chemotherapeutische Behandlung, die in Kombination mit regionaler Hyperthermie verabreicht wird, zu einer Änderung der NK-Zell-Aktivität im peripheren Blut führt, wurden Untersuchungen dieser Aktivität im Verlauf einer solchen Behandlung durchgeführt. Dabei wurde die Aktivität gegen klassische NK-Targetzellen bestimmt. Die Ergebnisse sollen im Folgenden berichtet werden.

### **4.2.1       Patientencharakteristika**

Zwischen April 2007 und Dezember 2008 wurde bei insgesamt 14 Zweitlinienpatienten und sieben Erstlinienpatienten Untersuchungen zur NK-Zell-Funktion durchgeführt.

#### **4.2.1.1      *Charakteristika der Zweitlinienpatienten***

Da in der vorliegenden Arbeit klinische Daten von Patienten analysiert werden, die mit ICE + RHT behandelt werden, wurden zunächst Messungen der NK-Zell-Aktivität auch bei dieser Patientengruppe durchgeführt. Dementsprechend kam bei diesen Patienten auch ein umfangreicheres Untersuchungsprogramm unter Einschluss mehrerer Zeitpunkte zur Anwendung. Deshalb sollen die Zweitlinienpatienten und ihre Charakteristika hier noch vor den Patienten mit Neudiagnose eines STS vorgestellt werden.

Die Charakteristika der untersuchten Zweitlinienpatienten können der folgenden Tabelle 4-4 entnommen werden. Nicht alle in dieser Arbeit auf ihre lytische Aktivität hin untersuchte Patienten litten unter einem Weichteilsarkom – die Gruppe der Zweitlinienpatienten umfasst auch einen Patienten mit Ewing-Sarkom (Pat. 2), einen Patienten mit Osteosarkom (Pat. 14) sowie einen Patienten mit einem neuroendokrinen Karzinom (Pat. 3). Diese Patienten wurden von der vorliegenden Analyse dennoch nicht ausgeschlossen. Dies liegt darin begründet, dass die im Abschnitt 2.2.2 (S. 40) formulierte Hypothese, dass es unter Anwendung der regionalen Hyperthermie zu einer Verstärkung der NK-Zell-Aktivität kommt, keine für Weichteilsarkome spezifische biologische Grundlage hat. Somit ist nicht davon auszugehen, dass bei den hier analysierten Patienten mit Nicht-STS-Histologie eine

signifikant unterschiedliche Reaktion der NK-Zell-Aktivität auf die Kombinationsbehandlung zu erwarten ist.

Einer der eingeschlossenen Patienten (Pat. 3) aus der Zweitlinientherapiegruppe wurde in Folge einer sehr weit fortgeschrittenen Erkrankung mit multiplen Metastasen ohne Nachweis eines lokal hyperthermierbaren Tumors nicht in Kombination mit RHT behandelt. Initial war ein Vergleich von zwei Patientengruppen geplant, wobei sich die Patientengruppen in der Anwendung von RHT zur Therapie ihrer Sarkompatienten unterscheiden sollten, um den Einfluss der regionalen Hyperthermie auf die NK-Zell-Aktivität bestimmen zu können. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass nicht genügend Patienten rekrutiert werden konnten, die nicht in Kombination mit RHT behandelt werden. Der eine Patient, der nicht mit RHT behandelt wurde, wurde schließlich in die Analyse mit integriert, da eine chemotherapeutische Behandlung – zumindest mit bestimmten Chemotherapeutika – alleine schon als Stressor für Tumorzellen ausreichend ist, um eine vermehrte Expression von hsp70 nach sich zu ziehen (54, 55), so dass auch bei diesem Patienten, der ursprünglichen Hypothese folgend, anzunehmen war, dass unter chemotherapeutischer Behandlung eine Verstärkung der NK-Zell-Aktivität zu beobachten ist.

Stimulationsversuche wurden mit Material der Patienten 1-8 durchgeführt.

PATIENT	GESCHLECHT	ALTER (Jahre)	HISTOLOGIE	MONATE SEIT ED	VORTHERAPIEN (n)	VORBESTRAHLUNG	ABSTAND ZUR VORTHERAPIE (Monate)	ICE-ZYKLEN (n)	RHT (n)	ERGEBNIS
1	w	34	neurogenes Sarkom	11	2	Nein	1	4	8	NC
2	m	17	Ewing-Sarkom	70	2	Ja	9	6	12	PR
3	m	35	alveoläres Weichteilsarkom	23	3	Ja	3	3	-	PD
4	m	47	neuroendokrines Karzinom	5	2	Nein	1	2	2	PD
5	m	24	desmoplastisches Sarkom	16	1	Nein	3	4	8	NC
6	w	57	Leiomyosarkom	34	2	Nein	5	3	6	PD
7	w	31	neurogenes Sarkom	68	2	Ja	56	3	6	NC
8	w	25	Klarzellsarkom	219	1	Ja	212	6	12	PD
9	w	30	Chordom	85	1	Nein	2	6	12	NC
10	w	66	Rhabdomyosarkom	54	2	Ja	15	4	8	PR
11	m	24	epitheloidzeliges Sarkom	5	1	Nein	1	1	2	PD (klin.)
12	w	77	Leiomyosarkom	40	1	Ja	6	2	4	PD
13	m	71	Liposarkom	45	1	Ja	32	6	12	NC
14	w	38	Osteosarkom	24	1	Nein	6	6	12	PR
Median		34,5		37	1,5		5,5	4	8	

Tabelle 4-4 Charakteristika der untersuchten Zweitlinienpatienten (m: männlich, w: weiblich, RHT: regionale Hyperthermie, PR: Teilremission, NC: Keine Änderung der Krankheitsmanifestationen unter Therapie, PD: progrediente Erkrankung unter Therapie)

**4.2.1.2      *Charakteristika der Erstlinienpatienten***

Die Charakteristika der sieben untersuchten Erstlinienpatienten können der folgenden Tabelle 4-5 entnommen werden. Alle Patienten wurden aufgrund der Neudiagnose eines Weichteilsarkoms behandelt, wobei bei vier der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits eine Operation zur Entfernung des Lokalbefundes erfolgt war. Bei drei der Patienten war eine solche Voroperation nicht möglich. Zwei dieser Patienten erhielten die Chemotherapie in Kombination mit RHT als neo-adjuvante Therapie, bei einem Patienten wurde die Chemotherapie in palliativer Absicht bei bereits metastasierter Erkrankung verabreicht.

Keiner der Patienten hatte vor Start der Chemotherapie eine Bestrahlungstherapie erhalten. Bei einem Patienten, der initial R1 reseziert worden war, war eine Erhebung des Therapieansprechens nicht möglich.

PATIENT	GE-SCHLECHT	ALTER (Jahre)	HISTOLOGIE	MONATE SEIT ED	VOR-OPERATION	VORBE-STRAHLUNG	ERSTLINIEN-CHEMOTHERAPIE-ZYKLEN (n)	RHT (n)	ERGEBNIS
1	w	46	fibröses Synovialsarkom	3	R2	nein	6	0	PR
2	m	62	mesenchymales Chondrosarkom	1	-	nein	4	8	NC
3	m	31	Spindelzellsarkom	4	R1	nein	4	8	PD
4	m	75	Myxofibrosarkom	1	-	nein	4	8	NC
5	m	50	Synovialsarkom	2	R1	nein	8	16	-
6	w	44	Leiomyosarkom	3	Rx	nein	3	6	PD
7	w	38	epithelioides Fibrosarkom	1	-	nein	4	8	NC
Median		46		2			4	8	

Tabelle 4-5 Charakteristika der untersuchten Erstlinienpatienten (m: männlich, w: weiblich, RHT: regionale Hyperthermie, R1: Resektion mit mikroskopischem Tumornachweis im Bereich des Ansetzungsrandes, R2: Resektion mit makroskopisch sichtbarem verbleibenden Tumorrest, Rx: unbekannter Resektionsstatus, PR: Teilremission, NC: keine Änderung der Krankheitsmanifestationen unter Therapie, PD: progrediente Erkrankung unter Therapie)

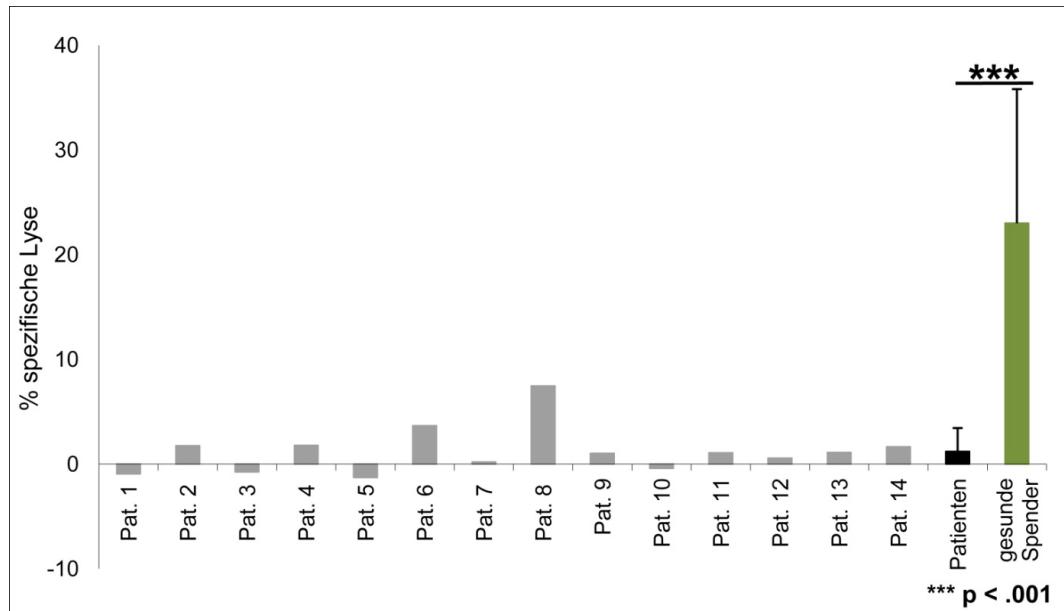
#### **4.2.2       <sup>51</sup>Chrom-Freisetzung-Assays**

Mit Hilfe der Chrom-Freisetzung-Assays wurde die Aktivität der NK-Zellen des peripheren Blutes von Patienten und gesunden Spendern gemessen. Dabei war in einigen Messungen keine relevante Aktivität nachweisbar, in diesem Fall können aufgrund der Messungenauigkeit im Durchschnitt auch geringgradig negative Werte für die spezifische Lyse auftreten (wenn also der Durchschnitt der gemessenen Werte geringer ist als der Durchschnitt der für die Spontanlyse-Werte). Die mit angegebenen Werte für n geben die Anzahl der durchgeführten Versuche an. Da für einen Patienten möglicherweise mehr als eine Messung durchgeführt wurde, liegen die Werte unter Umständen höher als die untersuchte Patientenzahl. Die Aktivität der gesunden Spender ist für jede Auswertung unterschiedlich. Dies hat seinen Grund darin, dass dieser Durchschnittswert ausschließlich aus der Aktivität der Positivkontrollen berechnet wurde, die parallel zu den für diese Auswertung maßgeblichen Messungen durchgeführt wurden.

##### **4.2.2.1      *NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten bei Therapiestart***

Zunächst wurde die NK-Zell-Aktivität bei Therapiestart, also noch vor Beginn einer erneuten Chemotherapie (in diesem Fall einer Nicht-Erstlinienchemotherapie), im <sup>51</sup>Chrom-Freisetzung-Assay untersucht. Die Ergebnisse können Abbildung 4-4 und Tabelle 4-6 entnommen werden. Dabei ist für jeden Patienten die NK-Zell-Aktivität als Einzelmessung (gemittelt aus der Dreifachmessung im Triplikat) angegeben. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der korrespondierenden Messungen bei gesunden Spendern angegeben.

Gesunde Spender zeigen eine messbare Spontanaktivität (also ohne vorhergehende Stimulation durch Zusätze im Kulturmedium) gegen K562-Zellen. Bei nahezu allen untersuchten Patienten zeigen sich im Vergleich zu diesen gesunden Spendern deutlich erniedrigte Werte der spontanen NK-Zell-Aktivität, bei 13 der 14 Patienten ist keine Lyse durch die NK-Zellen nachweisbar. Nur Patient 8 zeigt eine Aktivität, die im Bereich gesunder Spender mit unterdurchschnittlicher Aktivität (siehe Standardabweichung) liegt. Im Durchschnitt ist die spontane Aktivität bei Zweitlinienpatienten hoch signifikant niedriger als die durchschnittliche Aktivität gesunder Spender ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 4-4** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Therapiestart im Vergleich zur Aktivität bei gesunden Spendern

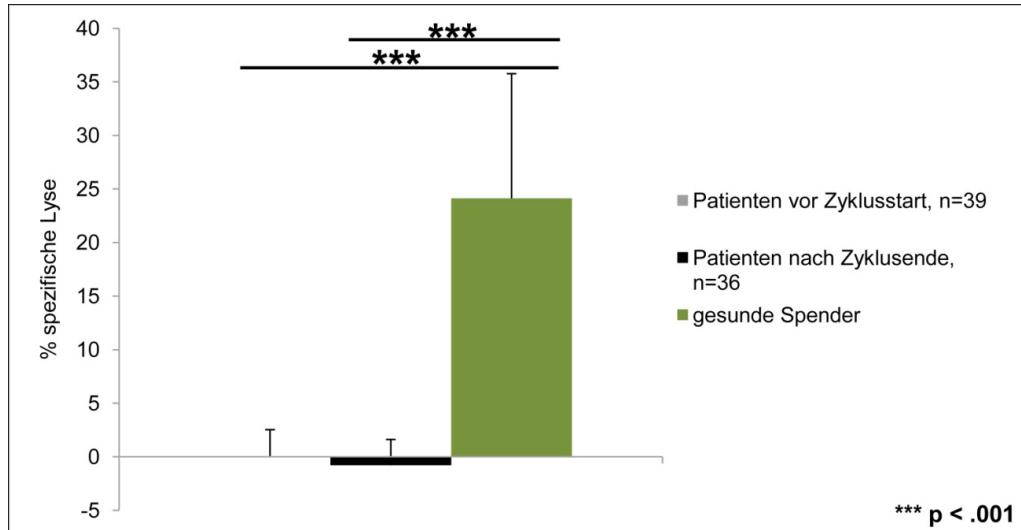
	Patienten	Gesunde Spender
Mittelwert	1,2	23,0
Median	1,1	25,5
Standardabweichung	2,2	12,8
Minimum	-1,3	7,6
Maximum	7,5	45,5

**Tabelle 4-6** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Therapiestart im Vergleich zur Aktivität bei gesunden Spendern (in % spezifische Lyse)

#### 4.2.2.2 Veränderung der NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten während eines Therapiezyklus

Zur Beurteilung der Veränderung der NK-Zell-Aktivität während eines Therapiezyklus wurde bei Zweitlinienpatienten Blut unmittelbar vor und nach dem Zyklus entnommen. Die Ergebnisse der Messungen zeigen Abbildung 4-5 und Tabelle 4-7. Zum Vergleich wird erneut die Aktivität gesunder Spender aufgetragen.

Im Vergleich zur Aktivität gesunder Spender unterscheidet sich die Aktivität von Patientenproben hoch signifikant sowohl vor Start des Therapiezyklus als auch nach Ende des Therapiezyklus. Zu beiden Zeitpunkten ist keine relevante Lyse durch die NK-Zellen nachweisbar. Aus der Durchführung der Chemotherapie in Kombination mit regionaler Hyperthermie resultiert keine signifikante Änderung der NK-Zell-Aktivität.

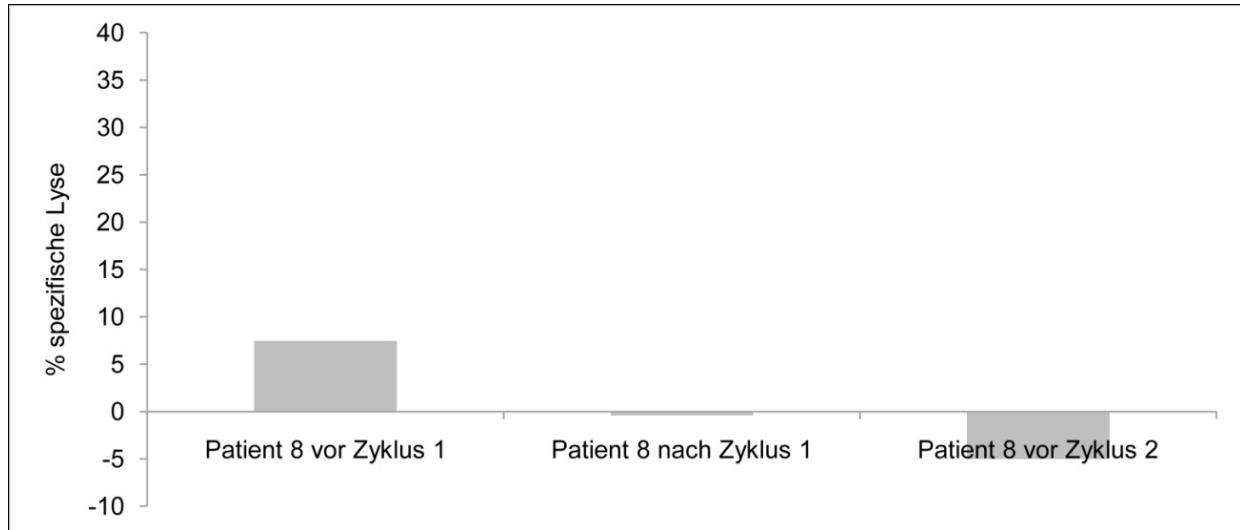


**Abbildung 4-5** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende und zur Aktivität bei gesunden Spendern

	Patienten bei Zyklusstart	Patienten bei Zyklusende	Gesunde Spender
Mittelwert	-0,1	-0,8	24,1
Median	0,2	-0,3	22,3
Standardabweichung	2,6	2,4	11,6
Minimum	-6,6	-7,5	5,0
Maximum	7,5	2,5	56,9

**Tabelle 4-7** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende und zur Aktivität bei gesunden Spendern (in % spezifische Lyse)

Patient 8 war der einzige Patient, bei dem vor Start der Zweitlinientherapie in Kombination mit regionaler Hyperthermie eine Aktivität der NK-Zellen nachweisbar war. Nach Durchführung des ersten Therapiezyklus ist jedoch auch bei diesem Patienten keine Aktivität gegen K562-Targetzellen mehr nachweisbar. Es fand sich keine Regeneration der NK-Zell-Aktivität bis zum Start des zweiten Zyklus bei diesem Patienten. Der an Tag eins des zweiten Zyklus gemessene Wert war deutlich niedriger als der Aktivitätswert vor Therapiestart (siehe Abbildung 4-6 und Tabelle 4-8).



**Abbildung 4-6** NK-Zell-Aktivität bei Patient 8 (Zweitlinienpatient) vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende

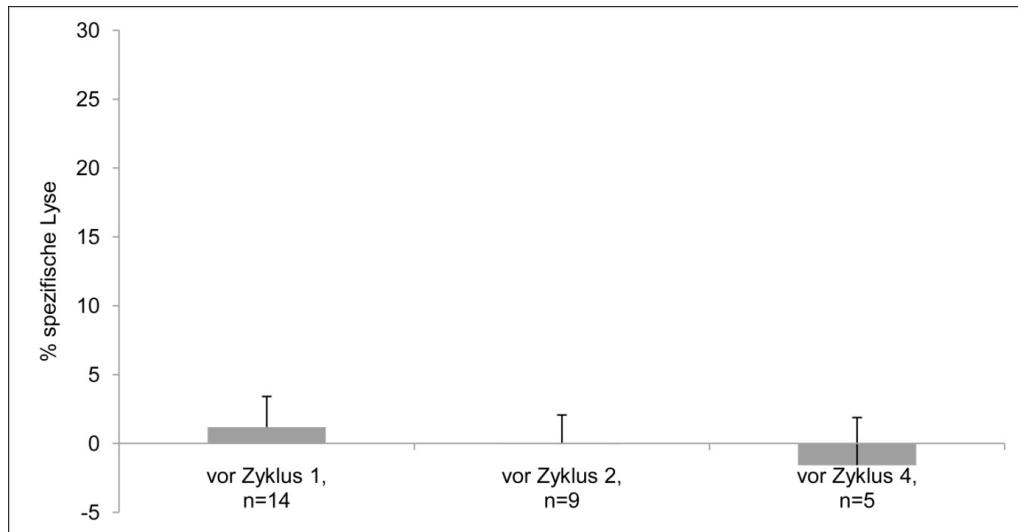
	Patient 8 vor Therapiestart	Patient 8 nach Zyklus 1	Patient vor Zyklus 2
Messwert	7,5	-0,4	-5,0

**Tabelle 4-8** NK-Zell-Aktivität bei Patient 8 (Zweitlinienpatient) vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende (in % spezifische Lyse)

#### 4.2.2.3 Veränderung der NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten im Laufe der Therapie

Zur Beurteilung der Veränderung der Aktivität unter laufender Therapie (im Gegensatz zur vorhergehenden Abschnitt jedoch nicht innerhalb eines Zyklus, sondern im Verlauf mehrerer aufeinanderfolgender Zyklen) wird in Abbildung 4-7 und Tabelle 4-9 die gemessene lytische Aktivität jeweils an Tag eins des entsprechenden Zyklus dargestellt. Nicht für alle Patienten war eine Blutentnahme auch vor dem zweiten Zyklus der Therapie möglich, weshalb hier die Anzahl der untersuchten Patienten auf neun fällt. Da nur ein Teil der Patienten überhaupt vier Zyklen der Therapie erhalten hatten, nimmt die Anzahl der untersuchten Patienten für diese Bestimmung weiter ab auf fünf.

Im Verlauf der Therapie zeigt sich keine signifikante Änderung der lytischen Aktivität der NK-Zellen. Die gemessene Aktivität bleibt im Verlauf der Therapie konstant niedrig.



**Abbildung 4-7** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart, vor Zyklus 2 und vor Zyklus 4

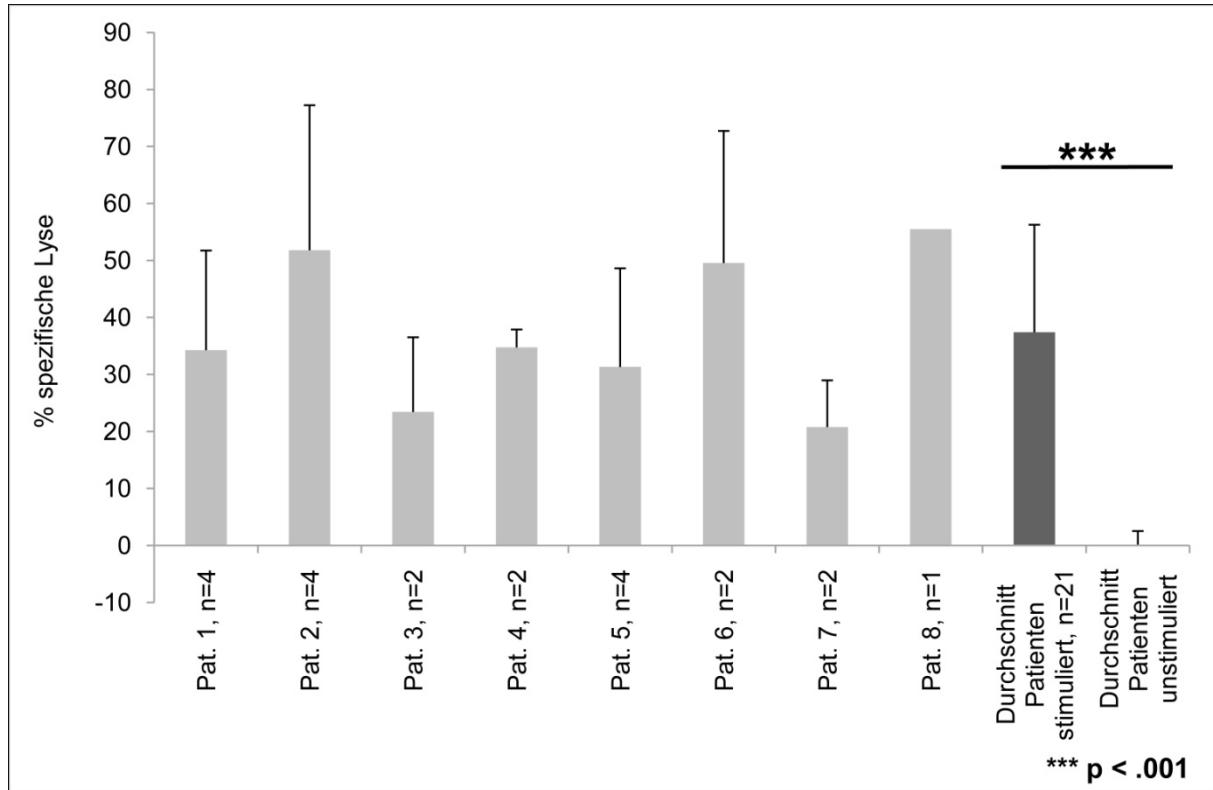
	Patienten vor Zyklus 1	Patienten vor Zyklus 2	Patienten vor Zyklus 4
Mittelwert	1,2	-0,1	-1,6
Median	1,1	0,4	-2,2
Standardabweichung	2,2	2,1	3,5
Minimum	-1,3	-5,0	-6,6
Maximum	7,5	2,3	3,3

**Tabelle 4-9** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart, vor Zyklus 2 und vor Zyklus 4 (in % spezifische Lyse)

#### 4.2.2.4 *Stimulation der Aktivität bei Zweitlinienpatienten*

In weiterführenden Versuchen wurde die lytische Aktivität der Patienten-NK-Zellen durch Hinzufügen von Interleukin 2 (IL-2) und dem hsp70-Derivat TKD stimuliert. Diese Experimente wurden mit Zellen der Patienten 1 bis 8 durchgeführt. Zunächst werden die Ergebnisse für die Stimulation mit IL-2 in einer Konzentration von 1000 U/ml und TKD in einer Konzentration von 2 µg/ml dargestellt (siehe Abbildung 4-8 und Tabelle 4-10).

In den Stimulationsversuchen zeigt sich, dass bei allen untersuchten Patienten trotz initial nicht vorhandener NK-Zell-Aktivität durch Inkubation mit den oben genannten Reagenzien eine deutlich nachweisbare lytische Aktivität der Immunzellen induziert werden kann. Im Durchschnitt war die gemessene Aktivität signifikant höher als die unstimulierter Patientenproben.



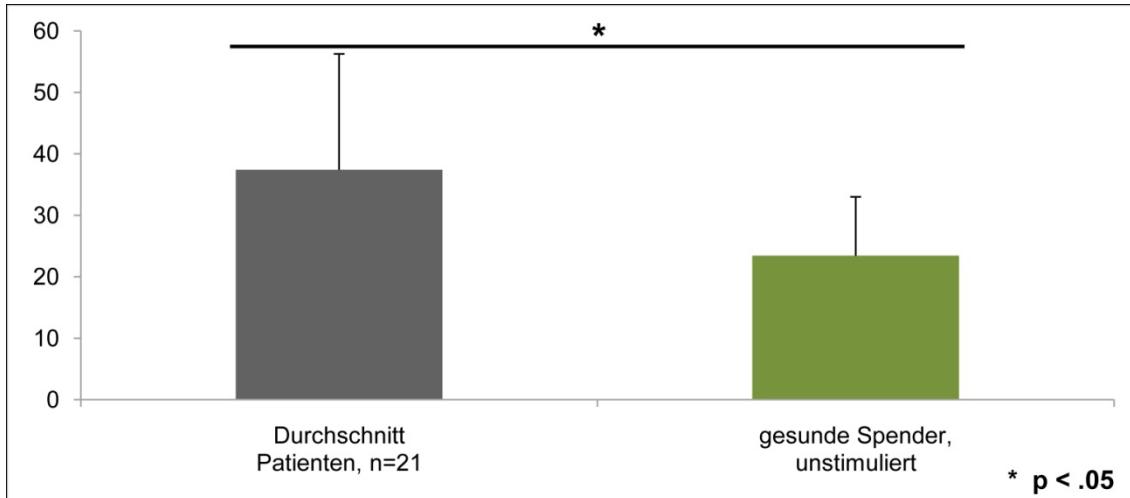
**Abbildung 4-8** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor (Durchschnittswert) und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml

	Patienten stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 µg/ml)	Patienten unstimuliert
Mittelwert	37,4	-0,1
Median	34,5	0,2
Standardabweichung	18,9	2,6
Minimum	23,4	-6,6
Maximum	55,5	7,5

**Tabelle 4-10** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml (in % spezifische Lyse)

#### 4.2.2.4.1. NK-Zell-Aktivität nach Stimulation im Vergleich mit Proben von gesunden Spendern

Die gemessene Aktivität nach Stimulation der NK-Zellen durch IL-2 und TKD wurde auch mit der unstimulierten Aktivität von Proben gesunder Spender verglichen (siehe Abbildung 4-9 und Tabelle 4-11).



**Abbildung 4-9** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender

	Patienten stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 µg/ml)	Gesunde Spender unstimuliert
Mittelwert	37,4	24,1
Median	34,5	22,3
Standardabweichung	18,9	11,6
Minimum	23,4	5,0
Maximum	55,5	56,9

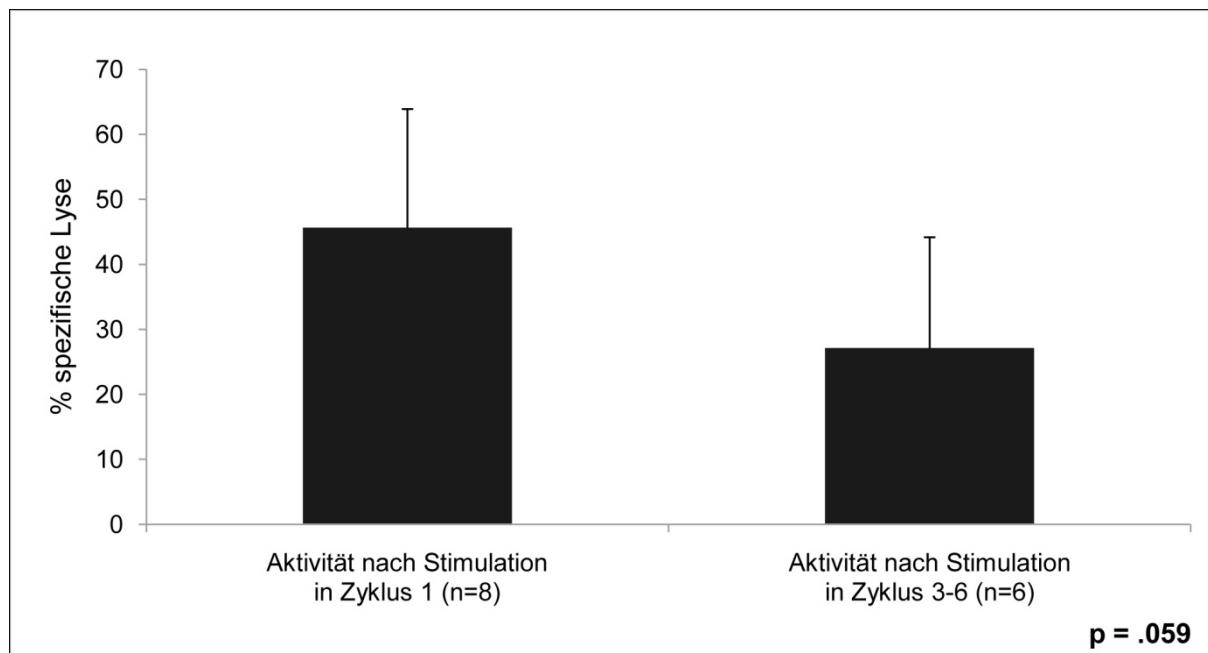
**Tabelle 4-11** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spendern (in % spezifische Lyse)

Auch im Vergleich mit Proben gesunder Spender, die *nicht* stimuliert wurden, zeigt sich eine im Durchschnitt signifikant höhere Aktivität der stimulierten Patientenproben, das heißt durch Stimulation mit den oben genannten Reagenzien kann bei Patienten, die initial keine nachweisbare Aktivität der NK-Zellen aufweisen, eine lytische Aktivität erreicht werden, die signifikant über der unstimulierten Aktivität gesunder Spender liegt.

#### 4.2.2.4.2. Stimulierbarkeit im Verlauf der Therapie

Es wurde darüber hinaus untersucht, ob sich die Stimulierbarkeit der NK-Zellen im Verlauf der Thermochemotherapie verändert, ob also mit zunehmender zytostatischer Behandlung und wiederholter RHT-Applikation die erreichten Werte für die lytische Aktivität nach Stimulation zu- oder abnimmt. Hierzu wurden die Werte, die nach Stimulation im ersten Zyklus gemessen worden waren, mit den Ergebnissen der Stimulationsassays verglichen, die im weiteren Verlauf der Therapie erhoben

wurden. Da die Therapie bei den einzelnen Patienten unterschiedlich viele Zyklen umfasste (siehe Tabelle 4-4), wurden die Daten aus den Zyklen 3 bis 6 als Verlaufsmarker für diesen Vergleich herangezogen.



**Abbildung 4-10** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml bei Therapiestart im Vergleich zur Stimulierbarkeit in später applizierten Zyklen

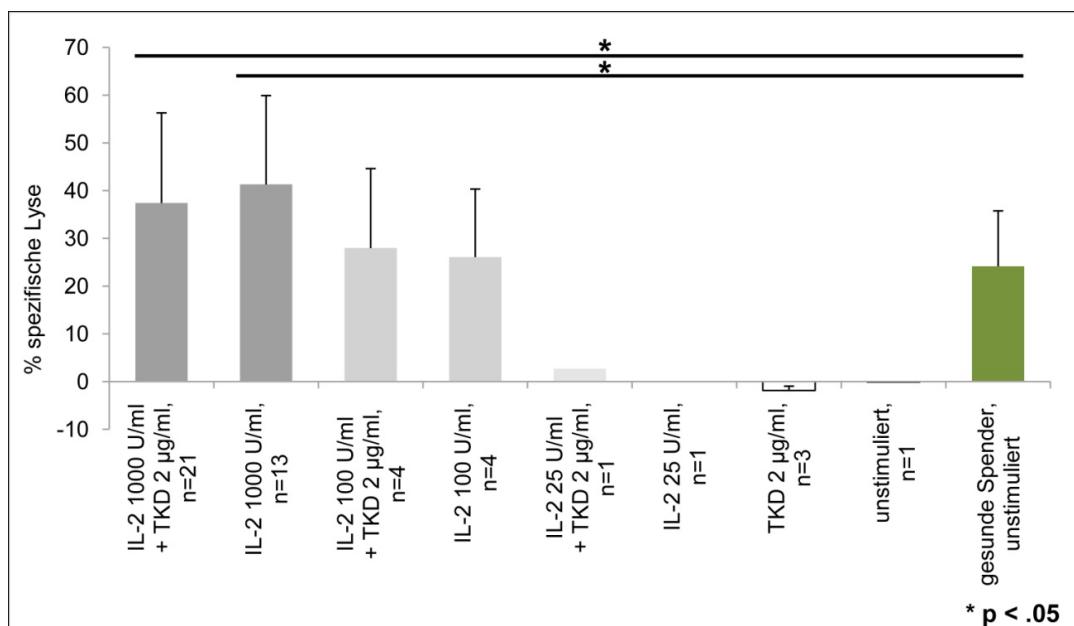
	Patienten stimuliert Therapiestart (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 µg/ml)	Patienten stimuliert Verlauf unter Therapie (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 µg/ml)
Mittelwert	45,6	27,1
Median	49,2	20,1
Standardabweichung	18,3	17,0
Minimum	15,0	14,0
Maximum	65,9	58,4

**Tabelle 4-12** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml bei Therapiestart im Vergleich zur Stimulierbarkeit in später applizierten Zyklen (in % spezifische Lyse)

Es zeigt sich eine tendenziell abnehmende Stimulierbarkeit der Aktivität im Verlauf der Thermochemotherapie. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ( $p=0,59$ ). Auch im späteren Verlauf der Therapie finden sich stets Aktivitätswerte, die deutlich über der Ausgangsaktivität der Patientenproben liegen.

#### 4.2.2.4.3. Vergleich der lytischen Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Stimulationsansätzen

Es wurden Stimulationsversuche nicht nur mit IL-2 in der Konzentration von 1000 U/ml und TKD 2 $\mu$ g/ml durchgeführt, sondern darüber hinaus auch bei einigen Patienten Stimulationsansätze mit geringeren IL-2-Konzentrationen (100 U/ml, 25 U/ml). Darüber hinaus wurden Stimulationsversuche mit und ohne Hinzufügung von TKD durchgeführt, um den Anteil abschätzen zu können, den beide Agenzien an der Augmentation der lytischen Aktivität der NK-Zellen haben.



**Abbildung 4-11** NK-Zell-Aktivität unterschiedlichen Stimulationsmedien bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit

	IL-2 1000 U/ml + TKD 2 $\mu$ g/ml	IL-2 1000 U/ml	IL-2 100 U/ml + TKD 2 $\mu$ g/ml	IL-2 100 U/ml	IL-2 25 U/ml + TKD 2 $\mu$ g/ml	IL-2 25 U/ml	TKD 2 $\mu$ g/ml	unstimuliert	Gesunde Spender, unstimuliert
Mittelwert/ Einzelwert	37,4	41,3	28,0	26,1	2,7	-0,1	-1,8	-0,1	24,1
Median	33,2	46,6	27,7	26,6			-2,0		22,3
Standard- abweichung	18,9	18,6	16,6	14,2			0,9		11,6
Minimum	14,0	5,6	11,4	9,2			-2,4		5,0
Maximum	65,9	67,6	45,1	38,5			-0,8		56,9

**Tabelle 4-13** NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit unterschiedlichen Stimulationsmedien (in % spezifische Lyse)

## Die Funktion natürlicher Killerzellen in der Behandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen

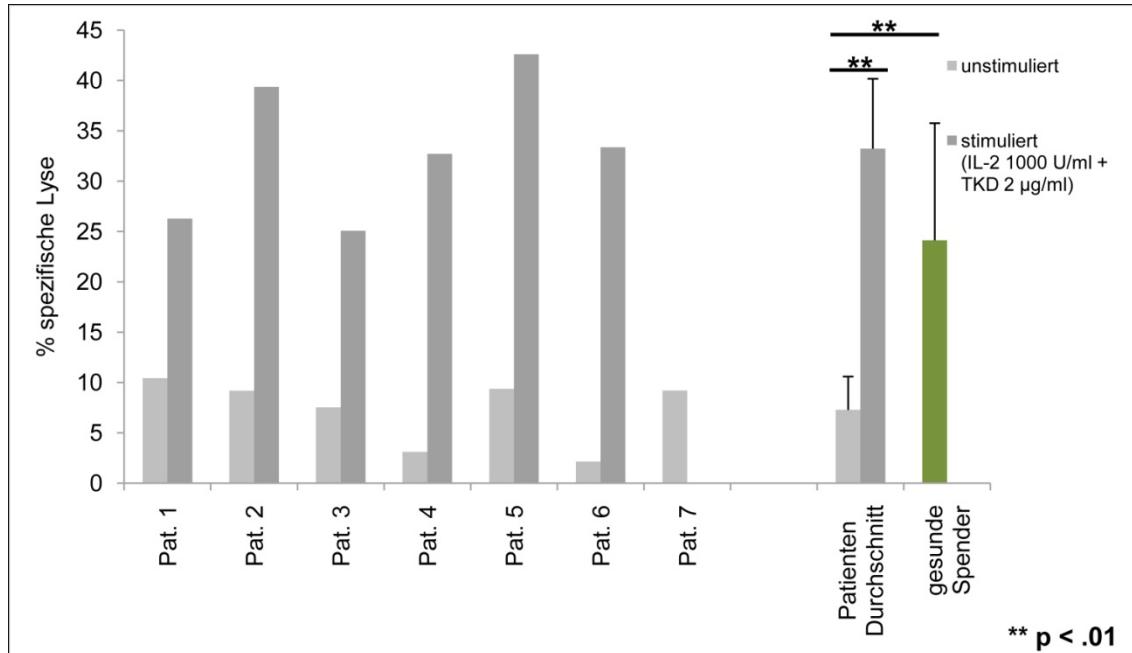
Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Stimulation mit 100 U/ml IL-2 zu einer suffizienten Aktivierung der NK-Zell-Aktivität bei Patientenproben führt, die sich nicht signifikant von der Aktivität unterscheidet, die durch Verwendung von 1000 U/ml IL-2 zu erreichen ist. Eine IL-2-Konzentration von 25 U/ml führt dagegen zu keiner relevanten Aktivitätssteigerung, ebenso wie die Inkubationsmedien, bei denen auf die Hinzufügung von IL-2 vollständig verzichtet wurde.

Die Addition von TKD zu den Inkubationsmedien führt bei keiner verwendeten IL-2-Konzentration zu einer signifikanten Veränderung der gemessenen lytischen Aktivität im Vergleich zur Stimulation ohne TKD.

Es ist erneut die Aktivität der unstimulierten NK-Zellen gesunder Spender angegeben. Hier zeigt sich eine signifikant höhere Aktivität bei Stimulation mit 1000 U/ml IL-2 (sowohl bei Inkubation mit als auch ohne TKD). Durch Stimulation mit 100 U/ml IL-2 kann keine signifikant höhere Aktivität im Vergleich mit der durchschnittlichen Aktivität gesunder Spender erreicht werden.

### **4.2.2.5      *Unstimulierte und stimulierte NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten***

Auch bei Patienten, die aufgrund der Erstdiagnose eines STS eine Thermochemotherapie erhalten sollten, wurde die unstimulierte NK-Zell-Aktivität bestimmt und Stimulationsversuche durchgeführt. Im Gegensatz zu Zweitlinienpatienten wurden diese Analysen jedoch nur zu einem Zeitpunkt, nämlich vor Beginn der Therapie, durchgeführt. Ziel war die Erarbeitung von Vergleichswerten ohne Beeinflussung durch eine antineoplastische Therapie, um Hinweis auf die Ätiologie der in den vorangegangenen Abschnitten berichteten Funktionseinschränkung der NK-Zellen zu erhalten. Abbildung 4-12 und Tabelle 4-14 geben Auskunft über die ermittelten Werte für diese Patienten.



**Abbildung 4-12** NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml + TKD 2µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender

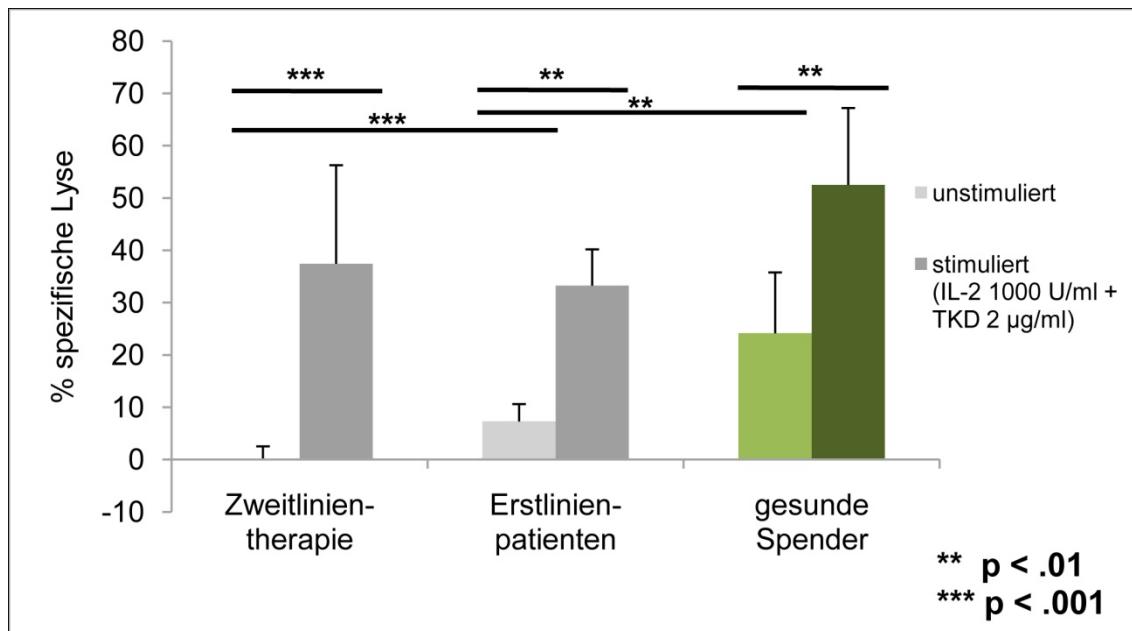
	Erstlinienpatienten unstimuliert	Erstlinienpatienten stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 µg/ml)	gesunde unstimuliert	Spender
Mittelwert	7,3	33,2	24,1	
Median	9,2	33,0	22,3	
Standardabweichung	3,3	6,9	11,6	
Minimum	2,1	25,1	5,0	
Maximum	10,4	42,6	56,9	

**Tabelle 4-14** NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml + TKD 2µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender (in % spezifische Lyse)

Die unstimulierte Aktivität der Erstlinienpatienten war im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender signifikant niedriger. Auch bei Erstlinienpatienten ließ sich die Aktivität durch Inkubation mit IL-2 und TKD signifikant steigern. Die so erreichte Aktivität unterschied sich nicht signifikant von der unstimulierten Aktivität gesunder Spender.

#### 4.2.2.6 Vergleich der Aktivität von Erstlinienpatienten mit der Aktivität von gesunden Spendern und Zweitlinienpatienten

Zusammenfassend wird in Abbildung 4-13 und Tabelle 4-15 die Aktivität von Erst- und Zweitlinienpatienten mit der Aktivität gesunder Spender verglichen.



**Abbildung 4-13** NK-Zell-Aktivität von Zweitlinienpatienten, Erstlinienpatienten und gesunden Spendern, jeweils unstimuliert und stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 $\mu$ g/ml)

	Zweitlinien-patienten unstimuliert	Zweitlinien-patienten stimuliert	Erstlinien-patienten unstimuliert	Erstlinien-patienten stimuliert	Gesunde Spender unstimuliert	Gesunde Spender stimuliert
Mittelwert	-0,1	37,4	7,3	33,2	24,1	52,5
Median	0,2	34,5	9,2	33,0	22,3	51,0
Standard-abweichung	2,6	18,9	3,3	6,9	11,6	14,7
Minimum	-6,6	23,4	2,1	25,1	5,0	28,8
Maximum	7,5	55,5	10,4	42,6	56,9	78,9

**Tabelle 4-15** NK-Zell-Aktivität von Zweitlinienpatienten, Erstlinienpatienten und gesunden Spendern, jeweils unstimuliert und stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 $\mu$ g/ml; in % spezifische Lyse)

Hierbei zeigt sich, dass die unstimulierte Aktivität bei Zweitlinienpatienten hoch signifikant niedriger ist als die Aktivität sowohl von Erstlinienpatienten als auch von gesunden Spendern. Die unstimulierte Aktivität von Erstlinienpatienten ist darüber hinaus signifikant niedriger als die NK-Zell-Aktivität gesunder Spender.

Nach Stimulation zeigt sich in allen drei Populationen eine signifikante Zunahme der Aktivität, wobei die Zunahme bei Erstlinienpatienten und gesunden Spendern sehr signifikant ist; bei Zweitlinienpatienten ist diese Zunahme sogar hoch signifikant.

#### 4.2.3 Veränderungen der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im peripheren Blut während der Therapie mit ICE + RHT

Bei einem Teil der Patienten wurden Lymphozyten-Subpopulationen im Verlauf der Therapie zur Ermittlung der absoluten NK-Zahlen bestimmt. In Abbildung 4-14 ist der Verlauf der Leukozyten-, Lymphozyten- und NK-Zellzahlen in Relation zum Ausgangswert vor Einleitung der Therapie mit ICE +RHT dargestellt.

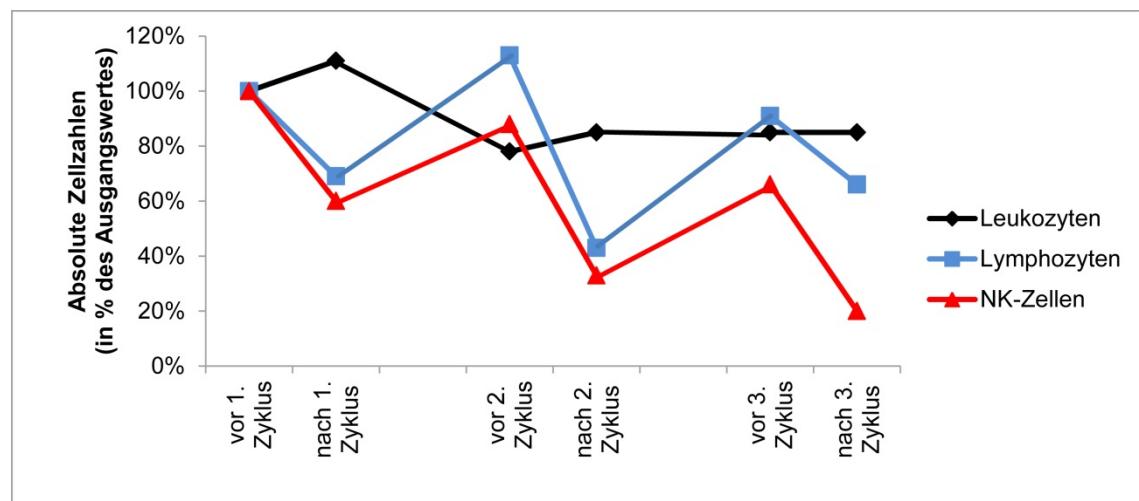


Abbildung 4-14

Absolute Zellzahlen in % des Ausgangswertes im Verlauf der Therapie mit ICE + RHT

Es zeigt sich eine Reduktion der Lymphozyten- und NK-Zellen bereits unmittelbar während des Therapiezyklus. Die Lymphozytenzahlen erholen sich bis zum Beginn des folgenden Zyklus, während die NK-Zellzahlen eine persistierende Reduktion zu zeigen scheinen.

Aufgrund der geringen Untersuchungszahlen war eine Analyse bezüglich signifikanter Unterschiede zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nicht möglich.

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sind mehrere Teilespekte der internistischen Therapie von Patienten mit der Diagnose eines Weichteilsarkoms betrachtet worden. Dies hat seinen Grund darin, dass die Therapie dieser Erkrankungen nach wie vor eine Herausforderung für den behandelnden Arzt darstellt, insbesondere dann, wenn es zu einem Versagen einer Anthrazyklin-basierten Standardtherapie gekommen ist. Neben der Auswertung von Ergebnissen zur zytostatischen Therapie, die hier um das Therapieverfahren der regionalen Hyperthermie ergänzt wurde, wurden Parameter der Funktion natürlicher Killerzellen untersucht.

Im Folgenden sollen die erarbeiteten Ergebnisse diskutiert werden. Analog zur Gliederung der vorangehenden Abschnitte der Arbeit wird dabei zunächst auf die Therapie mit ICE und regionaler Hyperthermie eingegangen und im weiteren Verlauf Bezug auf die Daten zur NK-Zell-Funktion genommen. Schließlich werden die Implikationen der Ergebnisse beider Teilespekte der Arbeit hinsichtlich der Weiterentwicklung der Therapie von Patienten mit STS diskutiert.

### 5.1 ICE + RHT in der Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen

Für die Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS ist nach wie vor kein Standard definiert.(158) Aufgrund der schlechten Prognose der Patienten, die eine Zweitlinientherapie nach Diagnose eines Rezidivs oder wegen einer Progression der Erkrankung unter Anthrazyklin-basierter Erstlinientherapie benötigen, ist die Identifikation von in dieser Situation wirksamen Wirkstoffen oder Wirkstoffkombinationen von großer Dringlichkeit.(34)

Ein am Klinikum Großhadern und assoziierten Therapieeinheiten bei diesen Patienten zum Einsatz kommendes Therapiekonzept ist die Verabreichung von ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie. Die Ergebnisse dieses Therapieprotokolls wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Wirksamkeit und Verträglichkeit geprüft. Da es sich um eine Analyse ohne Kontrollarm handelt, erfolgt die Beurteilung der Wirksamkeit der Behandlung anhand der von Van Glabbeke et al.(193) publizierten Richtwerte für die progressionsfreie Überlebensrate drei und sechs Monate nach Einleitung der Therapie. Im Vergleich mit alternativen Therapieprotokollen wurden mögliche Vor- und Nachteile einer Therapie mit ICE + RHT identifiziert. Die Herausarbeitung einer Über- oder Unterlegenheit einer dieser

Therapien ist jedoch anhand der hier vorliegenden Arbeit naturgemäß nicht möglich, da es sich um eine retrospektive Analyse handelt. Dennoch erlaubt die Arbeit Schlussfolgerungen, die dann in einer eventuell durchzuführenden prospektiven Studie überprüft werden könnten.

### **5.1.1 Untersuchte Patientenpopulation**

Eine Einschätzung der Repräsentativität der in dieser Arbeit untersuchten Patientenpopulation ist entscheidend, um zu definieren, für welche Patientengruppen Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit gezogen werden können. Ziel der folgenden Erläuterungen ist also, Ungleichgewichte in der Zusammensetzung der untersuchten Patientenpopulation zu identifizieren, die Einfluss auf die Auswertung und die Annahme oder Ablehnung der unter 2.1.2 (S. 38) formulierten Hypothese haben könnten.

Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenpopulation entspricht in ihren Charakteristika (siehe Tabelle 3-1, S. 51) überwiegend den Patientengruppen, die in anderen Arbeiten zur Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS untersucht wurden – soweit in diesen Publikationen die entsprechenden Merkmale angegeben waren. Insbesondere ist hervorzuheben, dass alle in die vorliegende Analyse eingeschlossenen Patienten eine Anthrazyklin-basierte Vortherapie erhalten hatten und zum Zeitpunkt des Therapiebeginns mit ICE + RHT unter einer progradienten Erkrankung litten, so wie in vergleichbaren Studien. Auch die Verteilung zwischen Extremitäten- und Nicht-Extremitätenlokalisierung des Primarius entspricht mit  $\frac{1}{3}$  zu  $\frac{2}{3}$  weitgehend der Verteilung in Vorpublikationen.

Allerdings ist der Anteil an Patienten mit ausschließlich lokal fortgeschrittener, nicht metastasierter Sarkomerkrankung mit knapp unter 50% der eingeschlossenen Patienten im Vergleich zu den in Tabelle 1-1 (S. 11f) zusammengefassten Phase II-Studien relativ hoch. Einzelne dieser Studien wurden sogar ausschließlich an Patienten mit metastasierter Erkrankung durchgeführt.(94) Dementsprechend sind in der vorliegenden Arbeit im Verhältnis zu anderen Publikationen, in denen teilweise über drei Viertel aller behandelten Patienten an G3-Tumoren litten(49, 121), tendenziell weniger schlecht differenzierte STS enthalten (in der hier vorliegenden Arbeit 63% aller Patienten, siehe Abschnitt 1.1.1, S. 2). Die Relevanz dieser

Unterschiede ist in Abwesenheit randomisierter Vergleiche insgesamt schwierig abzuschätzen.

Die Mehrheit der Patienten mit metastasierter Erkrankung litt, wie auch in vergleichbaren Vorpublikationen, unter pulmonalen Metastasen. Diese Patienten unterscheiden sich von den Patienten ohne Nachweis einer Fernmetastasierung nur in wenigen Aspekten signifikant, zum Beispiel in der Häufigkeit von Tumorresektionen und Bestrahlungen. Da aber alle Patienten dieser Analyse eine lokale, hyperthermierte Tumormanifestation aufweisen, können Unterschiede in den Überlebenszeiten beider Subpopulationen am ehesten durch das Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der Fernmetastasierung erklärt werden.

Lipo- und Leiomyosarkome waren die häufigsten eingeschlossenen histologischen Subentitäten, was den Anteil dieser Erkrankungen an der Gesamtzahl aller Patienten mit Sarkomen widerspiegelt. Der Anteil an Patienten mit Synovialsarkomen war im Vergleich zu Publikationen, die sich mit der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen beschäftigen, jedoch in der hier untersuchten Population relativ gering(38), was insofern von Belang ist, als dass diese Subentität üblicherweise als relativ chemosensibel angesehen wird. (175)

In die Analyse wurden auch drei Fälle von PNET/Ewing-Sarkomen und ein Patient mit Osteosarkom eingeschlossen. Diese Knochensarkome wurden in den zum Vergleich herangezogenen Studien üblicherweise ausgeschlossen. Grund für den Einschluss dieser Patienten war das Bemühen, ein der Krankenversorgung entsprechendes, repräsentatives Bild der Wirksamkeit der in dieser Arbeit untersuchten Therapieoption zu geben.

Die hier analysierte Gesamtpopulation ist mit 92 eingeschlossenen Patienten eine große Studienpopulation, auch im Vergleich zu den Phase II-Studien, die in den Tabellen 1-1, 1-2 und 1-3 zusammengefasst sind. Mit Ausnahme des relativ hohen Anteils an Patienten mit ausschließlich lokaler Erkrankung ist die Studienpopulation weitgehend vergleichbar zum Patientengut in anderen Studien zur Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS. Daher lässt die vorliegende Arbeit repräsentative Rückschlüsse hinsichtlich Wirksamkeit und Verträglichkeit der Therapie zu.

### 5.1.2 Thermometrie

Ziel der Überwachung der erreichten Temperaturen innerhalb von Zielstrukturen (oder bei endoluminaler Messung innerhalb anatomisch benachbarter Strukturen) ist die Sicherung einer ausreichenden Wirksamkeit der Hyperthermiebehandlung. Das Erreichen bestimmter Zieltemperaturen ist Voraussetzung für die Induktion der Effekte, die der Wirksamkeit der RHT zugrunde liegen, wie zum Beispiel eine verstärkte Perfusion des hyperthermierten Areals oder eine verstärkte Wirksamkeit von Zytostatika (siehe Abschnitt 1.1.5.1, S. 19). Da die RHT-Behandlung ein essentieller Bestandteil des in dieser Arbeit betrachteten Therapiekonzepts ist, soll im Folgenden herausgestellt werden, ob die entsprechenden Zielwerte erreicht wurden, um von einer effektiven RHT-Behandlung ausgehen zu können.

Daten zur TID bei den untersuchten Patienten liegen nicht vor. Dementsprechend wurden die erreichten Maximaltemperaturen und Temperaturindizes wie  $T_{90}$  zur Beurteilung der Effektivität der RHT-Behandlung herangezogen.

Die Maximaltemperaturen von durchschnittlich knapp über  $41^{\circ}\text{C}$  *im Tumor* liegen im vorgegebenen Zielbereich einer regionalen Hyperthermiebehandlung (siehe Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5, S. 54f). Die erreichten endoluminalen Temperaturen von knapp unter  $40^{\circ}\text{C}$  ( $\text{Tmax}$ ) liegen unter den in der Arbeit von Wust et al. (208) veröffentlichten Referenzwerten von knapp über  $41^{\circ}\text{C}$ , jedoch wurden der Berechnung hier endoluminale Messungen bei der Behandlung von Patienten mit Colon-, Anal- oder Cervixkarzinomen zugrunde gelegt, deren anatomische Lage für eine endoluminale Thermometrie prädisponieren. Tatsächlich wurden die endoluminalen Katheter in dieser Arbeit so positioniert, dass sie direkten Kontakt zur hyperthermierten Raumforderung hatten. Weichteilsarkome im kleinen Becken gehen in der Regel nicht von der Mukosa aus und unterscheiden sich in ihrer anatomischen Lage deshalb von den oben genannten Tumorentitäten. Eine Positionierung des Katheters in vergleichbarer Nähe zum Tumor, wie er bei Karzinomen zu erreichen ist, ist bei STS nicht regelhaft möglich. Die paratumoral oder endoluminal erzielten, im Vergleich zur Arbeit von Wust et al. niedrigeren Temperaturen sind somit dennoch als ausreichend anzusehen und lassen Rückschlüsse auf eine effektive Hyperthermiebehandlung zu.

Die Temperaturverteilung im Tumor beziehungsweise im Tumorbett bei Durchführung einer endoluminalen Messung lässt sich bei Nachweis einer

durchschnittlichen Temperaturdifferenz zwischen  $T_{50}$  und  $T_{90}$  (als Ausdruck der berechneten Mindesttemperatur in 50 beziehungsweise 90% des Hyperthermieareals) von knapp unter 1°C als homogen bezeichnen. Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass die in dieser Patientenpopulation angewandte Technik der regionalen Hyperthermie ausreichend effektiv und reproduzierbar ist, um Effekte der Behandlung in der Therapie von STS anzunehmen.

Im Folgenden sollen die ermittelten Temperaturen in Bezug zum Therapieerfolg gesetzt werden. Da keine Patienten in die Analyse eingeschlossen wurden, die ohne RHT behandelt wurden, ist eine Analyse des Anteils, den die Hyperthermie am Behandlungserfolg hat, nicht möglich. Allenfalls indirekte Hinweise auf die Rolle der Hyperthermie können erhoben werden, mit daraus resultierenden Einschränkungen in Bezug auf die Aussagequalität.

Eine signifikante Temperaturdifferenz zwischen den Patienten, die ein Ansprechen unter ICE + RHT zeigen, und Patienten, bei denen kein Ansprechen nachweisbar war, lässt sich nicht belegen (siehe Abbildung 3-6, S. 55). Dies steht im Gegensatz zu anderen Publikationen, bei denen ein solcher Zusammenhang zumindest in retrospektiver Analyse identifizierbar war.(78) Diese Ergebnisse kommen möglicherweise dadurch zustande, dass durch Beachtung der Qualitätsstandards und zunehmender Anwendung der regionalen Hyperthermie in der Routineversorgung von Patienten die Differenzen in der Qualität der Hyperthermiebehandlungen geringer werden. Damit wäre eine mögliche Remission des Tumors nicht von der erreichten Temperatur, sondern von anderen, nicht Hyperthermie-induzierten Einflussfaktoren abhängig. Höhere Temperaturen würden dann auch keine höhere Wahrscheinlichkeit der Remissionsinduktion nach sich ziehen.

Andererseits sind die Voraussetzungen zur Durchführung einer Hyperthermiebehandlung (zum Beispiel Lage, Größe und Perfusion des Tumors) weiterhin von Patient zu Patient individuell unterschiedlich, so dass es durchaus denkbar ist, dass Patienten auch unter Beachtung der Standards keine optimale Hyperthermiebehandlung erhalten. Dagegen spricht jedoch die gute Homogenität der Temperaturverteilung bei gleichzeitigem Nachweis eines suffizienten Temperaturanstiegs.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den in dieser Arbeit untersuchten Patienten ein suffizienter Anstieg der Temperaturen im Bereich des Tumors beziehungsweise im paratumoralen Areal unter Hyperthermiebehandlung nachzuweisen ist. Die erreichten Temperaturen sind in Patienten mit Ansprechen auf die Therapie jedoch nicht signifikant höher als in Patienten ohne Ansprechen. Dies ist jedoch *nicht* als Hinweis auf eine fehlende Wirksamkeit der RHT in den hier untersuchten Patienten zu verstehen.

### **5.1.3 Toxizität**

Die Nebenwirkungsrate einer zytostatischen Therapie ist eine entscheidende Größe, um die Verträglichkeit der Therapie beurteilen und Patienten identifizieren zu können, für die diese Therapie in Frage kommt. Dementsprechend ist die Frage (siehe Abschnitt 2.1.1, S. 37) nach dem Nebenwirkungsprofil von ICE + RHT von entscheidender Relevanz für diese Arbeit.

ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie ist ein mit erheblichen Nebenwirkungen assoziiertes Therapiekonzept. Dritt- und viertgradige Hämatotoxizitäten mit deutlichem Abfall der Blutzellwerte sind in einem substantiellen Anteil der Patienten, bei insgesamt knapp 70% aller behandelten Personen, nachweisbar (siehe Tabelle 3-3, S. 57). Ähnlich hohe und teilweise sogar höhere Toxizitätsraten sind jedoch auch in anderen, bei Patienten mit Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen zur Anwendung kommenden Zytostatika(-Kombinationen) nachweisbar, unter anderem bei DTIC + Gemcitabine (49, 121), Temozolomid (48), Ifosfamid (als Monotherapie) (194) und auch Trabectedin (112) (siehe hierzu Tabelle 1-1, S. 11f). Diese relativ hohen Toxizitätsraten sind wahrscheinlich erklärbar durch die Anwendung myelotoxischer Substanzen wie Ifosfamid im Rahmen von mehreren Vortherapien und der Verabreichung aggressiver Therapiekonzepte auch in späteren Stadien der Erkrankung, so dass hieraus eine hohe kumulative Toxizität der Therapiekonzepte resultiert.

Die üblicherweise dosislimitierende Toxizität von Carboplatin ist eine ausgeprägte Myelosuppression.(200) Dies gilt, unter Verwendung von Mesna zur Vermeidung ausgeprägter urotoxischer Nebenwirkungen und neben der unter Umständen schwierig zu beeinflussenden Neurotoxizität, auch für Ifosfamid, zumindest unter Anwendung im Rahmen von Hochdosiskonzepten.(194) Auch Etoposid zeichnet sich

durch eine dosislimitierende Myelotoxizität aus. Insofern ist bei Anwendung dieser drei Substanzen in Kombination eine deutliche Myelosuppression zu erwarten, auch unter prophylaktischer Applikation von G-CSF. Eine weitere Verstärkung dieses Effektes ist durch Anwendung der regionalen Hyperthermie zu erwarten. In der Arbeit von Issels et al.(77) war im Hyperthermiearm eine signifikant ausgeprägtere Myelotoxizität auffällig. Erklärt wird dies durch eine die Hyperthermie-Behandlung begleitende geringgradige Hyperthermie des Knochenmarks insbesondere im Bereich des Beckens und einer daraus resultierenden verstärkten Zytostatika-Wirkung in diesem Bereich.

Im Vergleich zu anderen zur Anwendung kommenden Therapieprotokollen in der Behandlung Anthrazyklin-refraktärer STS fällt jedoch auf, dass mit Auftreten von febrilen Komplikationen in Zytopenie bei nahezu einem Drittel aller Patienten die Rate dieser Komplikation für ICE + RHT deutlich höher ist. Dabei liegt der Wert für die vorliegende Patientenpopulation noch unter den in der Vorpublikation von Fiegl et al. (44) berichteten Werten für ICE + RHT. Beide chemotherapieassoziierten Todesfälle in der untersuchten Patientenpopulation sind auf septische Komplikationen zurückzuführen (siehe 3.2.3, S. 56). Insofern sind Infekte in der Zytopenie relevante Ursachen für Morbidität und Mortalität der behandelten Patienten.

Die beschriebenen septischen Komplikationen oder Hämatotoxizitäten machten Dosisreduktionen bei nahezu der Hälfte der Patienten erforderlich. Dies trifft auch für Patienten zu, die bereits bei Erstapplikation ICE + RHT in reduzierter Dosis erhalten hatten, weil die Gabe eines volldosierten Zyklus' vom behandelnden Arzt als nicht zumutbar eingeschätzt wurde. Ob eine solche weitere Reduktion der Chemotherapiedosis zu einer reduzierten Wirksamkeit der Therapie führt, lässt sich anhand der hier durchgeföhrten Analysen nicht beantworten. Nur in einzelnen Fällen wurde eine Therapiefortführung von den behandelnden Ärzten deshalb für nicht sinnvoll erachtet, weil von einer Wirksamkeit der Therapie aufgrund einer ausgeprägten Dosisreduktion nicht mehr auszugehen war. Dies betraf jedoch ausschließlich Fälle, bei denen eine Dosisreduktion auf 25% der Ausgangsdosis und weniger vorgenommen werden sollte. Insofern ist, wenngleich nicht wissenschaftlich erwiesen, von einer Dosisreduktion auf 75% oder 50% der Ausgangsdosis bei

Auftreten von Toxizitäten keine Einschränkung der Wirksamkeit der Therapie zu erwarten.

Im Lichte der in dieser Arbeit dokumentierten häufigen, unter Umständen fatalen septischen Komplikationen und der schweren Myelosuppression unter ICE + RHT sollte bei der Mehrheit der Patienten eine Dosisanpassung auf 75% der Ausgangsdosis bereits ab dem ersten Therapiezyklus erfolgen. Ausnahmen hiervon sollten nur bei jungen Patienten in gutem Allgemeinzustand oder bei guter Verträglichkeit der applizierten, auf 75% reduzierten Dosis gemacht werden. Hieraus sollte eine Reduktion der myelotoxischen Nebenwirkungen und somit eine Reduktion der septischen Komplikationen resultieren, ohne dass damit eine Einschränkung der Wirksamkeit zu erwarten wäre. Letzte Sicherheit über die weiterbestehende Wirksamkeit kann jedoch nur eine erneute Auswertung nach Anwendung dieser Empfehlung bringen.

Nicht-hämatologische Nebenwirkungen der Therapie wurden, bei retrospektiver Analyse der Daten, in dieser Arbeit nicht in ausreichender Zuverlässigkeit erfasst. Insofern sind hierzu keine Aussagen möglich, insbesondere hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens Ifosfamid-induzierter Enzephalopathien. In den Arztbriefen wurden jedoch außer septischen Komplikationen keine schwerwiegenden, zur Hospitalisation führenden Toxizitäten genannt. Auch fanden sich keine Hinweise auf nicht zu beherrschende Nausea oder Erbrechen. Insofern ist von einem Nebenwirkungsprofil auszugehen, das den Erwartungen unter Anwendung der Einzelsubstanzen entspricht. Zum Zeitpunkt der Analyse waren keine Sekundär malignome in Folge der Etoposid-Gabe bei den noch lebenden Patienten dokumentiert. Auch bezüglich der Hyperthermiebehandlung waren keine Hinweise auf schwerwiegende Nebenwirkungen wie Verbrennungen oder Fettgewebsnekrosen in den Patientenunterlagen zu finden.

#### **5.1.4 Wirksamkeitsbeurteilung von ICE + RHT**

Im Folgenden soll die Wirksamkeit von ICE + RHT in der Therapie von Anthracyklin-refraktären STS unter Betrachtung der erhobenen Daten zu Überlebenszeiten und Remissionsraten diskutiert werden. Neben der Beurteilung der erreichten PFR-Werte sollen dabei auch Einzelaspekte wie zum Beispiel das lokale Ansprechen bei

Patienten mit metastasierter Erkrankung betrachtet werden, um einen möglichst umfassenden Blick auf die hier erhobenen Daten zu ermöglichen.

#### **5.1.4.1 Progressionsfreie Überlebensrate (PFR)**

Zentrale Hypothese für die Auswertung klinischer Daten in dieser Arbeit ist die folgende Annahme:

*ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie ist eine wirksame Therapieoption in der Zweitlinientherapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Weichteilsarkom. Eine Wirksamkeit wird entsprechend der Vorarbeiten zur Beurteilung von Therapieprotokollen bei Weichteilsarkomen (siehe Abschnitt 1.1.3.1, S. 8) dann angenommen, wenn die progressionsfreie Überlebensrate (PFR) nach 3 Monaten  $\geq 40\%$  liegt.*

Unter der Therapie mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie werden in der in dieser Arbeit untersuchten Patientenpopulation PFR-Werte erreicht, die mit 68,5% nach drei Monaten und 49,6% nach sechs Monaten für alle Patienten deutlich über den in der Arbeit von Van Glabbeke et al. (193) geforderten Zielwerten ( $PFR_3 \text{ Monate} \geq 40\%$  und  $PFR_6 \text{ Monate} \geq 15\%$ ) liegen. Legt man diese Kriterien zu Grunde, dann ist von einer Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung auszugehen. Somit ist die oben zitierte Hypothese anzunehmen.

Die erreichten Werte sind weitgehend vergleichbar mit der Rate an Krankheitsstabilisierungen, die in der Vorarbeit von Fiegl et al.(44) veröffentlicht wurden. Sie liegen im Vergleich zu den anderen, in der Arbeit von Penel et al.(158) zusammengefassten wirksamen Wirkstoff(-kombinationen) über dem Durchschnitt der entsprechenden PFR-Werte. Dennoch lässt sich aus diesen überdurchschnittlichen Werten kein Hinweis auf eine Überlegenheit von ICE + RHT im Vergleich zu anderen Therapieoptionen in der Behandlung Anthrazyklin-refraktärer Weichteilsarkome ableiten. Belastbare Ergebnisse bezüglich der Über- oder Unterlegenheit einzelner Therapieprotokolle sind nur durch Durchführung randomisierter Studien zu gewinnen.

Es ist hervorzuheben, dass die PFR-Zielwerte für wirksame Therapieprotokolle für die Zweitlinienbehandlung von STS durch ICE+RHT sowohl für Patienten mit lokal

fortgeschrittener als auch für Patienten mit metastasierter Erkrankung erfüllt werden. Somit kann angenommen werden, dass ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie bei Vorliegen eines lokal fortgeschrittenen Tumors auch dann wirksam ist, wenn bereits Metastasen nachzuweisen sind. Die PFR-Werte sind für Patienten mit metastasierter Erkrankung erwartungsgemäß mit 56,9% nach drei Monaten und 35,0% nach sechs Monaten niedriger als für Patienten mit ausschließlich lokal fortgeschrittener Erkrankung (siehe Tabelle 3-8, S. 74). Somit kann ICE + RHT sowohl für Patienten mit lokal fortgeschrittenen als auch metastasierter Erkrankung angewendet werden, unter der Voraussetzung, dass auch bei Patienten mit Fernmetastasierung ein lokaler, hyperthermierbarer Tumor nachweisbar ist.

#### **5.1.4.2 *Tumoransprechen***

Trotz ausreichender Validierung der PFR als Marker zur Wirksamkeitsbeurteilung der in der Therapie von Weichteilsarkomen angewendeten Chemotherapeutika ist die erreichte Ansprechraten von großer Bedeutung. Dies gilt insbesondere für Patienten ohne Nachweis von Fernmetastasen oder mit Nachweis singulärer Lungenmetastasen, da diese Patienten von einer Tumormassenreduktion profitieren könnten, indem eine R0-Resektion der Läsionen ermöglicht wird. Gelingt die vollständige Entfernung aller Tumormanifestationen, handelt es sich um ein potentiell kuratives Therapiekonzept, das in einem Teil der Patienten zu langfristigen Remissionen führt. (26) Solche langfristigen Remissionen sind auch im hier untersuchten Patientenkollektiv nachweisbar (siehe Abbildungen 3-8 und 3-9, nicht metastasierte Patienten, S. 61f). Ein Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung ist zumindest in der Erstlinienbehandlung als günstiger prognostischer Faktor mit unter Umständen sogar über Jahre anhaltenden Remissionen gut validiert.(12)

Unter diesem Gesichtspunkt ist die Gesamtansprechraten der Therapie mit ICE in Kombination mit RHT von 13% für alle eingeschlossenen Patienten nach wie vor als unbefriedigend zu werten. Im Vergleich zu anderen wirksamen Therapieprotokollen (vgl. Tabelle 1-1, S.11 f) zeigt sich keine relevant höhere Ansprechraten. Weder die unter ICE + RHT dokumentierten Remissionsraten für Patienten mit ausschließlich lokal fortgeschrittener Erkrankung (21%) noch mit metastasierter Erkrankung (7%) erreichen Werte, die im Sinne einer Überlegenheit im Vergleich zu anderen

Therapieoptionen interpretiert werden können. Somit gelingt mit der Anwendung von ICE + RHT zwar im Vergleich mit anderen, in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS angewendeten Therapieprotokollen überdurchschnittlich häufig eine Stabilisierung der Erkrankung, die auch Ausdruck in der hohen Progressionsstoprate von 60% bei nicht metastasierter und 33% bei metastasierter Erkrankung findet (siehe Tabelle 3-4, S. 58). Eine häufig notwendige Voraussetzung zur erfolgreichen Resektion des Tumors, die Tumormassenreduktion, wird dennoch nicht erreicht. Aus diesen Daten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass nach wie vor für Patienten, die mit großer Wahrscheinlichkeit von einer Tumormassenreduktion profitieren würden (zum Beispiel bei Erkrankung ohne Nachweis von Fernmetastasen und lokal inoperabler Situation) besser remissionsinduzierende Therapiealternativen benötigt werden. Aktuell ist jedoch kein Wirkstoff bekannt, der dieser Forderung gerecht werden würde. Alle Agenzien, die in Tabelle 1-1, (S. 11f) als wirksame Therapieoptionen aufgeführt werden, zeigen unbefriedigende Ansprechraten.

#### **5.1.4.3 Gesamtüberleben**

Bisher sind keine Phase III-Studien zur Therapie Anthrazyklin-refraktärer STS veröffentlicht. In den wenigen Phase II-Studien, die verschiedene Therapieprotokolle in dieser Situation randomisiert verglichen, konnte bisher kein Wirkstoff identifiziert werden, der zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens dieser Patienten beitragen kann (siehe Tabelle 1-1, S.11f). Das Gesamtüberleben ist somit als Parameter aufgrund fehlender Referenzwerte zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS nur unzureichend geeignet. Da jede zytostatische Therapie aber die Verlängerung des Gesamtüberlebens zum Ziel hat, soll auf die hier dokumentierten Werte kurz eingegangen werden.

Das Gesamtüberleben in der untersuchten Patientenpopulation beträgt bei einer relativ langen mittleren Nachbeobachtungszeit von 46 Monaten im Median 17 Monate. Im Vergleich zu anderen, in Tabelle 1-1 dargestellten wirksamen Therapieoptionen ist dies die längste beobachtete mediane Gesamtüberlebenszeit. Eine naheliegende Erklärung hierfür ist der relativ hohe Anteil an nicht metastasierten Patienten im hier untersuchten Patientenkollektiv von knapp unter 50% (siehe Abschnitt 5.1.1, S. 110). Das Gesamtüberleben unterscheidet sich zwar

zwischen metastasierten und nicht metastasierten Patienten nicht signifikant, dennoch ist das Gesamtüberleben der Patienten ohne Nachweis von Fernmetastasen mit im Median 23 Monaten tendenziell länger als bei Patienten mit Nachweis einer Metastasierung (12 Monate). Aufgrund dieser Tatsache lässt sich aus der deutlich überdurchschnittlichen Gesamtüberlebenszeit für die mit ICE + RHT behandelte Patientenpopulation keine Überlegenheit im Vergleich zu anderen Therapieprotokollen ableiten, insbesondere auch weil eine solche Schlussfolgerung einen Vergleich innerhalb einer randomisierten Studie voraussetzen würde. Für nicht wirksame Therapiekonzepte, die die PFR-Kriterien für eine Wirksamkeit nicht erreichen, werden jedoch überwiegend Gesamtüberlebenszeiten von sechs Monaten und weniger berichtet (siehe Tabelle 1-2, S. 17), so dass aus dieser deutlichen Differenz ein möglicher Einfluss der Therapie von ICE + RHT auf das Gesamtüberleben zumindest vermutet werden kann.

Ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen (Patienten mit PR/CR nach RECIST-Kriterien) ist nicht nachweisbar (siehe Abbildung 3-15, S. 67). Dies begründet sich am ehesten durch die Tatsache, dass mit insgesamt nur elf Patienten, die ein Ansprechen gezeigt haben, die Zahl zu gering ist, um hier einen signifikanten Unterschied zu generieren. Andererseits zeigt sich auch bei der entsprechenden Analyse bei Patienten ohne Nachweis einer Fernmetastasierung kein signifikanter Unterschied bezüglich der Dauer des Gesamtüberlebens (siehe Abbildung 3-16, S. 67), obwohl der Anteil an Patienten mit objektivem Ansprechen (PR und CR) in dieser Patientengruppe mit 20% (siehe Tabelle 3-4, S. 58) höher ist als in der Gesamtpopulation. Möglicherweise erklären sich diese Befunde dadurch, dass die Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben zwischen Patienten, bei denen es zu einer Remission unter zytostatischer Behandlung kommt, und Patienten, bei denen lediglich eine Stabilisierung der Erkrankung gelingt, so gering sind, dass sie sich in der hier erfolgten Untersuchung nicht abbilden. Dies würde die Verwendung der PFR als Maß für die Wirksamkeit einer Therapie unterstützen. Ziel einer Remissionsinduktion ist aber immer, wie bereits erwähnt, eine Ermöglichung einer Resektion des Tumors. Dies gelingt in der hier untersuchten Patientenpopulation nicht in befriedigendem Maße. Insofern unterstützen diese Daten die Forderung nach weiteren wirksamen

Substanzen, die ein Ansprechen in einem höheren Anteil zumindest der Patienten erreichen können, die kurativ intendiert behandelt werden.

#### **5.1.4.4 Die regionale Hyperthermie im Behandlungskonzept**

Bisher sind keine Daten publiziert über die Wirksamkeit der regionalen Hyperthermie bei Auftreten eines Rezidivs oder einer Progredienz nach bereits erfolgter Erstlinienbehandlung. Auch die Frage, ob eine erneute Behandlung in Kombination mit regionaler Hyperthermie sinnvoll ist, wenn bereits in einer vorhergehenden Behandlungslinie eine Therapie mit RHT erfolgt ist, ist nicht beantwortet.

Dennoch ist davon auszugehen, dass der deutliche Vorteil, der sich in der randomisierten Studie von Issels et al. (77) hinsichtlich der lokalen Kontrolle und des verbesserten Tumoransprechens für den Therapiearm zeigt, der in Kombination mit RHT verabreicht wurde (vgl. Abschnitt 1.1.5.3, S.25), nicht auf Patienten in frühen Krankheitsstadien begrenzt ist, sondern auch Patienten, die bereits chemotherapeutisch und auch in Kombination mit RHT vorbehandelt sind, profitieren lässt. Dies hat seinen Grund darin, dass Faktoren, die eine bessere Wirksamkeit einer Chemotherapie bei gemeinsamer Applikation mit RHT erklären können, wie die direkte Verstärkung der zytotoxischen Therapie und die vermehrte Perfusion des hyperthermierten Areals, Einflussgrößen sind, die weitgehend unabhängig von sich im Rahmen einer Progredienz des Tumors ändernden Tumorcharakteristika sind. Auch existieren Hinweise, dass die Anwendbarkeit der regionalen Hyperthermie bei Rezidiven (insbesondere in vorbestrahlten Arealen) insgesamt sogar besser ist als bei Primärtumoren, zumindest was die erreichten Temperaturwerte angeht.(190) Somit ist die Entwicklung einer „Resistenz“ des Tumors gegen eine Hyperthermiebehandlung – nicht zu verwechseln mit einer möglicherweise durch Hyperthermie induzierten Thermotoleranz der Zellen an sich – sehr unwahrscheinlich. Insofern ist die Anwendung der RHT auch in der Zweitlinientherapie von STS sinnvoll.

Die Rationale zur Anwendung von Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid in Kombination mit regionaler Hyperthermie liegt in der für Carboplatin (28, 145) und Ifosfamid (79) durch *in vitro* und *in vivo*-Daten ausreichend belegten überadditiven Verstärkung der zytotoxischen Wirkung dieser Substanzen unter gleichzeitiger Hyperthermie; für Etoposid alleine ist keine solche Wirkung nachweisbar(80). Durch

Kombination dieser Substanzen mit einer gleichzeitigen Hyperthermiebehandlung ist deshalb eine Verstärkung der Wirksamkeit dieser Polychemotherapie in der Therapie von STS zu erwarten.

Im Vergleich der analysierten Ansprechraten mit den Ansprechraten anderer Therapiekonzepte in der Behandlung von Anthracyklin-refraktären STS zeigen sich weitgehend ähnliche Ergebnisse. Von einer Überlegenheit der Therapie mit ICE + RHT ist deshalb nicht auszugehen (vgl. Tabelle 1-1, S.11f). Darüber hinaus sind diese Ansprechraten auch nicht signifikant höher als in Publikationen, die ICE (oder analoge Protokolle) *ohne* RHT in der Therapie von Sarkomen untersucht haben.(45, 156) Dennoch erlauben diese Ergebnisse *nicht* den Rückschluss, dass die Anwendung der Hyperthermie in der Rezidsituation oder bei refraktärer Erkrankung *nicht* indiziert ist. In der Arbeit von Fields et al. (45) ist die Fallzahl mit zehn Sarkompatienten sehr niedrig, was die Unsicherheit der Ergebnisse deutlich erhöht. Papai et al. (156) haben Ifosfamid, Cisplatin und Etoposid in der *Erstlinientherapie* von Weichteilsarkomen untersucht. Da diese Patienten keine zytostatische Vorbehandlung erhalten haben, ist die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens grundsätzlich höher, so dass die Ergebnisse der Studien zur Therapie von STS mit ICE ohne RHT nicht mit den hier vorliegenden Daten vergleichbar sind.

Die der vorliegenden Analyse zugrundeliegende Veröffentlichung von Fiegl et al. (44) enthält jedoch Hinweise auf eine Wirksamkeit der RHT auch in bei Patienten mit weit fortgeschrittener STS-Erkrankung: 13 der 20 untersuchten Patienten wurden mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie behandelt; 65% der Patienten waren bereits im Vorfeld mit einer Thermochemotherapie behandelt worden. Interessanterweise waren Remissionen nur bei Patienten zu verzeichnen, die in Kombination mit RHT behandelt worden waren. Dies lässt eine Wirksamkeit der Hyperthermie, zumindest hinsichtlich Tumorregression und Verbesserung der lokalen Kontrolle, auch in der Rezidsituation und bei bereits mit Hyperthermie vorbehandelten Patienten vermuten. Das Unterlassen einer parallelen Hyperthermiebehandlung könnte unter Umständen zur Reduktion der Ansprechraten und einer Verschlechterung des progressionsfreien Überlebens führen, so wie es in der Studie von Issels et al. (77) für den Therapiearm ohne RHT dokumentiert ist. Diese Annahme ist jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit zu bestätigen, da keine Kontrollgruppe vorhanden war, die ohne RHT behandelt wurde.

Ein möglicher Hinweis auf eine effektive Wirkungsverstärkung der zytostatischen Therapie durch die RHT ergibt sich aus den Daten zum lokalen Ansprechen bei Patienten mit metastasierter Erkrankung: hier fällt auf, dass im Bereich des lokal fortgeschrittenen Primarius unter Therapie mit ICE + RHT ein Ansprechen in 14% der Patienten nachzuweisen ist, während die Metastasen in nur 7% der Patienten ein Ansprechen zeigen (siehe Tabelle 3-5, S. 60). Dies ist am ehesten als Wirkung der lokal auf den Tumor applizierten Hyperthermiebehandlung zu verstehen. Die direkten Effekte einer RHT-Behandlung, wie eine Perfusionssteigerung oder eine Verstärkung der Zytotoxizität der applizierten Substanzen, fehlen im Bereich der Fernmetastasen, so dass die Wirksamkeit hier schlechter ist. Zwar ist die Zellbiologie von Tumorzellen in Metastasen und Primärtumoren potentiell unterschiedlich, was ebenfalls eine unterschiedliche Suszeptibilität der Tumormanifestationen erklären könnte, eine auf die Hälfte reduzierte Remissionsrate in Metastasen wäre allein durch diese Tatsache jedoch nur unzureichend erklärt.

#### **5.1.4.5      *Die Behandlung von Patienten mit metastasierter Erkrankung mit ICE + RHT***

Bei der regionalen Hyperthermie handelt es sich um ein lokales Therapieverfahren, über dessen systemische Wirksamkeit – zum Beispiel im Sinne der Induktion einer immunologischen Antwort auf die Tumorerkrankung – bisher wenige belastbare klinische Studienergebnisse verfügbar sind. Dennoch wurde das Therapieverfahren in der vorliegenden Arbeit auch bei Patienten mit Fernmetastasen angewendet. Dieses Vorgehen soll im Folgenden diskutiert werden.

Unabhängig von Effekten der Hyperthermiebehandlung auf lokale und nicht-lokale Manifestationen ist, wie bereits im Abschnitt 5.1.4.1 (S. 117) geschehen, darauf hinzuweisen, dass auch für Patienten mit metastasierter Erkrankung mit einer PFR von 57% nach drei Monaten und 35% nach sechs Monaten die Van-Glabbeke-Kriterien für eine wirksame Therapie von Anthrazyklin-refraktären STS weit überschritten werden. Insofern kann ICE + RHT auch für die Therapie metastasierter Patienten empfohlen werden, die unter 2.1.2 (S. 38) formulierte Hypothese ist auch für diese Patienten anzunehmen.

Die im Abschnitt 5.1.4.4 beschriebene, im Vergleich zum Gesamtansprechen bessere lokale Ansprechraten (siehe Tabelle 3-5, S. 60) kann für Patienten mit

metastasierter Erkrankung bedeutend sein, da insbesondere bei retroperitonealer Lokalisation des Sarkoms nicht so sehr das Ausmaß der Metastasierung prognosebestimmend ist, sondern die Patienten häufig an Primarius-assoziierten Komplikationen versterben.(26, 77) Insofern kann eine durch RHT-Behandlung verbesserte lokale Kontrolle des Tumors, die im Gegensatz zur Resektion oder Radiatio in diesem Bereich relativ nebenwirkungsarm durchgeführt werden kann, für diese Patienten prognoserelevant sein.

Eine Bestätigung der Rolle der lokalen Kontrolle in der Therapie auch von Patienten mit bereits metastasiertem Weichteilsarkom kann aus den Überlebensdaten abgeleitet werden. Zwar ist das Gesamtüberleben bei Patienten mit *nicht metastasierter* Erkrankung mit im Median 23 Monaten tendenziell länger als für Patienten *mit Nachweis von Fernmetastasen* (Median 12 Monate), es ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p=0,089$ , siehe Abbildung 3-9, S. 62). Bei Betrachtung des progressionsfreien Überlebens zeigt sich eine hochsignifikante Differenz zwischen den beiden Patientengruppen: hier ist das progressionsfreie Überleben bei nicht metastasierten Patienten mit acht Monaten im Vergleich zur metastasierten Subgruppe verdoppelt (siehe Abbildung 3-18, S. 69). Dieser signifikante Unterschied im progressionsfreien Überleben insgesamt erklärt sich am ehesten durch ein signifikant längeres fernprogressionsfreies Überleben bei Patienten ohne Metastasen (siehe Abbildung 3-29, S. 78). Das lokal progressionsfreie Überleben dagegen ist für beide Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,090$ ) als Ausdruck einer vergleichbar guten lokalen Kontrolle in beiden Subgruppen (siehe Abbildung 3-25, S. 75). Somit scheint das lokal progressionsfreie Überleben prädiktiv für das Gesamtüberleben zu sein, während ein hochsignifikant schlechteres progressionsfreies Überleben im nicht hyperthermierten Areal keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hat – ein Hinweis auf die entscheidende Rolle der lokalen Kontrolle auch bei Patienten mit metastasierter Erkrankung. Aus diesen Überlegungen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Anwendung der RHT auch bei Patienten mit metastasierter Erkrankung sinnvoll sein könnte.

Darüber hinaus könnten durch die Hitzebehandlung vermittelte immunologische Prozesse den Krankheitsverlauf unter Umständen günstig beeinflussen. Durch Hyperthermie werden immunogene Strukturen, zum Beispiel hsp70, vermehrt aus-

dem Tumor freigesetzt, woraus möglicherweise eine Aktivierung von immunkompetenten Zellen resultiert (siehe Abschnitt 1.2.5, S. 33). Ob eine solche Beeinflussung von entfernt liegenden Tumormanifestationen jedoch tatsächlich vorliegt, kann nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Die vorliegenden klinischen Daten können keine Hinweise auf das Vorhandensein solcher Effekte geben, da hierfür wiederum ein Vergleichsarm fehlt, dessen Patienten ohne RHT behandelt wurden.

#### **5.1.4.6 ICE + RHT in der Behandlung histologischer STS-Subentitäten**

Die differenzierte Betrachtung der Effektivität von Therapieoptionen in definierten histologischen STS-Subtypen ist eine Entwicklung, die in den letzten Jahren deutlichen Zuspruch erfahren hat. Ziel ist es, Subentitäten zu identifizieren, die bei Anwendung bestimmter Zytostatika oder Chemotherapiekombinationen ein überdurchschnittliches Ansprechen beziehungsweise ein überdurchschnittlich langes progressionsfreies Überleben zeigen. Dabei kommen auch Substanzen zur Anwendung, deren Wirksamkeit in der heterogenen Gruppe der STS im Gesamten als unzureichend einzuordnen ist, die also bei Anwendung in nicht vordefinierten Subentitäten keine Wirksamkeit zeigen. Wichtigstes Beispiel für diese Entwicklung ist nach wie vor Imatinib mit ausgeprägter Effektivität in der Therapie der GIST (199), das in der Behandlung anderer STS-Subentitäten unwirksam ist. Darüber hinaus konnte Paclitaxel als wirksames Therapeutikum in der Therapie von Angiosarkomen identifiziert werden (157), während Trabectedin neben der guten Wirksamkeit in STS allgemein besonders gute Ergebnisse bei Patienten mit myxoiden Liposarkomen zeigt.(61)

Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenpopulation ist trotz ihres Umfangs im Sinne der diagnostizierten Subentitäten zu heterogen, um relevante Schlussfolgerungen für eine herausragende Wirksamkeit in einzelnen, vor allem kleineren Subgruppen zuzulassen. Dennoch wurden die Überlebenszeiten von Patienten mit häufig diagnostizierten Subentitäten (38) (Lipo- und Leiomyosarkome) mit den Überlebenszeiten von Patienten mit anderer STS-Subentität verglichen, um mögliche Tendenzen zu erkennen.

Hier zeigt sich eine signifikant längeres Gesamtüberleben der Patienten mit Liposarkomen im Vergleich zu Patienten mit Non-Lipo/Non-Leiomyosarkom-Diagnose ( $p=0,035$ , siehe Abbildung 3-13, S. 65). Die Unterschiede zwischen

Leiomyosarkompatienten zu den anderen Subgruppen sind nicht signifikant. Ähnlich stellt sich die Situation beim progressionsfreien Überleben dar: auch hier ist ausschließlich die Differenz zwischen Patienten mit Liposarkomen und Patienten mit Diagnose einer Non-Lipo/Non-Leiomyosarkom-Subentität signifikant ( $p=0,041$ , siehe Abbildung 3-22, S. 72). Im lokal- und fernprogressionsfreien Überleben zeigen sich für alle Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede.

Liposarkome werden, mit Ausnahme der gut differenzierten Liposarkome, zu den verhältnismäßig Chemotherapie-empfindlichen Weichteilsarkomen gezählt (175). Insofern sind signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben im Vergleich zur Non-Lipo/Non-Leiomyosarkomgruppe zu erwarten. Leiomyosarkome gelten als moderat Chemotherapie-sensibel. Die Überlebensdaten der Leiomyosarkom-Patienten unterscheiden sich nicht relevant von den Daten der Patienten mit anderer Subentität (siehe Abbildung 3-13, S. 65 und Abbildung 3-22, S. 72). Somit lassen sich in dieser Arbeit keine Rückschlüsse auf eine besonders ausgeprägte Wirksamkeit von ICE + RHT in Lipo- oder Leiomyosarkomen ziehen.

Bei Betrachtung der Patienten, die ein Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT zeigten, fällt jedoch auf, dass der Anteil an Patienten mit NOS-Sarkomen überdurchschnittlich hoch ist. In einem Drittel der Patienten mit dieser STS-Subentität war eine Remission unter ICE + RHT nachweisbar. Daraufhin wurden Überlebensanalysen auch für diese Patienten angestellt, die jedoch keine signifikant besseren Werte für das Gesamt- oder progressionsfreie Überleben zeigten (siehe Abbildung 3-14, S. 66 und Abbildung 3-23, S. 73). Dennoch sollte für Patienten mit Anthrazyklin-refraktären NOS-Sarkomen die Gabe von ICE + RHT in jedem Fall in Erwägung gezogen werden.

#### **5.1.4.7 ICE + RHT in der Behandlung von Weichteilsarkomen mit mäßigem (G2) und schlechtem (G3) Differenzierungsgrad**

Die Rolle der adjuvanten Chemotherapie in Patienten mit Weichteilsarkomen wird nach wie vor kontrovers diskutiert.(11, 23, 26, 82) Beim Versuch, Patienten zu identifizieren, die von einer solchen Therapie profitieren können, wurde von Italiano et al.(81) in einer großen retrospektiven Studie gezeigt, dass signifikante Effekte einer adjuvanten Chemotherapie hinsichtlich Gesamt- und metastasenfreiem Überleben nur bei Patienten mit schlecht differenzierten Weichteilsarkomen (G3-

Tumore) nachweisbar sind. Patienten mit G2-Tumoren profitieren demnach nicht von einer solchen Therapie.

Bei Patienten, die in Folge einer Sarkomerkrankung in Kombination mit regionaler Hyperthermie behandelt wurden, konnte jedoch nachgewiesen werden, dass insbesondere für Patienten mit G2-Tumoren die Addition von RHT vorteilhaft ist: in dieser Patientengruppe kommt es zu einer signifikanten Verbesserung des lokal progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens.(75) Über die Gründe für diesen Effekt kann nur spekuliert werden: möglicherweise führt die Überwärmungsbehandlung in G2-Tumoren zu einer Änderung der Chemotherapiesensitivität, indem sie zu einer scheinbaren „Malignisierung“ des Tumors beiträgt, zum Beispiel durch Störung der DNA-Reparaturmechanismen.(170) Eventuell spielt hier auch die Störung intrazellulärer Signalwege durch die Hyperthermie eine Rolle. Diese Effekte könnten in G2-Tumoren, die im Vergleich zu G3-Tumoren weniger stark gestörte Regulationsmechanismen besitzen, verstärkt ins Gewicht fallen.

Das Tumorgrading in Weichteilsarkomen ist der wichtigste prognostische Faktor hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen und hinsichtlich des Gesamtüberlebens.(26, 29) Zu der Frage, ob Patienten mit G2- beziehungsweise G3-Tumoren im Rezidiv oder bei therapierefraktärer Erkrankung signifikant unterschiedliche Gesamtüberlebenszeiten haben, existieren keine Daten.

In der in dieser Arbeit analysierten Patientengruppe sind für das Gesamtüberleben der Gesamtpopulation keine signifikanten Unterschiede für Patienten mit G2- und G3-Tumoren nachweisbar (siehe Abbildung 3-10, S. 62). Für Patienten mit *nicht metastasierter* Erkrankung lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen: Das Gesamtüberleben für Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren ist in dieser Gruppe besser (siehe Abbildung 3-11, S. 63). Dies ist für Patienten mit bereits *metastasierter* Erkrankung nicht nachweisbar, hier überleben Patienten mit G3-Tumoren signifikant schlechter (siehe Abbildung 3-12, S. 64). Für alle weiterführenden Analysen, die das progressionsfreie Überleben betreffen, ergeben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit G2- und G3-STS (siehe Abbildungen 3-19, 3-20, 3-21, 3-26 und 3-30) Damit entsprechen die Ergebnisse im Falle einer *metastasierten* Erkrankung weitgehend den Erwartungen –

Patienten mit schlechter differenziertem Tumor haben eine schlechtere Gesamtüberlebenszeit.

Der Effekt, dass insbesondere G2-Patienten von der Hyperthermiebehandlung profitieren, wie er in der Arbeit von Issels et al. (75) nachweisbar war, ist durch Fehlen einer Kontrollgruppe, die ohne RHT behandelt wurde, in der vorliegenden Arbeit nicht zu beweisen. Indirekte Hinweise sprechen jedoch gegen das Vorhandensein eines solchen Effektes: Patienten mit G2- und G3-Tumoren in *nicht metastasierter* Erkrankung weisen keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben auf. Wäre ein solcher Effekt nachzuweisen, würde man ein signifikant besseres Gesamtüberleben der Patienten mit G2-Tumor erwarten, einerseits aufgrund der postulierten besseren Prognose von G2-Tumoren an sich, andererseits aufgrund der verbesserten Wirkung der zytostatischen Therapie in dieser Patientengruppe. Aus den hier erhobenen Daten ist somit keine Empfehlung zur bevorzugten Anwendung von ICE + RHT in Patienten mit G2-Weichteilsarkomen ableitbar.

Möglicherweise ist die Tumobiologie bei Patienten mit derart weit fortgeschrittener Erkrankung und mehrfachen Vortherapien deutlich unterschiedlich von Tumoren bei Erstdiagnose, so dass dieser Effekt nicht mehr nachweisbar ist. Andererseits zeigen Sarkome im Verlauf der Erkrankung eine Entdifferenzierungstendenz, die jedoch oftmals nicht erfasst wird, wenn keine erneute Tumorresektion durchgeführt wird.(26) Somit könnte ein Teil der Patienten mit G2-STS in dieser Auswertung tatsächlich unter einem schlecht differenzierten Weichteilsarkom leiden. Damit würde die Erfassung von Unterschieden zwischen diesen beiden Gruppen erschwert.

#### **5.1.4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen mit ICE + RHT**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse einer Therapie mit Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE), verabreicht in Kombination mit regionaler Hyperthermie, bei Patienten mit Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen untersucht. Mit insgesamt 92 eingeschlossenen Patienten, die vor Beginn der Therapie allesamt eine progrediente Erkrankung aufwiesen, handelt es sich um eine große Studienpopulation, die in ihren Charakteristika weitgehend repräsentativ für diese Erkrankung ist, mit Ausnahme eines relativ hohen Anteils von Patienten mit

ausschließlich lokaler Erkrankung ohne Nachweis einer Fernmetastasierung. Anhand der progressionsfreien Überlebensrate nach drei und sechs Monaten kann ICE + RHT sowohl bei Patienten mit als auch ohne Nachweis von Fernmetastasen als wirksame Therapie angesehen werden, mit allerdings substantieller Hämatotoxizität und häufigen febrilen Komplikationen in Zytopenie. Die durchgeführten Hyperthermie-Anwendung erreichen die vorgegebenen Zielwerte. In 13% aller Patienten war nach Therapie mit ICE + RHT ein Ansprechen der Tumormanifestationen nachweisbar, wobei dieser Anteil in Patienten mit ausschließlich lokaler Erkrankung höher war als in Patienten mit Fernmetastasen. Der Anteil der regionalen Hyperthermie am Therapierfolg lässt sich aufgrund des Fehlens einer Kontrollgruppe nicht abschätzen, Hinweise auf die prognostische Relevanz der guten lokalen Kontrolle unter ICE + RHT sind aus den vorgelegten Daten jedoch ableitbar. Es konnten keine STS-Subentitäten mit herausragender Suszeptibilität gegenüber ICE + RHT identifiziert werden, NOS-Sarkome scheinen aber überdurchschnittlich häufig auf die Therapie anzusprechen. Sowohl für Patienten mit G2- als auch mit G3-Sarkomen zeigt ICE + RHT eine gute Wirksamkeit, wobei kein ausgeprägter Effekt der RHT-Behandlung für Tumore eines bestimmten Differenzierungsgrades nachweisbar war.

## **5.2           *Die lytische Aktivität von NK-Zellen bei Weichteilsarkom-Patienten***

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Aspekte der Immunkompetenz von Patienten, die unter Weichteilsarkomen leiden, analysiert. Im Speziellen wurde die Frage nach der lytischen Funktion von NK-Zellen und ihrer Beeinflussbarkeit unter Therapie untersucht, insbesondere in Hinblick auf mögliche Einflussfaktoren der regionalen Hyperthermie auf ihre Aktivität. Neben der Betrachtung der lytischen Funktion unmanipulierter NK-Zellen aus dem peripheren Blut wurden auch Stimulationsversuche mit diesen Zellen durchgeführt, um mögliche therapeutische Ansätze aufzuzeigen.

Zunächst werden die Ergebnisse der Analysen zur unstimulierten Aktivität der NK-Zellen diskutiert. Im weiteren Verlauf wird dann auf die Ergebnisse der Stimulationsassays eingegangen.

## **5.2.1 Die unstimulierte NK-Zell-Aktivität**

Zentrale Hypothese dieses Teils der Arbeit war die Annahme, dass eine Behandlung mit regionaler Hyperthermie über eine vermehrte Expression von hsp70 auf der Oberfläche von Tumorzellen zu einer verstärkten lytischen Funktion von NK-Zellen führt (siehe Abschnitt 2.2.2, S. 40). Zum Nachweis dieser Annahme wurden bei Patienten Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie durchgeführt und die aus dem Blut isolierten PBL auf ihre lytische Funktion gegen klassische NK-Targetzellen getestet. Die so erhaltenen Werte wurden mit der NK-Zell-Aktivität gesunder Spender verglichen.

### **5.2.1.1 *Unstimulierte NK-Zell-Aktivität gesunder Spender***

In allen für diese Arbeit durchgeführten Versuchen zur NK-Zell-Funktion wurden als Positivkontrolle parallel Messungen an NK-Zellen gesunder Spender durchgeführt. Diese Zellen zeigten in allen Experimenten eine messbare Aktivität bei einer E/T-Ratio von 20:1, wenngleich das Ausmaß der gemessenen Aktivität von Spender zu Spender unterschiedlich war (siehe Abbildung 4-4, S. 97 und andere).

Gesunde Individuen verfügen also über eine spontane NK-Zell-Aktivität, die interindividuell unterschiedlich ist, was die relativ große Standardabweichung in den hier vorgestellten Daten erklärt. Im Mittelwert ist die Aktivität, die bei gesunden Spendern der hier untersuchten Kohorte nachzuweisen ist, im Vergleich zu anderen Publikationen weitgehend identisch, soweit dieser Vergleich aufgrund methodischer Einschränkungen möglich ist (siehe 5.2.1.2).

Somit ist davon auszugehen, dass die für diese Arbeit durchgeführten Experimente grundsätzlich geeignet sind, um eine valide Einschätzung der lytischen NK-Zell-Aktivität vorzunehmen. Die Verwendung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut, an denen keine weitere Aufreinigung im Sinne einer Isolation von NK-Zellen vorgenommen wird, ist dabei zur Bestimmung der NK-Zell-Aktivität ausreichend, da die eingesetzten Zielzellen (K562) in der Literatur als spezifisches NK-Zell-Target Verwendung finden und eine Beeinflussung der Ergebnisse zum Beispiel durch reaktive zytotoxische T-Zellen nicht beziehungsweise nur in untergeordnetem Umfang anzunehmen ist.(132)

### **5.2.1.2      Unstimulierte NK-Zell-Aktivität vor Einleitung der Zweitlinientherapie**

Zur Beantwortung der Hauptfragestellung (siehe Abschnitt 2.2.1, S. 39) wurde zunächst die NK-Zell-Aktivität von Patienten vor Einleitung einer Zweitlinientherapie (beziehungsweise bei einigen Patienten auch einer Dritt- oder Viertlinientherapie), mehrheitlich aufgrund der Diagnose eines Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkoms, bestimmt. Die Patienten zeigen eine komplett unterdrückte lytische Aktivität ihrer NK-Zellen. Dies gilt mit einer Ausnahme für alle 14 untersuchten Patienten. Es ist ein hochsignifikanter Unterschied der Aktivität von Patienten und gesunden Spendern nachweisbar (siehe Abbildung 4-4, S. 97). Eine Ausnahme stellt hier Patient 8 dar, bei dem eine Aktivität der NK-Zellen nachweisbar ist, die an die Aktivität von gesunden Spendern zumindest heranreicht. Dabei ist hervorzuheben, dass Patient 8 derjenige Patient ist, bei dem die letzte chemotherapeutische Behandlung mit über 17 Jahren mit Abstand am längsten zurückliegt (siehe Tabelle 4-4, S. 94).

In der Literatur finden sich bisher keine Berichte zur NK-Zell-Funktion von Weichteilsarkom-Patienten. Die in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant erniedrigte lytische Aktivität der NK-Zellen ist dennoch im Lichte der bei anderen malignen Erkrankungen nachweisbaren Reduktion der lytischen Aktivität nicht überraschend (siehe Abschnitt 1.2.3, S. 29).

Die Reduktion erscheint im Vergleich zur NK-Zell-Funktion bei anderen Tumorentitäten allerdings sehr ausgeprägt.(96, 129) Ein nachvollziehbarer Vergleich der lytischen Aktivität der NK-Zellen des peripheren Bluts zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten ist jedoch schwierig, da die eingesetzten Methoden teilweise differieren und die Effektor-Target-Ratio häufig größer ist als die hier gewählte E/T-Ratio von 20:1. Darüber hinaus wird die NK-Zell-Aktivität in der absoluten Mehrzahl der Untersuchungen nicht mit der im peripheren Blut vorhandenen NK-Zellzahl korreliert. Unterschiede können grundsätzlich somit auch durch einen unterschiedlichen Gehalt an NK-Zellen in den für die Experimente eingesetzten PBL begründet sein.

In dieser Arbeit liegen NK-Zellzahlen nur von einem Teil der Patienten vor, weshalb eine entsprechende Normalisierung der Aktivität nicht möglich ist. Aus Abschnitt 4.2.3 (S. 108) ist jedoch ersichtlich, dass sich die Anzahl der Leukozyten und die

Anzahl der natürlichen Killerzellen im peripheren Blut der Patienten unter Chemotherapie weitgehend parallel verändern, so dass nach Isolation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation der Anteil an NK-Zellen stabil bleibt. Dies macht eine ausgeprägte Beeinflussung der hier vorgestellten Ergebnisse durch niedrige NK-Zell-Zahlen unwahrscheinlich. Für zukünftige Untersuchungen ist dennoch zu fordern, dass eine Normalisierung der NK-Zell-Aktivität an die absolute NK-Zellzahl erfolgen muss, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren.

Mögliche Gründe für die Reduktion oder vollständige Unterdrückung der NK-Zell-Funktion von Zweitlinienpatienten sind Einflussfaktoren der vorhergehenden Chemotherapie oder eine Beeinflussung der NK-Zell-Aktivität durch die Erkrankung an sich. Die abweichend von allen anderen Zweitlinienpatienten nicht signifikant reduzierte Aktivität von Patient 8 (siehe Abbildung 4-4, S. 97) kann im Sinne einer Beeinflussung der Aktivität durch eine zytostatische Behandlung interpretiert werden, da bei diesem Patienten die letzte Chemotherapie-Applikation über 17 Jahre zurückliegt, während der Zeitabstand zur letzten Gabe einer Chemotherapie bei den anderen Patienten deutlich kürzer zurückliegt (im Median 5,5 Monate).

In Abhängigkeit von der Dauer eines solchen NK-Zell-Aktivitäts-supprimierenden Effektes der Chemotherapie wäre jedoch zu erwarten, dass es bei Patienten, die eine längere Therapiepause hinter sich haben, zu einer eventuell auch nur langsamem Erholung der lytischen Funktion kommt. Abweichend von dieser Annahme zeigen die Patienten, bei denen die letzte chemotherapeutische Behandlung mehr als ein Jahr zurückliegt (Patienten 7, 10 und 13) jedoch keine auch nur tendenziell höhere Aktivität der NK-Zellen im Vergleich zu den Patienten, bei denen eine zytostatische Behandlung deutlich kürzer zurück liegt.

Die in der Literatur verfügbaren Daten zur Beeinflussung der NK-Zell-Aktivität durch verschiedene Zytostatika sind uneinheitlich. Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass eine zytotoxische Behandlung zu einer wahrscheinlich intermittierenden Reduktion der Aktivität der Lymphozyten führt (63), konnte inzwischen für eine ganze Reihe von Zytostatika gezeigt werden, dass es unter Therapie mit diesen Agenzien unter Umständen sogar zu einer Aktivierung von NK-Zellen kommt. Beispiele hierfür sind Cisplatin (116), 5-Fluorouracil (167) und Lenalidomid.(47) Ifosfamid scheint keinen Einfluss auf die lytische Aktivität der NK-Zellen zu haben.(16, 136) Kiyohara

et al. (92) konnten bei Patienten mit Blasen- und Hodenkarzinomen zeigen, dass es bei einem größeren zeitlichen Abstand (etwa ab einem Monat) nach Verabreichung einer Polychemotherapie zu einer vermehrten Aktivität aktiverer NK-Zellen kommt. In Anwesenheit von immunmodulatorischen Agenzien wie Interleukin 2 oder Interferon  $\gamma$  können auch Chemotherapeutika wie Mafosfamid oder Cyclophosphamid, die als Monotherapie verabreicht die Aktivität von NK-Zellen reduzieren, zu einer ausgeprägteren Stimulation der Aktivität führen, als sie bei Inkubation mit den Immunmediatoren alleine nachweisbar sind.(13)

Hinsichtlich der Langzeiteffekte einer Chemotherapie sind nur wenige Daten in der Literatur verfügbar. Bei Patienten mit Hodenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass trotz initial eingeschränkter Funktion der NK-Zellen ein Jahr nach Ende der antineoplastischen Therapie eine normale NK-Zellfunktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisbar ist, wobei sich die untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung in kompletter Remission ihrer Erkrankung befanden.(87) Bei Kindern mit soliden Tumoren zeigte sich ein Jahr nach Beendigung einer Chemotherapie eine persistierende Reduktion der NK-Zell-Aktivität nur in einem kleinen Prozentsatz der untersuchten Patienten (6,7%).(102)

Zusammenfassend lässt sich aus der verfügbaren Literatur also sagen, dass – entgegen ursprünglicher Annahmen – unter chemotherapeutischer Behandlung nicht zwingend mit einem Rückgang der lytischen Aktivität von NK-Zellen zu rechnen ist. Sollte dennoch eine solche Reduktion der NK-Aktivität auftreten, wäre zu erwarten, dass Effekte einer Chemotherapie die NK-Zell-Aktivität über einen Zeitraum von weniger als einem Jahr reduzieren. Auch Patienten, bei denen die letzte zytostatische Behandlung länger als ein Jahr zurückliegt, zeigen in der hier vorliegenden Analyse aber keine wesentliche lytische Funktion der NK-Zellen. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Reduktion beziehungsweise vollständige Unterdrückung der Aktivität, wie sie bei Patienten vor Einleitung einer Zweitlinientherapie nachweisbar ist, zumindest teilweise im Rahmen der Grunderkrankung zu sehen ist.

### **5.2.1.3      *Unstimulierte NK-Zell-Aktivität vor Einleitung der Erstlinientherapie***

Nach Beobachtung der ausgeprägten Reduktion der NK-Zell-Aktivität bei Patienten, die eine Zweitlinientherapie erhalten sollten, wurde die Frage gestellt, ob eine solche reduzierte lytische Aktivität auch bei Patienten nachweisbar ist, die sich bei Erstdiagnose eines STS noch vor Gabe der ersten zytostatischen Therapie vorstellen (siehe Abschnitt 2.2.1, S. 39). Auch diese Patienten zeigen eine signifikante Reduktion der NK-Zell-Aktivität im Vergleich zu gesunden Spendern (siehe Abbildung 4-12, S. 106). Interessanterweise sind die erreichten Aktivitätswerte jedoch auch signifikant höher als die bei Patienten vor Einleitung einer Zweitlinientherapie gemessenen Werte (siehe Abbildung 4-13, S. 107).

Aus diesen Werten lässt sich wiederum ein Einfluss der STS-Erkrankung an sich auf die NK-Funktion ableiten, da im Vorfeld der Messungen keine Chemotherapie verabreicht worden war. Bei vier der sieben untersuchten Erstlinienpatienten wurde allerdings im Vorfeld der Blutentnahme eine Tumorresektion durchgeführt (siehe Tabelle 4-5, S. 96). Es ist bekannt, dass Vollnarkosen und größere chirurgische Eingriffe zu einer Reduktion der lytischen Aktivität von NK-Zellen führen.(107) Eine Resektion von Weichteilsarkomen erfordert üblicherweise große chirurgische Eingriffe zur Einhaltung entsprechender Sicherheitsabstände. Da konventionelle, invasivere Operationstechniken anscheinend einen größeren Einfluss auf die NK-Zell-Funktion nehmen als minimal-invasive Techniken (141), ist eine Auswirkung dieser vorangegangenen Tumorresektionen auf die gemessenen Ergebnisse in dieser Arbeit nicht auszuschließen.

Gründe für die konstitutionelle, scheinbar tumorassoziierte Reduktion der Aktivität sowohl bei Patienten vor Einleitung einer Erstlinien- wie auch Zweitlinientherapie können nicht angeführt werden, da keine entsprechenden Analysen zum Beispiel zur Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D oder CD161 erfolgten. Auch andere, in der Literatur mit einer reduzierten NK-Zell-Aktivität bei Tumorpatienten assoziierte Veränderungen, wie Abweichungen der Zytokinspiegel oder der Expression der  $\xi$ -Kette, wurden nicht untersucht.

#### **5.2.1.4 Veränderungen der NK-Zell-Aktivität im Verlauf der Therapie**

Die zentrale Hypothese, die der Untersuchung der NK-Zell-Funktion zugrunde gelegt wurde, lautet (siehe 2.2.2, S. 40):

*Die spontane lytische NK-Zell-Aktivität, gemessen an NK-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Weichteilsarkom, steigt unter Therapie mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie signifikant an.*

Grundlage für diese Hypothese war der Nachweis einer vermehrten Expression von hsp70 auf der Zellmembran von Tumorzellen unter Hyperthermie(15) sowie der Nachweis einer vermehrten Produktion von hsp70 in hyperthermierten Zellen.(55) Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde angenommen, dass es unter Hyperthermiebehandlung und paralleler Freisetzung von hsp70 aus zerstörten Tumorzellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen kommt, die sich in den Aktivitätslevels der NK-Zellen im peripheren Blut widerspiegelt.

Diese Hypothese muss anhand der vorliegenden Daten zurückgewiesen werden. Im Verlauf der Therapie zeigte sich keine Regeneration der zu Therapiebeginn bereits signifikant erniedrigten NK-Zell-Aktivität. Dies gilt sowohl für den kurzfristigen Verlauf direkt unter Therapie, also bei Blutentnahme unmittelbar nach Komplettierung des jeweiligen Zyklus' (siehe Abbildung 4-5, S. 98), als auch für den längerfristigen Verlauf bei Blutentnahme vor dem folgenden Zyklus (siehe Abbildung 4-7, S. 100). Bei Patient 8, der zu Beginn der Therapie noch eine geringe spontane NK-Zell-Aktivität zeigte, war im weiteren Verlauf ebenfalls keine Aktivität mehr nachweisbar (siehe Abbildung 4-6, S. 99).

Es existieren unterschiedliche Modelle, die eine vermehrte Aktivität der NK-Zellen unter Hyperthermiebehandlung zu erklären versuchen, wobei die Annahme, dass es unter Anwendung einer Hyperthermiebehandlung überhaupt zu einer Steigerung der NK-Zell-Aktivität kommt, nicht als gesichert angesehen werden kann (siehe Abschnitt 1.2.6, S. 33). In der vorliegenden Arbeit ist eine solche vermehrte Aktivität nicht nachweisbar. Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung ist der gleichzeitige Effekt der Chemotherapie, die eine Störung der NK-Zell-Aktivierung verursacht. Über den Einfluss einer zytostatischen Behandlung mit Ifosfamid,

Carboplatin und Etoposid auf die Expression von NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 und CD161 oder den Einfluss auf die MICA/B-Expression auf Sarkomzellen sind allerdings keine Daten verfügbar. Es ist dennoch denkbar, dass es zu einer Störung des Zellstoffwechsels der NK-Zellen des Patienten und hierdurch zu einer Störung der Rezeptorsynthese im Rahmen der chemotherapeutischen Behandlung kommt. Diese Störung könnte zu einer Abnahme der NK-Zell-Aktivität beziehungsweise einem Ausbleiben eines entsprechenden Anstiegs unter Hyperthermiebehandlung führen.

Die Zurückweisung der Hypothese impliziert also nicht zwingend die Negierung einer immunogenen Wirkung der Hyperthermie an sich, vielmehr ist ein solcher Effekt, zumindest auf NK-Zellen des Patienten, aus den Zellen des peripheren Bluts der Patienten nicht nachweisbar. Grund für diese fehlende Nachweisbarkeit ist möglicherweise die Interferenz der gleichzeitig verabreichten zytotoxischen Therapie. Es ist dennoch vorstellbar, dass es lokal im Bereich des Tumors zu einer Aktivierung immunkompetenter Zellen kommt, die durch Anwendung der RHT verstärkt wird. Aufschluss hierüber können jedoch nur weiterführende Analysen geben.

### **5.2.2 Die Stimulation der NK-Zell-Aktivität**

Die Stimulation der NK-Zell-Aktivität ist ein Therapieansatz, der in den letzten Jahren vermehrt Beachtung in der Behandlung von Patienten mit Krebskrankungen gefunden hat. Auf Grundlage dieses Therapiekonzepts wurden auch bei den hier untersuchten Patienten Stimulationsassays durchgeführt, um zu eruieren, ob die Stimulation der NK-Zell-Funktion grundsätzlich geeignet ist, zu einer Verbesserung der Versorgung von Patienten mit STS beizutragen.

#### **5.2.2.1 Stimulierbarkeit der NK-Zell-Aktivität durch IL-2 und TKD**

Alle Zweitlinienpatienten, deren PBL im Rahmen dieser Arbeit auf ihre NK-Zell-Aktivität hin untersucht und bei denen Stimulationsassays durchgeführt wurden, zeigen eine hoch signifikante Zunahme der lytischen NK-Zell-Aktivität nach Stimulation, obwohl vor dieser Stimulation keine relevante Aktivität nachweisbar war (siehe Abbildung 4-7, S. 100). Gleches gilt für die Aktivität von stimulierten PBL der Erstlinienpatienten: auch hier zeigt sich eine hochsignifikante Zunahme der lytischen Aktivität (siehe Abbildung 4-12, S. 106). Dabei überschreitet die Zytotoxizität dieser

stimulierten Patientenproben sogar die Aktivität, die unstimulierte NK-Zellen gesunder Spender zeigen (siehe Abbildung 4-9, S. 102).

Es ist mittels Stimulation also eine relevante NK-Zell-Aktivität auch für die Patienten zu erzeugen, für die im Vorfeld keine Aktivität nachweisbar war. Im weiteren Verlauf der Therapie, nach bis zu sechs Zyklen einer Chemotherapie mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie, bleibt die Aktivierungsfähigkeit der NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2 erhalten, wenngleich die nachzuweisende Aktivität der NK-Zellen tendenziell niedriger ist als vor Beginn der Therapie ( $p= 0,059$ , siehe Abbildung 4-10, S. 103).

Die vorliegenden Daten zur Stimulationsfähigkeit liefern auch Hinweise auf die Genese der signifikant reduzierten nativen NK-Zell-Funktion von Patienten mit STS (siehe Abschnitt 5.2.1, S. 130): offensichtlich existieren bei den untersuchten Patienten Faktoren, die Auswirkungen auf das aktivierend-inhibitorische Gleichgewicht haben. Signale, die von K562-Zellen ausgehen und das Gleichgewicht in Richtung Aktivierung verschieben, also zum Beispiel eine fehlende oder schwache Expression von MHC-Klasse-I (110) oder eine membranständige Expression von hsp70 (138) auf den Zielzellen, erreichen in unstimulierten NK-Zellen der Patienten keinen vergleichbaren Effekt, wie er bei gesunden Spendern nachweisbar ist. Mittels Inkubation mit IL-2 ist diese Blockade der NK-Zell-Aktivierung zu überwinden.

Es erscheint möglich, dass dieser Effekt zum Beispiel durch eine veränderte Expression von aktivierenden Rezeptoren wie NKG2D, CD16 (110) oder CD94 (60) auf den NK-Zellen der Patienten vermittelt wird, durch einen veränderten Gehalt der NK-Zellen an intrazellulären Effektorproteinen wie Granzym B (59) oder Perforin oder durch eine überwiegende Expression inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren wie *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR). Alternativ wäre es auch vorstellbar, dass es unter Erkrankungen wie Weichteilsarkomen zu einer Blockade der aktivierenden Rezeptoren kommt. Ein Hinweis darauf ist in den Arbeiten zu sehen, die bei Inkubation von NK-Zellen gesunder Spender mit Serum von Tumorpatienten eine reduzierte Aktivität der NK-Zellen nachweisen konnten.(100) Eine Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen der fehlenden Aktivierung kann jedoch erst in weiterführenden Analysen erfolgen.

Standardmäßig wurden zur Stimulation Medien verwendet, denen IL-2 in einer Konzentration von 1000 U/ml hinzugefügt war. Diese Konzentration ist im Vergleich

zu Vorgaben aus der Literatur relativ hoch gewählt. (104, 184) Es existieren jedoch auch Arbeiten, bei denen sogar noch höhere IL-2-Konzentrationen zur Aktivierung der NK-Zellen zur Anwendung kamen.(153, 184)

In vergleichenden Stimulationsansätzen konnte gezeigt werden, dass eine IL-2-Konzentration von 100 U/ml ausreichend ist, um eine relevante Aktivierung der lytischen Funktion der NK-Zellen zu erreichen. Die mit dieser Konzentration erreichte Aktivität unterscheidet sich nicht signifikant von den Aktivitätslevels, die nach Inkubation mit 1000 U/ml erreicht wurden (siehe Abbildung 4-11, S. 104) Möglicherweise kommt es unter hohen IL-2-Konzentrationen über 100 U/ml zu einer Sättigung der IL-2-Rezeptoren auf NK-Zellen, so dass keine weitere Verstärkung der Aktivität mehr auslösbar ist.

Eine IL-2-Konzentration von 25 U/ml war in den hier vorliegenden Experimenten nicht ausreichend, um einen messbaren Anstieg der NK-Aktivität auszulösen. Dies mag damit zusammenhängen, dass es bei niedrigen IL-2-Konzentrationen zu einer bevorzugten Stimulation beziehungsweise Expansion von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen kommt, die keine ausgeprägte zytotoxische Wirkung haben, sondern vor allem durch Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon γ oder Tumor Nekrose Faktor α immunmodulatorisch wirken.(6)

Es lässt sich also sagen, dass eine Stimulation mit IL-2 in einer Konzentration von 1000 U/ml oder 100 U/ml zu einer relevanten Steigerung der vorher komplett fehlenden lytischen Aktivität von NK-Zellen führt. Dieser Effekt könnte von therapeutischem Nutzen für STS-Patienten sein.

### **5.2.2.2      *Rolle von TKD in der Stimulation von NK-Zellen***

Zusätzlich zu IL-2 wurde TKD, ein hsp70-Derivat mit NK-Zell-stimulierenden Eigenschaften, zur Aktivierung der NK-Zell-Funktion zur Anwendung gebracht. In verschiedenen Publikationen war ein additiver stimulierender Effekt bei gemeinsamer Inkubation der NK-Zellen mit TKD nachgewiesen worden (137), so dass diese Eigenschaft des Derivats auch an den hier bearbeiteten Patientenproben untersucht werden sollte.

In den durchgeführten Experimenten konnte keine zusätzliche Stimulation der NK-Zell-Aktivität durch TKD nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-11, S. 104). Dies steht im Widerspruch zu allen bisher veröffentlichten Arbeiten zur Wirkung von TKD,

in denen eine additive aktivierende Wirkung auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen nachgewiesen werden konnte.(52, 59, 60, 132, 137, 180) Es muss jedoch betont werden, dass anders als in der vorliegenden Arbeit in diesen Publikationen überwiegend NK-Zellen gesunder Spender zur Anwendung kamen. In einer Arbeit von Krause et al., in der die Verträglichkeit des adoptiven Transfers von autologen NK-Zellen nach *ex vivo* Stimulation mit IL-2/TKD bei Patienten mit metastasierten Colon- und Bronchialkarzinomen untersucht wurde, wird von zwei Patienten berichtet, bei denen es unter Inkubation mit 100 U/ml IL-2 und TKD zu keinem Anstieg der lytischen Aktivität der NK-Zellen kommt.(104) Diese Patienten zeigen allerdings auch keinen Anstieg der Aktivität unter Inkubation mit IL-2 alleine. Somit sind die bei diesen Patienten erhobenen Daten nochmals abweichend zu den Ergebnissen, wie sie für diese Arbeit vorliegen.

Die fehlende Stimulationsfähigkeit von TKD in den hier berichteten Experimenten ist nicht durch eine fehlerhafte TKD-Charge zu erklären, da nach Vorliegen der ersten Ergebnisse TKD aus einer neueren Charge zur Anwendung kam, ohne dass es in Folge zu einem deutlichen Anstieg der NK-Zell-Aktivität nach Inkubation mit IL-2 und TKD kam. Diese Charge wurde in kooperierenden Laboren ebenfalls eingesetzt, wobei eine Aktivität des Polypeptids nachweisbar war.

Da keine weiterführenden Analysen zu Einflussfaktoren wie der Rezeptor-Expression oder des Granzym/Perforin-Gehaltes der NK-Zellen durchgeführt wurden, kann über die Ursache einer ausbleibenden aktivierenden Wirkung von TKD, ebenso wie für die Ursache der reduzierten NK-Zell-Aktivität bei Weichteilsarkompatienten an sich, nur spekuliert werden. Möglicherweise liegen bei Patienten mit Weichteilsarkomen spezifische Veränderungen des Rezeptorbesatzes der NK-Zellen vor, wie sie zum Beispiel bei Patienten mit Colon- oder Bronchialkarzinomen nicht nachweisbar sind. Beträfen diese Veränderungen Rezeptoren, die eine Rolle in der Vermittlung der TKD-Aktivierung spielen, wie CD94 (58) oder Effektoren wie Granzym B als apoptoseinduzierendes Protein in der Kontrolle von Tumorzellen mit membranständiger hsp70-Expression (59), könnten diese Veränderungen ein Ausbleiben der zusätzlichen stimulierenden Wirkung von TKD erklären.

### **5.2.3 Implikationen der Ergebnisse zur NK-Zell-Aktivität für die Therapie von Patienten mit Weichteilsarkomen**

Aufgrund der prominenten Rolle, die NK-Zellen in der Immunosurveillance von malignen Erkrankungen und in der Verhinderung einer Metastasierung einnehmen (vgl. Abschnitt 1.2.1, S. 28), ist davon auszugehen, dass eine Reduktion der Aktivität der Zellen Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung beziehungsweise auf die Transformation von Zellen an sich hat. Wie bereits erwähnt, konnte in einer großen Längsschnittstudie von Imai et al. festgestellt werden, dass Patienten mit reduzierter spontaner NK-Zell-Aktivität eine höheres Risiko für die Entwicklung einer malignen Erkrankung haben.(74) Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist auch abzuleiten, dass die mittels Chrom-Freisetzung-Assay gemessene NK-Zell-Aktivität eine relevante Größe für klinische Fragestellungen und nicht nur ein „Labor-Artefakt“ darstellt.

Insgesamt ist die ausbleibende beziehungsweise signifikant erniedrigte lytische Aktivität der NK-Zellen, wie sie für die hier untersuchten Patienten nachweisbar ist (siehe Abbildung 4-13, S. 107), als unvorteilhaft anzusehen. Eine Augmentation der Aktivität könnte also von klinischem Nutzen sein. Eine Applikation von Interleukin-2 intravenös beziehungsweise subkutan, die zu einer messbaren Stimulation der NK-Zell-Aktivität führt, wurde in unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht und lange Zeit in der Therapie zum Beispiel des metastasierten Nierenzellkarzinoms zur Anwendung gebracht.(125) Auch in Patienten mit metastasiertem malignem Melanom konnten unter IL-2-Therapie relevante Ansprechraten und unter Umständen langanhaltende Remissionen erreicht werden.(133)

Eine ex vivo durchgeführte Stimulation der NK-Zell-Aktivität von Leukaphareseprodukten bietet den Vorteil, dass Agenzien wie IL-2 und TKD ohne oder mit nur sehr geringen systemischen Nebenwirkungen in der Therapie von Patienten mit malignen Erkrankungen angewendet werden können. Ein solcher adoptiver Transfer von autologen, mit IL-2 und TKD aktivierten NK-Zellen wurde in der Therapie von Patienten mit therapierefraktären Colon- oder Bronchialkarzinomen untersucht.(104) Bei einem der behandelten Patienten konnte eine längerfristige Stabilisierung der Erkrankung dokumentiert werden.(127) Insgesamt zeigen die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Phase I/II-Studien zum adoptiven Transfer von ex vivo aktivierten autologen NK-Zellprodukten zwar eine gute Verträglichkeit der

Therapie, die Remissions- und Krankheitsstabilisierungsraten sind aber enttäuschend.(20, 21, 118, 153, 184) Die Verwendung von allogenem, zum Beispiel haploidentischen NK-Zellen als Therapiealternative erscheint deshalb attraktiv, weil in diesem Setting ein möglicher KIR-Mismatch zu einer verstärkten Aktivität der allogenen NK-Zellen gegen Tumorzellen des Empfängers führen könnte. Erste Ergebnisse zeigen, dass eine solche Therapie sicher und ohne Induktion einer Graft-versus-Host-Erkrankung des Empfängers durchgeführt werden kann. In ausgewählten Tumorentitäten konnten durch eine solche Therapie Remissionen erreicht werden.(128, 168)

Daten zur Therapie mit systemisch appliziertem IL-2 in Patienten mit Weichteilsarkomen sind nicht verfügbar. Ebenso wenig wurden bisher Patienten mit Weichteilsarkomen in Studien zum adoptiven Transfer von autologen oder allogenen aktivierten NK-Zellen behandelt. Da es unter RHT-Anwendung nicht, wie ursprünglich angenommen, zu einer Aktivierung von NK-Zellen zumindest im peripheren Blut von STS-Patienten kommt, erscheint es sinnvoll, alternative Möglichkeiten der Augmentation der NK-Zell-Aktivität, wie sie hier dargestellt wurden, bei Patienten mit Weichteilsarkomen auf ihre Effektivität zu prüfen.

### **5.3            Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie ein Protokoll zur Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen zur Verfügung steht, das in einem relevanten Teil der Patienten zu einer Remission oder zu einer Stabilisierung der Erkrankung führen kann. Dies ist anhand der hohen PFR-Raten nach drei und sechs Monaten zu dokumentieren. Die entsprechenden Werte übersteigen die Zielwerte, die zur Feststellung einer Wirksamkeit eines Therapiekonzeptes erreicht werden sollten, deutlich. Die assoziierte Toxizität des Therapieprotokolls – zumindest in der hier standardmäßig zur Anwendung kommenden Dosierung – schränkt die Anwendbarkeit von ICE + RHT jedoch auf ein Patientenkollektiv in gutem Allgemeinzustand ein. Insbesondere im Licht aufkommender Therapieoptionen im Management von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen wie zum Beispiel Tyrosinkinaseinhibitoren, deren Nebenwirkungsprofil als günstiger zu bewerten ist, ist es von entscheidender Bedeutung, Patienten zu identifizieren, die von der möglicherweise höheren

Wahrscheinlichkeit einer Remissionsinduktion unter ICE in Kombination mit regionaler Hyperthermie profitieren könnten. Patientengruppen, für die dies zutreffen könnte, sind Patienten mit nicht metastasierter oder oligometastasierter Erkrankung mit einzelnen pulmonalen Metastasen, bei denen durch ein operatives Vorgehen nach Anwendung von ICE + RHT auch langfristige Remissionen oder eine Heilung der Erkrankung möglich erscheinen.

Für diese Patientengruppe sollte in Zukunft mittels randomisierter Studien geprüft werden, ob sie von einer intensiven Therapie, wie sie ICE + RHT darstellt, profitieren. Eine Prüfung der Wirksamkeit der regionalen Hyperthermie wäre im Rahmen einer solchen Studie ebenfalls wünschenswert. Der Aspekt der Lebensqualität, der bisher in Studien zur Therapie von Weichteilsarkomen kaum Beachtung gefunden hat, sollte insbesondere bei Patienten mit bereits metastasierter Erkrankung in solche Studien in jedem Fall mit einbezogen werden.

Durch die Analyse der Aktivität natürlicher Killerzellen in Patienten mit Weichteilsarkomen ist es im Rahmen dieser Arbeit darüber hinaus gelungen, Veränderungen der NK-Zell-Aktivität in diesen Patienten zu identifizieren. Eine Wiederherstellung dieser Aktivität stellt ein möglicherweise lohnendes Ziel in der Weiterentwicklung kombinierter Therapieansätze dar. In welcher Form dies am günstigsten zu erreichen ist, wird erst abzusehen sein, wenn die den phänotypischen Veränderungen zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert sind. Hierfür sind Analysen zum Beispiel hinsichtlich involvierter Rezeptoren, Effektoren und deren Veränderung durch eine Stimulationsbehandlung mit Interleukin 2 erforderlich. Unter Umständen gelingt durch diese Arbeiten die Identifikation von Einflussfaktoren, die im Rahmen einer Kombinationsbehandlung von Patienten mit Weichteilsarkomen so modifiziert werden können, dass sie antineoplastische Substanzen in ihrer Wirksamkeit unterstützen können.

## 6 Zusammenfassung

Weichteilsarkome (STS) sind seltene maligne Neoplasien, die von bindegewebigen Strukturen wie Fett-, Muskel- oder Stützgewebe ausgehen und im gesamten Körper auftreten können. Goldstandard der Therapie ist die Resektion aller Manifestationen unter Mitnahme ausreichender Sicherheitsabstände. Da dies jedoch nicht in allen Patienten möglich ist, wird versucht, durch Verabreichung zytostatischer Substanzen eine Tumormassenreduktion zu erreichen. Dies gelingt mit den vorhandenen Chemotherapeutika mit erwiesener Wirksamkeit, insbesondere Doxorubicin, jedoch nur in etwa einem Drittel aller Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung einer regionalen Hyperthermie (RHT) das Ansprechen der Patienten verbessert.

Noch anspruchsvoller ist die Therapie von Patienten mit bereits metastasierter, rezidivierender oder Doxorubicin-refraktärer Erkrankung. Hier ist bislang keine Standardtherapie definiert. Die vorliegende Arbeit evaluiert eine in dieser Situation angewendete Polychemotherapie, bestehend aus Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) und appliziert in Kombination mit RHT, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit. Zudem wurde die Funktion natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) als an der Kontrolle von Neoplasien beteiligte Effektoren des Immunsystems bei Patienten mit STS untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ICE + RHT eine wirksame Therapieoption für Patienten mit Anthrazyklin-refraktärem STS darstellt, und zwar sowohl für Patienten mit als auch ohne Fernmetastasen. Remissionen waren in 13% der Patienten nachweisbar, überwiegend konnte eine Krankheitsstabilisierung erreicht werden. Die Therapie ist jedoch assoziiert mit einer höhergradigen hämatologischen Toxizität und febrilen Komplikationen in einem signifikanten Anteil der Patienten, so dass ICE + RHT nur ausgewählten Patienten in gutem Allgemeinzustand verabreicht werden sollte.

Die lytische Funktion der NK-Zellen war noch vor Beginn einer Therapie bei Patienten mit Erstdiagnose eines STS sowie bei Patienten mit Anthrazyklin-refraktärem STS signifikant reduziert im Vergleich zu gesunden Probanden. Während der Therapie mit ICE + RHT zeigte sich keine Zunahme dieser Funktion. Durch Inkubation der Zellen mit Interleukin 2 und TKD, einem Hitzeschockprotein-Derivat mit NK-stimulierenden Eigenschaften, konnte die Funktion *in vitro* wiederhergestellt werden. Die Augmentation der NK-Zell-Funktion könnte in Zukunft von therapeutischem Nutzen für Patienten mit STS sein.

## Zusammenfassung

**7****Literaturverzeichnis**

1. **Agulnik M.** New developments in mammalian target of rapamycin inhibitors for the treatment of sarcoma. *Cancer* (August 11, 2011). doi: 10.1002/cncr.26361.
2. **Antman KH, Ryan L, Elias A, Sherman D, Grier HE.** Response to ifosfamide and mesna: 124 previously treated patients with metastatic or unresectable sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 7: 126–131, 1989.
3. **Azocar J, Yunis EJ, Essex M.** Sensitivity of human natural killer cells to hyperthermia. *Lancet* 1: 16–17, 1982.
4. **Barlozzari T, Reynolds CW, Herberman RB.** In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J. Immunol.* 131: 1024–1027, 1983.
5. **Baxevanis CN, Reclos GJ, Gritzapis AD, Dedousis GV, Missitzis I, Papamichail M.** Elevated prostaglandin E2 production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer* 72: 491–501, 1993.
6. **Becknell B, Caligiuri MA.** Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 86: 209–239, 2005.
7. **Benz MR, Czernin J, Allen-Auerbach MS, Tap WD, Dry SM, Elashoff D, Chow K, Evilevitch V, Eckardt JJ, Phelps ME, Weber WA, Eilber FC.** FDG-PET/CT imaging predicts histopathologic treatment responses after the initial cycle of neoadjuvant chemotherapy in high-grade soft-tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.* 15: 2856–2863, 2009.
8. **Berwick M, Song Y, Jordan R, Brady MS, Orlow I.** Mutagen sensitivity as an indicator of soft tissue sarcoma risk. *Environ. Mol. Mutagen.* 38: 223–226, 2001.
9. **Blair SC, Zalupski MM, Baker LH.** Ifosfamide and etoposide in the treatment of advanced soft tissue sarcomas. *Am. J. Clin. Oncol.* 17: 480–484, 1994.
10. **Blay J-Y, Judson I, Rodenhuis S, Hermans C, Smith M, Van Glabbeke M, Verweij J.** Phase II study of raltitrexed (“Tomudex”) for patients with advanced soft tissue sarcomas refractory to doxorubicin-containing regimens. *Anticancer Drugs* 10: 873–877, 1999.
11. **Blay J-Y, Le Cesne A.** Adjuvant chemotherapy in localized soft tissue sarcomas: still not proven. *Oncologist* 14: 1013–1020, 2009.

12. **Blay J-Y, Van Glabbeke M, Verweij J, van Oosterom AT, Le Cesne A, Oosterhuis JW, Judson I, Nielsen OS.** Advanced soft-tissue sarcoma: a disease that is potentially curable for a subset of patients treated with chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 39: 64–69, 2003.
13. **Blomgren H.** Influence of low doses of an oxazaphosphorine on natural killer activity of human lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 29: 151–153, 1989.
14. **Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R.** Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun.* 8: 10, 2008.
15. **Botzler C, Ellwart J, Günther W, Eissner G, Multhoff G.** Synergistic effects of heat and ET-18-OCH<sub>3</sub> on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells. *Exp. Hematol.* 27: 470–478, 1999.
16. **Botzler C, Kis K, Issels R, Multhoff G.** A comparison of the effects of ifosfamide vs. mafosfamide treatment on intracellular glutathione levels and immunological functions of immunocompetent lymphocyte subsets. *Exp. Hematol.* 25: 338–344, 1997.
17. **Brockstein B, Samuels B, Humerickhouse R, Arietta R, Fishkin P, Wade J, Sosman J, Vokes EE.** Phase II studies of bryostatin-1 in patients with advanced sarcoma and advanced head and neck cancer. *Invest New Drugs* 19: 249–254, 2001.
18. **Buesa JM, Mouridsen HT, van Oosterom AT, Verweij J, Wagener T, Steward W, Poveda A, Vestlev PM, Thomas D, Sylvester R.** High-dose DTIC in advanced soft-tissue sarcomas in the adult. A phase II study of the E.O.R.T.C. Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Ann Oncol* 2: 307–309, 1991.
19. **Bundesamt für Statistik.** Todesursachen in Deutschland, 2011.
20. **Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Repka TL, Ogle KM, Hummer C, Miller JS.** Enhancement of the anti-tumor activity of a peripheral blood progenitor cell graft by mobilization with interleukin 2 plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced breast cancer. *Exp. Hematol.* 28: 96–103, 2000.
21. **Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, Burger SR, Panoskalsis-Mortari A, Keever-Taylor CA, Zhang M-J, Miller JS.** IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant* 32: 177–186, 2003.

22. **Cancer, The International Agency for Research on Cancer.** *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone (IARC WHO Classification of Tumours)*. 3rd ed. World Health Organization, 2006.
23. **Casali PG, Blay J-Y, ESMO/CONTICANET/EUROBONET Consensus Panel of experts.** Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v198–203, 2010.
24. **Casali PG, Picci P.** Adjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Curr Opin Oncol* 17: 361–365, 2005.
25. **Chawla SP, Chua VS, Fernandez L, Quon D, Saralou A, Blackwelder WC, Hall FL, Gordon EM.** Phase I/II and Phase II Studies of Targeted Gene Delivery In Vivo: Intravenous Rixin-G for Chemotherapy-resistant Sarcoma and Osteosarcoma. *Mol Ther* 17: 1651–1657, 2009.
26. **Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM.** Soft-tissue sarcomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 353: 701–711, 2005.
27. **Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M.** The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79: 2320–2328, 1997.
28. **Cohen JD, Robins HI, Schmitt CL.** Tumoricidal interactions of hyperthermia with carboplatin, cisplatin and etoposide. *Cancer Lett.* 44: 205–210, 1989.
29. **Coindre J-M.** Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130: 1448–1453, 2006.
30. **Coley HM, Verrill MW, Gregson SE, Odell DE, Fisher C, Judson IR.** Incidence of P-glycoprotein overexpression and multidrug resistance (MDR) reversal in adult soft tissue sarcoma. *Eur. J. Cancer* 36: 881–888, 2000.
31. **Dayanc BE, Beachy SH, Ostberg JR, Repasky EA.** Dissecting the role of hyperthermia in natural killer cell mediated anti-tumor responses. *Int J Hyperthermia* 24: 41–56, 2008.
32. **De Boniface J, Poschke I, Mao Y, Kiessling R.** Tumor-dependent down-regulation of the  $\zeta$ -chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function. *Int. J. Cancer* (August 5, 2011). doi: 10.1002/ijc.26355.
33. **de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Schneiter G, Dayer J-M, Villard J.** The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res. Ther.* 9: R125, 2007.

34. **Demetri GD, Chawla SP, Mehren von M, Ritch P, Baker LH, Blay JY, Hande KR, Keohan ML, Samuels BL, Schuetze S, Lebedinsky C, Elsayed YA, Izquierdo MA, Gómez J, Park YC, Le Cesne A.** Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. *J. Clin. Oncol.* 27: 4188–4196, 2009.
35. **Dikomey HHKE.** Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance. *Int J Radiat Biol* 77: 399–408, 2001.
36. **Dinges S, Harder C, Wurm R, Buchali A, Blohmer J, Gellermann J, Wust P, Random H, Budach V.** Combined treatment of inoperable carcinomas of the uterine cervix with radiotherapy and regional hyperthermia. Results of a phase II trial. *Strahlenther Onkol* 174: 517–521, 1998.
37. **Dombernowsky P, Buesa J, Pinedo HM, Santoro A, Mouridsen H, Somers R, Bramwell V, Onsrud M, Rouesse J, Thomas D.** VP-16 in advanced soft tissue sarcoma: a phase II study of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 579–580, 1987.
38. **Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere A-V, Péoc'h M, Istier L, Chalabreysse P, Muller C, Alberti L, Bringuer P-P, Scoazec J-Y, Schott A-M, Bergeron C, Cellier D, Blay J-Y, Ray-Coquard I.** Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS ONE* 6: e20294, 2011.
39. **Edmonson JH, Ryan LM, Blum RH, Brooks JS, Shiraki M, Frytak S, Parkinson DR.** Randomized comparison of doxorubicin alone versus ifosfamide plus doxorubicin or mitomycin, doxorubicin, and cisplatin against advanced soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* 11: 1269–1275, 1993.
40. **Eriksson M, Hardell L, Adami HO.** Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 486–490, 1990.
41. **Evilevitch V, Weber WA, Tap WD, Allen-Auerbach M, Chow K, Nelson SD, Eilber FR, Eckardt JJ, Elashoff RM, Phelps ME, Czernin J, Eilber FC.** Reduction of glucose metabolic activity is more accurate than change in size at predicting histopathologic response to neoadjuvant therapy in high-grade soft-tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.* 14: 715–720, 2008.

42. **Ferraresi V, Ciccarese M, Cercato MC, Nuzzo C, Zeuli M, Di Filippo F, Giannarelli D, Cognetti F.** Gemcitabine at fixed dose-rate in patients with advanced soft-tissue sarcomas: a mono-institutional phase II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63: 149–155, 2008.
43. **Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton GW, Hersey P.** Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int. J. Cancer* 23: 603–609, 1979.
44. **Fiegl M, Schlemmer M, Wendtner C-M, Abdel-Rahman S, Fahn W, Issels RD.** Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) as second-line regimen alone and in combination with regional hyperthermia is active in chemo-pre-treated advanced soft tissue sarcoma of adults. *Int J Hyperthermia* 20: 661–670, 2004.
45. **Fields KK, Zorsky PE, Hiemenz JW, Kronish LE, Elfenbein GJ.** Ifosfamide, carboplatin, and etoposide: a new regimen with a broad spectrum of activity. *J. Clin. Oncol.* 12: 544–552, 1994.
46. **Fujieda S, Noda I, Saito H, Hoshino T, Yagita M.** Heat shock enhances the susceptibility of tumor cells to lysis by lymphokine-activated killer cells. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121: 1009–1014, 1995.
47. **Galustian C, Labarthe M-C, Bartlett JB, Dagleish AG.** Thalidomide-derived immunomodulatory drugs as therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1963–1970, 2004.
48. **Garcia del Muro X, Lopez-Pousa A, Martin J, Buesa JM, Martinez-Trufero J, Casado A, Poveda A, Cruz J, Bover I, Maurel J, Spanish Group for Research on Sarcomas.** A phase II trial of temozolomide as a 6-week, continuous, oral schedule in patients with advanced soft tissue sarcoma: a study by the Spanish Group for Research on Sarcomas. *Cancer* 104: 1706–1712, 2005.
49. **Garcia del Muro X, Lopez-Pousa A, Maurel J, Martin J, Martinez-Trufero J, Casado A, Gómez-España A, Fra J, Cruz J, Poveda A, Meana A, Pericay C, Cubedo R, Rubió J, De Juan A, Laínez N, Carrasco JA, de Andrés R, Buesa JM, Spanish Group for Research on Sarcomas.** Randomized phase II study comparing gemcitabine plus dacarbazine versus dacarbazine alone in patients with previously treated soft tissue sarcoma: a Spanish Group for Research on Sarcomas study. *J. Clin. Oncol.* 29: 2528–2533, 2011.

50. **Garcia-Carbonero R, Supko JG, Manola J, Seiden MV, Harmon D, Ryan DP, Quigley MT, Merriam P, Canniff J, Goss G, Matulonis U, Maki RG, Lopez T, Puchalski TA, Sancho MA, Gomez J, Guzman C, Jimeno J, Demetri GD.** Phase II and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 in patients with progressive sarcomas of soft tissues refractory to chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 22: 1480–1490, 2004.
51. **Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL.** Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18: 89–95, 1997.
52. **Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G.** Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 65: 5238–5247, 2005.
53. **Gehrmann M, Liebisch G, Schmitz G, Anderson R, Steinem C, De Maio A, Pockley G, Multhoff G.** Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS ONE* 3: e1925, 2008.
54. **Gehrmann M, Pfister K, Hutzler P, Gastpar R, Margulis B, Multhoff G.** Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol. Chem.* 383: 1715–1725, 2002.
55. **Gehrmann M, Radons J, Molls M, Multhoff G.** The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress Chaperones* 13: 1–10, 2008.
56. **Goldstein D, Cheuvart B, Trump DL, Shiraki M, Comis RL, Tormey DC, Harris JE, Borden EC.** Phase II trial of carboplatin in soft-tissue sarcoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 13: 420–423, 1990.
57. **Greenwood M.** *The natural duration of cancer. Reports on Public Health and Medical Subjects. Her Majesty's Stationery Office* : 1–26, 1926.
58. **Gross C, Hansch D, Gastpar R, Multhoff G.** Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.* 384: 267–279, 2003.
59. **Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G.** Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J. Biol. Chem.* 278: 41173–41181, 2003.

60. **Gross C, Schmidt-Wolf IGH, Nagaraj S, Gastpar R, Ellwart J, Kunz-Schughart LA, Multhoff G.** Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* 8: 348–360, 2003.
61. **Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay J-Y, Le Cesne A, Sanfilippo R, Casieri P, Collini P, Dileo P, Spreafico C, Stacchiotti S, Tamborini E, Tercero JC, Jimeno J, D'Incalci M, Gronchi A, Fletcher JA, Pilotti S, Casali PG.** Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 8: 595–602, 2007.
62. **Hafner M, Orosz P, Krüger A, Männel DN.** TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity. *Int. J. Cancer* 66: 388–392, 1996.
63. **Harris JE, Sengar D, Stewart T, Hyslop D.** The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease. *Cancer* 37: 1058–1069, 1976.
64. **Hartmann JT, Hartmann JT, Mayer F, Mayer F, Schleicher J, Schleicher J, Horger M, Horger M, Huober J, Huober J, Meisinger I, Meisinger I, Pintoffl J, Pintoffl J, Käfer G, Käfer G, Kanz L, Kanz L, Grünwald V, Grünwald V.** Bendamustine hydrochloride in patients with refractory soft tissue sarcoma. *Cancer* 110: 861–866, 2007.
65. **Hartmann JT, Oechsle K, Huober J, Jakob A, Azemar M, Horger M, Kanz L, Bokemeyer C.** An open label, non-comparative phase II study of gemcitabine as salvage treatment for patients with pretreated adult type soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs* 24: 249–253, 2005.
66. **Hensley ML, Blessing JA, Mannel R, Rose PG.** Fixed-dose rate gemcitabine plus docetaxel as first-line therapy for metastatic uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group phase II trial. *Gynecol. Oncol.* 109: 329–334, 2008.
67. **Hensley ML, Maki R, Venkatraman E, Geller G, Lovegren M, Aghajanian C, Sabbatini P, Tong W, Barakat R, Spriggs DR.** Gemcitabine and docetaxel in patients with unresectable leiomyosarcoma: results of a phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 20: 2824–2831, 2002.
68. **Hensley ML, Sill MW, Scribner DR Jr, Brown J, Debernardo RL, Hartenbach EM, McCourt CK, Bosscher JR, Gehrig PA.** Sunitinib malate in the treatment of recurrent or persistent uterine leiomyosarcoma: A Gynecologic Oncology Group phase II study. *Gynecol. Oncol.* 115: 460–465, 2009.

69. **Herbst RS, Herbst RS, Eckhardt SG, Eckhardt SG, Kurzrock R, Kurzrock R, Ebbinghaus S, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, O'Dwyer PJ, Gordon MS, Gordon MS, Novotny W, Novotny W, Goldwasser MA, Goldwasser MA, Tohnya TM, Tohnya TM, Lum BL, Lum BL, Ashkenazi A, Ashkenazi A, Jubb AM, Jubb AM, Mendelson DS, Mendelson DS.** Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28: 2839–2846, 2010.
70. **Heymach JV, Desai J, Manola J, Davis DW, McConkey DJ, Harmon D, Ryan DP, Goss G, Quigley T, Van den Abbeele AD, Silverman SG, Connors S, Folkman J, Fletcher CDM, Demetri GD.** Phase II study of the antiangiogenic agent SU5416 in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.* 10: 5732–5740, 2004.
71. **Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, Clough SL, Blair GE, Cook GP.** A human NK cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells. *J. Immunol.* 186: 1538–1545, 2011.
72. **Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A.** *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.* Berlin: 2010.
73. **Hwang S-J, Lozano G, Amos CI, Strong LC.** Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 975–983, 2003.
74. **Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K.** Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356: 1795–1799, 2000.
75. **Issels R, Laubender R, Lindner L, Mansmann U, Kampmann E, Verweij J, Reichardt B, Schern S, Daugaard S, Niederhagen M, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Wendtner C, Jauch K, Duerr H, Windhager R, Hiddemann W, Blay J, Hohenberger P.** Effect of FNCLCC grade 2 versus grade 3 on survival after neoadjuvant chemotherapy (NAC) plus or minus regional hyperthermia (RHT) in soft tissue sarcomas (STS): An analysis of the EORTC-ESHO Intergroup phase III study. *J. Clin. Oncol.* 29 (suppl; abstr 10021), 2011.
76. **Issels RD, Abdel-Rahman S, Wendtner C-M, Falk MH, Kurze V, Sauer H, Aydemir U, Hiddemann W.** Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur. J. Cancer* 37: 1599–1608, 2001.

77. **Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem B-C, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner C-M, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch K-W, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay J-Y, Hohenberger P, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC-STBSG), European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO).** Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* 11: 561–570, 2010.
78. **Issels RD, Prenninger SW, Nagele A, Boehm E, Sauer H, Jauch KW, Denecke H, Berger H, Peter K, Wilmanns W.** Ifosfamide plus etoposide combined with regional hyperthermia in patients with locally advanced sarcomas: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 8: 1818–1829, 1990.
79. **Issels RD.** Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer* 44: 2546–2554, 2008.
80. **Istomin YP, Zhavrid EA, Sachivko NV, Alexandrova EN, Pocheshinsky PV.** The effect of cytostatics and hyperthermia on RAJI human lymphoma cells. *Exp. Oncol.* 33: 19–23, 2011.
81. **Italiano A, Delva F, Mathoulin-Pelissier S, Le Cesne A, Bonvalot S, Terrier P, Trassard M, Michels J-J, Blay J-Y, Coindre JM, Bui B.** Effect of adjuvant chemotherapy on survival in FNCLCC grade 3 soft tissue sarcomas: a multivariate analysis of the French Sarcoma Group Database. *Ann Oncol* 21: 2436–2441, 2010.
82. **Italiano A, Penel N, Robin Y-M, Bui B, Le Cesne A, Piperno-Neumann S, Tubiana-Hulin M, Bompas E, Chevreau C, Isambert N, Leyvraz S, Chatelard du PP, Thyss A, Coindre JM, Blay J-Y.** Neo/adjuvant chemotherapy does not improve outcome in resected primary synovial sarcoma: a study of the French Sarcoma Group. *Ann Oncol* 20: 425–430, 2009.
83. **Jimenez RE, Zalupski MM, Frank JJ, Du W, Ryan JR, Lucas DR.** Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. *Cancer* 86: 976–981, 1999.
84. **Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner E.** Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *European Journal of Cell Biology* ( March 2011). doi: 10.1016/j.ejcb.2011.02.001.
85. **Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, Kirkwood JM, Lotze MT, Herberman RB.** Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 5: 1303–1315, 2005.

86. **Kaplan E, Meier P.** Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American statistical association* 53: 457–481, 1958.
87. **Kastelan Z, Pasini J, Derezić D, Lukac J, Kusić Z, Mrazovac D, Sosić H, Kastelan M.** Immunocompetence in non-seminomatous testicular cancer patients before any treatment and one year after completion of therapy. *Anticancer Res.* 24: 3251–3255, 2004.
88. **Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD.** Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol.* 96: 16–23, 1996.
89. **Kärre K.** NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol.* 55: 221–228, 2002.
90. **Keizer HJ, Crowther D, Nielsen OS, Oosterom ATV, Muguiro JH, Pottelberghe CV, Somers R, Tursz T.** EORTC Group Phase II Study of Oral Etoposide for Pretreated Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma* 1: 99–101, 1997.
91. **Kim H-R, Lee K-H, Park SJ, Kim SY, Yang YK, Tae J, Kim J.** Anti-cancer activity and mechanistic features of a NK cell activating molecule. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 1691–1700, 2009.
92. **Kiyohara T, Taniguchi K, Kubota S, Koga S, Sakuragi T, Saitoh Y.** Induction of lymphokine-activated killer-like cells by cancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* 168: 2355–2360, 1988.
93. **Koga T, Harada H, Shi TS, Okada S, Suico MA, Shuto T, Kai H.** Hyperthermia suppresses the cytotoxicity of NK cells via down-regulation of perforin/granzyme B expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337: 1319–1323, 2005.
94. **Kollmannsberger C, Brugger W, Hartmann JT, Maurer F, Böhm P, Kanz L, Bokemeyer C.** Phase II study of oral trofosfamide as palliative therapy in pretreated patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Anticancer Drugs* 10: 453–456, 1999.
95. **Komdeur R, Plaat BEC, van der Graaf WTA, Hoekstra HJ, Hollema H, van den Berg E, Zwart N, Scheper RJ, Molenaar WM.** Expression of multidrug resistance proteins, P-gp, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *Eur. J. Cancer* 39: 909–916, 2003.

96. **Konjević G, Jurisić V, Banićevic B, Spuzić I.** The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Br. J. Haematol.* 104: 144–151, 1999.
97. **Konjević G, Jurisić V, Spuzić I.** Association of NK cell dysfunction with changes in LDH characteristics of peripheral blood lymphocytes (PBL) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 66: 255–263, 2001.
98. **Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Jović V, Jurisić V, Babović N, Spuzić I.** Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin. Exp. Metastasis* 24: 1–11, 2007.
99. **Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S.** Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN- $\alpha$  enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomed. Pharmacother.* 64: 663–671, 2010.
100. **Konjević G, Spuzić I.** Evaluation of different effects of sera of breast cancer patients on the activity of natural killer cells. *J Clin Lab Immunol* 38: 83–93, 1992.
101. **Korn EL, Arbuck SG, Pluda JM, Simon R, Kaplan RS, Christian MC.** Clinical trial designs for cytostatic agents: are new approaches needed? *J. Clin. Oncol.* 19: 265–272, 2001.
102. **Kovacs GT, Barany O, Schlick B, Csoka M, Gado J, Ponyi A, Müller J, Nemeth J, Hauser P, Erdelyi DJ.** Late immune recovery in children treated for malignant diseases. *Pathol. Oncol. Res.* 14: 391–397, 2008.
103. **Köstler WJ, Brodowicz T, Attems Y, Hejna M, Tomek S, Amann G, Fiebiger WC, Wiltschke CH, Krainer M, Zielinski CC.** Docetaxel as rescue medication in anthracycline- and ifosfamide-resistant locally advanced or metastatic soft tissue sarcoma: results of a phase II trial. *Ann Oncol* 12: 1281–1288, 2001.
104. **Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H, Thonigs G, Pfister K, Multhoff G.** Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 10: 3699–3707, 2004.
105. **Kuenen BC, Tabernero J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF, Seeber S, Madhusudan S, Deplanque G, Huisman H, Scigalla P, Hoekman K, Harris AL.** Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma, and soft tissue sarcoma. *Clin. Cancer Res.* 9: 1648–1655, 2003.

106. **Kurzrock R, Kurzrock R, Patnaik A, Patnaik A, Aisner J, Aisner J, Warren T, Warren T, Leong S, Leong S, Benjamin R, Benjamin R, Eckhardt SG, Eckhardt SG, Eid JE, Eid JE, Greig G, Greig G, Habben K, Habben K, McCarthy CD, McCarthy CD, Gore L, Gore L.** A Phase I Study of Weekly R1507, A Human Monoclonal Antibody Insulin-like Growth Factor-I Receptor Antagonist, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 16: 2458–2465, 2010.
107. **Kutza J, Gratz I, Afshar M, Murasko DM.** The effects of general anesthesia and surgery on basal and interferon stimulated natural killer cell activity of humans. *Anesth. Analg.* 85: 918–923, 1997.
108. **Lagendijk JJ, Van Rhoon GC, Hornsleth SN, Wust P, De Leeuw AC, Schneider CJ, Van Dijk JD, Van Der Zee J, Van Heek-Romanowski R, Rahman SA, Gromoll C.** ESHO quality assurance guidelines for regional hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 14: 125–133, 1998.
109. **Lanier LL.** NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225–274, 2005.
110. **Lanier LL.** Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9: 495–502, 2008.
111. **Le Cesne A, Antoine E, Spielmann M, Le Chevalier T, Brain E, Toussaint C, Janin N, Kayitalire L, Fontaine F, Genin J.** High-dose ifosfamide: circumvention of resistance to standard-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol.* 13: 1600–1608, 1995.
112. **Le Cesne A, Blay J-Y, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, Lorigan P, Rodenhuis S, Ray-Coquard I, Bonvalot S, Collin F, Jimeno J, Di Paola E, Van Glabbeke M, Nielsen OS.** Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: a European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *J. Clin. Oncol.* 23: 576–584, 2005.
113. **Leahy M, Ray-Coquard I, Verweij J, Le Cesne A, Duffaud F, Hogendoorn PCW, Fowst C, de Balincourt C, di Paola ED, van Glabbeke M, Judson I, Blay J-Y, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group.** Brostallicin, an agent with potential activity in metastatic soft tissue sarcoma: a phase II study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 43: 308–315, 2007.
114. **Lee SH, Chang MH, Baek KK, Han B, Lim T, Lee J, Park JO.** High-dose Ifosfamide as second- or third-line chemotherapy in refractory bone and soft tissue sarcoma patients. *Oncology* 80: 257–261, 2011.

115. **Licht JD, Mazanet R, Loehrer PJ, Gonin R, Antman KH.** Phase IV trial of daily oral etoposide in the treatment of advanced soft-tissue sarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34: 79–80, 1994.
116. **Lichtenstein AK, Pende D.** Enhancement of natural killer cytotoxicity by cis-diamminedichloroplatinum (II) in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 46: 639–644, 1986.
117. **Lindner LH, Issels RD.** Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 12: 12–20, 2011.
118. **Lister J, Rybka WB, Donnenberg AD, deMagalhaes-Silverman M, Pincus SM, Bloom EJ, Elder EM, Ball ED, Whiteside TL.** Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period. *Clin. Cancer Res.* 1: 607–614, 1995.
119. **Look KY, Sandler A, Blessing JA, Lucci JA, Rose PG, Gynecologic Oncology Group (GOG) Study.** Phase II trial of gemcitabine as second-line chemotherapy of uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group (GOG) Study. *Gynecol. Oncol.* 92: 644–647, 2004.
120. **Lorigan P, Verweij J, Papai Z, Rodenhuis S, Le Cesne A, Leahy MG, Radford JA, Van Glabbeke MM, Kirkpatrick A, Hogendoorn PCW, Blay J-Y, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study.** Phase III trial of two investigational schedules of ifosfamide compared with standard-dose doxorubicin in advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 25: 3144–3150, 2007.
121. **Losa R, Fra J, López-Pousa A, Sierra M, Goitia A, Uña E, Nadal R, Del Muro JG, Gión M, Maurel J, Escudero P, Esteban E, Buesa JM.** Phase II study with the combination of gemcitabine and DTIC in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59: 251–259, 2007.
122. **Lutgendorf SK, Sood AK, Anderson B, McGinn S, Maiseri H, Dao M, Sorosky JI, De Geest K, Ritchie J, Lubaroff DM.** Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 23: 7105–7113, 2005.
123. **Macdonald HR, Engers HD, Cerottini JC, Brunner KT.** Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. II. Effect of repeated exposure to alloantigens on the cytotoxic activity of long-term mixed leukocyte cultures. *J. Exp. Med.* 140: 718–730, 1974.

124. **Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Gregory SA.** NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia* 22: 998–1006, 2008.
125. **McDermott DF.** Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 115: 2298–2305, 2009.
126. **Merimsky O, Meller I, Flusser G, Kollender Y, Issakov J, Weil-Ben-Arush M, Fenig E, Neuman G, Sapir D, Ariad S, Inbar M.** Gemcitabine in soft tissue or bone sarcoma resistant to standard chemotherapy: a phase II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45: 177–181, 2000.
127. **Milani V, Stangl S, Issels R, Gehrmann M, Wagner B, Hube K, Mayr D, Hidemann W, Molls M, Multhoff G.** Anti-tumor activity of patient-derived NK cells after cell-based immunotherapy--a case report. *J Transl Med* 7: 50, 2009.
128. **Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB.** Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploididentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105: 3051–3057, 2005.
129. **Mirjačić Martinović K, Konjević G, Babović N, Inić M.** The Stage Dependent Changes in NK Cell Activity and the Expression of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Melanoma Patients. *J. Surg. Res.* (June 8, 2010). doi: 10.1016/j.jss.2010.05.012.
130. **Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, Bubeck A, Louis J, Mailhammer R, Riethmüller G, Koszinowski U, Röcken M.** Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19: 561–569, 2003.
131. **Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A.** Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* 100: 7–13, 2005.
132. **Moser C, Schmidbauer C, Gürtler U, Gross C, Gehrmann M, Thonigs G, Pfister K, Multhoff G.** Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated, CD94 positive natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* 7: 365–373, 2002.
133. **Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano J-P, Khayat D.** Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 74: 27–39, 2010.

134. **Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Eissner G, Issels R.** CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood* 86: 1374–1382, 1995.
135. **Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD.** A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* 61: 272–279, 1995.
136. **Multhoff G, Meier T, Botzler C, Wiesnet M, Allenbacher A, Wilmanns W, Issels RD.** Differential effects of ifosfamide on the capacity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to lyse their target cells correlate with intracellular glutathione levels. *Blood* 85: 2124–2131, 1995.
137. **Multhoff G, Pfister K, Gehrmann M, Hantschel M, Gross C, Hafner M, Hiddemann W.** A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* 6: 337–344, 2001.
138. **Multhoff G.** Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods* 43: 229–237, 2007.
139. **Myerson RJ, Leybovich L, Emami B, Grigsby PW, Straube W, Gerichten Von D.** Phantom studies and preliminary clinical experience with the BSD 2000. *Int J Hyperthermia* 7: 937–951, 1991.
140. **Nakayama J, Nakao T, Mashino T, Nagae S, Hori Y, Mayumi H, Tominaga R, Yasui H, Matsuda K, Takahashi S.** Kinetics of immunological parameters in patients with malignant melanoma treated with hyperthermic isolated limb perfusion. *J. Dermatol. Sci.* 15: 1–8, 1997.
141. **Ng CSH, Lee TW, Wan S, Wan IYP, Sihoe ADL, Arifi AA, Yim APC.** Thoracotomy is associated with significantly more profound suppression in lymphocytes and natural killer cells than video-assisted thoracic surgery following major lung resections for cancer. *J Invest Surg* 18: 81–88, 2005.
142. **Nielsen OS, Judson I, van Hoesel Q, Le Cesne A, Keizer HJ, Blay J-Y, Van Oosterom A, Radford JA, Svancarova L, Krzemienlecki K, Hermans C, Van Glabbeke M, Oosterhuis JW, Verweij J.** Effect of high-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. A multicentre phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 36: 61–67, 2000.
143. **Nurmi T, Uhari M, Kouvalainen K.** Temperature and natural killer cell activity. *Lancet* 1: 516–517, 1982.

144. **O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L.** Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS ONE* 5: e8660, 2010.
145. **Ohno S, Siddik ZH, Baba H, Stephens LC, Strebel FR, Wondergem J, Khokhar AR, Bull JM.** Effect of carboplatin combined with whole body hyperthermia on normal tissue and tumor in rats. *Cancer Res.* 51: 2994–3000, 1991.
146. **Ohtsuka K, Hata M.** Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *Int J Hyperthermia* 16: 231–245, 2000.
147. **Olmos D, Olmos D, Postel-Vinay S, Postel-Vinay S, Molife LR, Molife LR, Okuno SH, Okuno SH, Schuetze SM, Schuetze SM, Paccagnella ML, Paccagnella ML, Batzel GN, Batzel GN, Yin D, Yin D, Pritchard-Jones K, Pritchard-Jones K, Judson I, Judson I, Worden FP, Worden FP, Gualberto A, Gualberto A, Scurr M, Scurr M, de Bono JS, de Bono JS, Haluska P, Haluska P.** Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol.* 11: 129–135, 2010.
148. **Olsson H.** A review of the epidemiology of soft tissue sarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl* 285: 8–10, 1999.
149. **Olsson H.** An updated review of the epidemiology of soft tissue sarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl* 75: 16–20, 2004.
150. **Oosten AW, Seynaeve C, Schmitz PIM, Bakker den MA, Verweij J, Sleijfer S.** Outcomes of First-Line Chemotherapy in Patients with Advanced or Metastatic Leiomyosarcoma of Uterine and Non-Uterine Origin. *Sarcoma* 2009: 1–6, 2009.
151. **Ostberg JR, Dayanc BE, Yuan M, Oflazoglu E, Repasky EA.** Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICa on target cells. *J. Leukoc. Biol.* 82: 1322–1331, 2007.
152. **Palumbo R, Palmeri S, Antimi M, Gatti C, Raffo P, Villani G, Toma S.** Phase II study of continuous-infusion high-dose ifosfamide in advanced and/or metastatic pretreated soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 8: 1159–1162, 1997.
153. **Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA.** Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin. Cancer Res.* 17: 6287–6297, 2011.

154. **Patel S, Keohan ML, Saif MW, Rushing D, Baez L, Feit K, DeJager R, Anderson S.** Phase II study of intravenous TZT-1027 in patients with advanced or metastatic soft-tissue sarcomas with prior exposure to anthracycline-based chemotherapy. *Cancer* 107: 2881–2887, 2006.
155. **Patrikidou A, Domont J, Cioffi A, Le Cesne A.** Treating soft tissue sarcomas with adjuvant chemotherapy. *Curr Treat Options Oncol* 12: 21–31, 2011.
156. **Pápai Z, Bodoky G, Szántó J, Poller I, Rahóty P, Eckhardt S, Láng I, Szendroi M.** The efficacy of a combination of etoposide, ifosfamide, and cisplatin in the treatment of patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* 89: 177–180, 2000.
157. **Penel N, Bui BN, Bay J-O, Cupissol D, Ray-Coquard I, Piperno-Neumann S, Kerbrat P, Fournier C, Taieb S, Jimenez M, Isambert N, Peyrade F, Chevreau C, Bompas E, Brain EGC, Blay J-Y.** Phase II trial of weekly paclitaxel for unresectable angiosarcoma: the ANGIOTAX Study. *J. Clin. Oncol.* 26: 5269–5274, 2008.
158. **Penel N, Van Glabbeke M, Marreaud S, Ouali M, Blay J-Y, Hohenberger P.** Testing new regimens in patients with advanced soft tissue sarcoma: analysis of publications from the last 10 years. *Ann Oncol* (December 23, 2010). doi: 10.1093/annonc/mdq608.
159. **Pfister K, Radons J, Busch R, Tidball JG, Pfeifer M, Freitag L, Feldmann H-J, Milani V, Issels R, Multhoff G.** Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer* 110: 926–935, 2007.
160. **Pincus LB, Fox LP.** Images in clinical medicine. The Stewart-Treves syndrome. *N. Engl. J. Med.* 359: 950, 2008.
161. **Rau B, Wust P, Hohenberger P, Löffel J, Hünerbein M, Below C, Gellermann J, Speidel A, Vogl T, Riess H, Felix R, Schlag PM.** Preoperative hyperthermia combined with radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer: a phase II clinical trial. *Ann. Surg.* 227: 380–389, 1998.
162. **Raut CP, Pisters PWT.** Retroperitoneal sarcomas: Combined-modality treatment approaches. *J Surg Oncol* 94: 81–87, 2006.
163. **Ray-Coquard I, Le Cesne A, Whelan JS, Schöffski P, Bui BN, Verweij J, Marreaud S, van Glabbeke M, Hogendoorn P, Blay J-Y.** A phase II study of gefitinib for patients with advanced HER-1 expressing synovial sarcoma refractory to doxorubicin-containing regimens. *Oncologist* 13: 467–473, 2008.

164. **Ray-Coquard I, Le Cesne A.** A role for maintenance therapy in managing sarcoma. *Cancer Treatment Reviews* ( August 13, 2011). doi: 10.1016/j.ctrv.2011.07.003.
165. **Reichardt P, Oechsle K, Pink D, Bokemeyer C, Schneller F, Issels R, Kanz L, Hartmann JT.** An open label, non-comparative phase II study of topotecan as salvage treatment for patients with soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs* 21: 481–486, 2003.
166. **Reichardt P, Reichardt P, Nielsen OS, Nielsen OS, Bauer S, Bauer S, Hartmann JT, Hartmann JT, Schoffski P, Schoffski P, Christensen TB, Christensen TB, Pink D, Pink D, Daugaard S, Daugaard S, Marreaud S, Marreaud S, Van Glabbeke M, Van Glabbeke M, Blay J-Y, Blay J-Y.** Exatecan in pretreated adult patients with advanced soft tissue sarcoma: Results of a phase II – Study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European Journal of Cancer* 43: 1017–1022, 2007.
167. **Reiter Z, Ozes ON, Blatt LM, Taylor MW.** A dual anti-tumor effect of a combination of interferon-alpha or interleukin-2 and 5-fluorouracil on natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62: 103–111, 1992.
168. **Ren X-B, Yu J-P, Cao S, Ren B-Z, Li H, Liu H, Min W-P, Hao X-S.** Antitumor effect of large doses IL-2-activated HLA haploidentical peripheral blood stem cells on refractory metastatic solid tumor treatment. *Cancer Biother. Radiopharm.* 22: 223–234, 2007.
169. **Richards JM.** Therapeutic uses of interleukin-2 and lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Blood Rev.* 3: 110–119, 1989.
170. **Roti Roti JL.** Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication. *Int J Hyperthermia* 23: 3–15, 2007.
171. **Rydholm A.** Improving the management of soft tissue sarcoma. Diagnosis and treatment should be given in specialist centres. *BMJ* 317: 93–94, 1998.
172. **Saeter G, Alvegård TA, Monge OR, Strander H, Turesson I, Klepp R, Söderberg M, Wist E, Raabe N, Erlanson M, Solheim OP, Hannisdal E.** Ifosfamide and continuous infusion etoposide in advanced adult soft tissue sarcoma. A Scandinavian Sarcoma Group Phase II Study. *Eur. J. Cancer* 33: 1551–1558, 1997.
173. **Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D, Costello RT.** Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 60: 1–13, 2011.

174. **Santoro A, Tursz T, Mouridsen H, Verweij J, Steward W, Somers R, Buesa J, Casali P, Spooner D, Rankin E.** Doxorubicin versus CYVADIC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J. Clin. Oncol.* 13: 1537–1545, 1995.
175. **Scurr M.** Histology-driven chemotherapy in soft tissue sarcomas. *Curr Treat Options Oncol* 12: 32–45, 2011.
176. **Sleijfer S, Ray-Coquard I, Papai Z, Le Cesne A, Scurr M, Schöffski P, Collin F, Pandite L, Marreaud S, De Brauwer A, van Glabbeke M, Verweij J, Blay J-Y.** Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043). *J. Clin. Oncol.* 27: 3126–3132, 2009.
177. **Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y.** Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42: 501–510, 2005.
178. **Song CW, Shakil A, Griffin RJ, Okajima K.** Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen. *Semin. Oncol.* 24: 626–632, 1997.
179. **Späth-Schwalbe E, Genvresse I, Koschuth A, Dietzmann A, Grunewald R, Possinger K.** Phase II trial of gemcitabine in patients with pretreated advanced soft tissue sarcomas. *Anticancer Drugs* 11: 325–329, 2000.
180. **Stangl S, Wortmann A, Guertler U, Multhoff G.** Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *J. Immunol.* 176: 6270–6276, 2006.
181. **Stephens HA.** MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 22: 378–385, 2001.
182. **Stuart-Harris RC, Harper PG, Parsons CA, Kaye SB, Mooney CA, Gowing NF, Wiltshaw E.** High-dose alkylating therapy using ifosfamide infusion with mesna in the treatment of adult advanced soft-tissue sarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 11: 69–72, 1983.
183. **Subbiah V, Kurzrock R.** Phase 1 clinical trials for sarcomas: the cutting edge. *Curr Opin Oncol* ( April 2011). doi: 10.1097/CCO.0b013e3283477a94.

184. **Sutlu T, Alici E.** Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern. Med.* 266: 154–181, 2009.
185. **Svancarova L, Blay J-Y, Judson IR, van Hoesel QGCM, van Oosterom AT, Le Cesne A, Keizer HJ, Hermans C, Van Glabbeke M, Verweij J, Hogendoorn PCW, Nielsen OS.** Gemcitabine in advanced adult soft-tissue sarcomas. A phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 38: 556–559, 2002.
186. **Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E.** Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 901564, 2010.
187. **Szmigielski S, Sobczynski J, Sokolska G, Stawarz B, Zielinski H, Petrovich Z.** Effects of local prostatic hyperthermia on human NK and T cell function. *Int J Hyperthermia* 7: 869–880, 1991.
188. **Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG.** New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 205–216, 2000.
189. **Thigpen T, Blessing JA, Yordan E, Valea F, Vaccarello L.** Phase II Trial of Etoposide in Leiomyosarcoma of the Uterus: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol. Oncol.* 63: 120–122, 1996.
190. **Tilly W, Wust P, Rau B, Harder C, Gellermann J, Schlag PM, Budach V, Felix R.** Temperature data and specific absorption rates in pelvic tumours: predictive factors and correlations. *Int J Hyperthermia* 17: 172–188, 2001.
191. **Urano M, Kuroda M, Nishimura Y.** For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* 15: 79–107, 1999.
192. **Van Der Zee J, Peer-Valstar JN, Rietveld PJ, de Graaf-Strukowska L, Van Rhoon GC.** Practical limitations of interstitial thermometry during deep hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 40: 1205–1212, 1998.
193. **Van Glabbeke M, Verweij J, Judson I, Nielsen OS, EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group.** Progression-free rate as the principal end-point for phase II trials in soft-tissue sarcomas. *Eur. J. Cancer* 38: 543–549, 2002.

194. **van Oosterom AT, Mouridsen HT, Nielsen OS, Dombernowsky P, Krzemieniecki K, Judson I, Svancarova L, Spooner D, Hermans C, Van Glabbeke M, Verweij J, EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group.** Results of randomised studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (STBSG) with two different ifosfamide regimens in first- and second-line chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma patients. *Eur. J. Cancer* 38: 2397–2406, 2002.
195. **van Unnik JA.** Classification and grading of soft-tissue sarcomas. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9: 677–700, 1995.
196. **Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P.** Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49: 6449–6465, 1989.
197. **Verma S, Younus J, Stys-Norman D, Haynes AE, Blackstein M, Members of the Sarcoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-Based Care.** Meta-analysis of ifosfamide-based combination chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma. *Cancer Treatment Reviews* 34: 339–347, 2008.
198. **Verweij J, Lee SM, Ruka W, Buesa J, Coleman R, van Hoessel R, Seynaeve C, di Paola ED, Van Glabbeke M, Tonelli D, Judson IR.** Randomized phase II study of docetaxel versus doxorubicin in first- and second-line chemotherapy for locally advanced or metastatic soft tissue sarcomas in adults: a study of the European organization for research and treatment of cancer soft tissue and bone sarcoma group. *J. Clin. Oncol.* 18: 2081–2086, 2000.
199. **Verweij J, Van Oosterom A, Blay J-Y, Judson I, Rodenhuis S, van der Graaf W, Radford J, Le Cesne A, Hogendoorn PCW, di Paola ED, Brown M, Nielsen OS.** Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur. J. Cancer* 39: 2006–2011, 2003.
200. **Vidal L, Magem M, Barlow C, Pardo B, Florez A, Montes A, Garcia M, Judson I, Lebedinsky C, Kaye SB, Salazar R.** Phase I clinical and pharmacokinetic study of trabectedin and carboplatin in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* ( October 7, 2010). doi: 10.1007/s10637-010-9559-3.
201. **Walter S, Buchner J.** Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41: 1098–1113, 2002.

202. **Wendtner C-M, Abdel-Rahman S, Baumert J, Falk MH, Krych M, Santl M, Hiddemann W, Issels RD.** Treatment of primary, recurrent or inadequately resected high-risk soft-tissue sarcomas (STS) of adults: results of a phase II pilot study (RHT-95) of neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia. *Eur. J. Cancer* 37: 1609–1616, 2001.
203. **Wendtner C-M, Delank S, Eich H.** [Multimodality therapy concepts for soft tissue sarcomas]. *Internist (Berl)* 51: 1388–1396, 2010.
204. **Whiteside TL, Herberman RB.** Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1: 125–133, 1994.
205. **Wiedemann GJ, Robins HI, Gutsche S, Mentzel M, Deeken M, Katschinski DM, Eleftheriadis S, Crahe R, Weiss C, Storer B, Wagner T.** Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) combined with 41.8 degrees C whole body hyperthermia in patients with refractory sarcoma. *Eur. J. Cancer* 32A: 888–892, 1996.
206. **Wiltshaw E, Westbury G, Harmer C, McKinna A, Fisher C.** Ifosfamide plus mesna with and without adriamycin in soft tissue sarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 18 Suppl 2: S10–2, 1986.
207. **Woll PJ, Judson I, Lee SM, Rodenhuis S, Nielsen OS, Buesa JM, Lorigan PC, Leyvraz S, Hermans C, Van Glabbeke M, Verweij J.** Temozolomide in adult patients with advanced soft tissue sarcoma: a phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer* 35: 410–412, 1999.
208. **Wust P, Gellermann J, Harder C, Tilly W, Rau B, Dinges S, Schlag PM, Budach V, Felix R.** Rationale for using invasive thermometry for regional hyperthermia of pelvic tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 41: 1129–1137, 1998.
209. **Yovine A, Riofrio M, Blay J-Y, Brain E, Alexandre J, Kahatt C, Taamma A, Jimeno J, Martin C, Salhi Y, Cvitkovic E, Misset JL.** Phase II study of ecteinascidin-743 in advanced pretreated soft tissue sarcoma patients. *J. Clin. Oncol.* 22: 890–899, 2004.
210. **Zahm SH, Fraumeni JF.** The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin. Oncol.* 24: 504–514, 1997.
211. **Zanker KS, Lange J.** Whole body hyperthermia and natural killer cell activity. *Lancet* 1: 1079–1080, 1982.
212. **Zwirner NW, Domaica CI.** Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36: 274–288, 2010.
213. **Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0.** [https://webapps.ctep.nci.nih.gov/webobj/ctc/webhelp/welcome\\_to\\_ctcae.htm](https://webapps.ctep.nci.nih.gov/webobj/ctc/webhelp/welcome_to_ctcae.htm)

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<sup>18</sup> F-2-FDG	<sup>18</sup> F-Fluordesoxyglucose
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
AI	Polychemotherapie, bestehend aus Doxorubicin (Adriamycin) und Ifosfamid
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> , erworbenes Immundefizienzsyndrom
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenmerkmal von Zellen
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPFS	<i>distant progression free survival</i> , fernprogressionsfreies Überleben
DTIC	Dacarbazin
EIA	Polychemotherapie, bestehend aus Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin (Adriamycin)
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i> , in Ewing-Sarkomen nachweisbares Fusionsgen
FasL	<i>Fas ligand</i>
FCS	Fätales Kälberserum
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer</i>
G	Giga ( $10^9$ )
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
G1	histopathologisch gut differenzierter Tumor
G2	histopathologisch mittelgradig differenzierter Tumor
G3	histopathologisch gering differenzierter Tumor
Gb3	Globotriaosylceramid
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HLA	humane Leukozyten-Antigen
hsp	Hitzeschockprotein
ICE	Polychemotherapie, bestehend aus Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid
IL-2	Interleukin 2
KG	Körpergewicht
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptors</i>
KÖF	Körperoberfläche
LAK	<i>lymphokine activated killer cells</i>
LGL	<i>large granular lymphocytes</i> , große granulierte Lymphozyten
LPFS	<i>local progression free survival</i> , lokal progressionsfreies Überleben
LPR	<i>lung resistance-related protein</i> , mit <i>multi-drug-resistance</i> assoziiertes Protein
MDR	<i>multi drug resistance</i> , Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl zytostatischer Medikamente
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA/B	<i>MHC class I chain-related protein A/B</i>
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidenentumor
MPR1	<i>multidrug resistance-associated protein 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
NC	<i>no change</i> , im Verlauf der Therapie unveränderter Nachweis der Tumorgröße
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptors</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOS	<i>not otherwise specified</i> , histopathologische Weichteilsarkom-Subentität, die den unklassifizierbaren Weichteilsarkomen zugerechnet wird
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i> , Lymphozyten des peripheren Bluts
PD	<i>progressive disease</i> , Fortschreiten der Tumorerkrankung
PET/CT	Positronenemissionstomographie/Computertomographie
PFR	<i>progression free survival rate</i> , progressionsfreie Überlebensrate
PFS	<i>progression free survival</i> , progressionsfreies Überleben
Pgp	<i>P-glycoprotein</i> mit <i>multi-drug-resistance</i> assoziiertes Protein
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
PR	partielle Remission

---

R0	Tumorresektion mit auch mikroskopisch tumorfreiem Absetzungsrand
R1	Tumorresektion mit makroskopisch vollständiger Entfernung des Tumors, mikroskopisch jedoch bis an den Absetzungsrand reichendem Tumorgewebe
R2	Tumorresektion mit auch makroskopisch erkennbarem, <i>in situ</i> verbleibendem Tumorrest
RHT	regionale Hyperthermie
rpm	Rotationen pro Minute
S	Seite
SD	<i>stable disease</i> , im Verlauf der Therapie unveränderter Nachweis der Tumogröße
SSX	<i>synovial sarcoma, X breakpoint gene</i> , in Synovialsarkomen nachweisbares Fusionsgen
STS	<i>Soft tissue sarcoma</i> , Weichteilsarkom
T <sub>20</sub>	Temperatur, die unter Hyperthermie in 20% des Tumor(-bettes) mindestens erreicht wurden
T <sub>50</sub>	Temperatur, die unter Hyperthermie in 50% des Tumor(-bettes) mindestens erreicht wurden
T <sub>90</sub>	Temperatur, die unter Hyperthermie in 90% des Tumor(-bettes) mindestens erreicht wurden
TER	<i>thermal enhancement ratio</i> , Faktor für die Verstärkung der zytotoxischen Wirksamkeit des Zytostatikums unter hyperthermen Bedingungen
TGFβ	<i>transforming growth factor-β</i>
TID	<i>thermal isoeffect dose</i>
TKD	TKDNLLGRFELSG, 14-mer-Peptidderivat von Hsp70
T <sub>max</sub>	Maximaltemperatur
T <sub>min</sub>	Minimaltemperatur
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	Units
ULBP	<i>UL16-binding proteins</i>

## **8.2 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1	Prinzipien der Wirksamkeit der Hyperthermie in der Therapie von Tumorerkrankungen .....	20
Abbildung 1-2	BSD-2000-System .....	23
Abbildung 1-3	Sigma 60- und SigmaEye-Applikator.....	24
Abbildung 1-4	Spiral-Applikator .....	24
Abbildung 1-5	NK-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus der Zielzelle.....	32
Abbildung 1-6	Einfluss der Hyperthermie auf die NK-Zellaktivierung.....	34
Abbildung 3-1	ICE-Therapieschema.....	42
Abbildung 3-2	Auswahl des analysierten Patientenkollektivs .....	49
Abbildung 3-3	Details zu Vortherapien und applizierte ICE+RHT-Zyklen.....	52
Abbildung 3-4	Erreichte Durchschnittstemperatur im Hyperthermieareal bei intratumoraler und endoluminaler Messung .....	54
Abbildung 3-5	Temperaturverteilung intratumoral und endoluminal .....	55
Abbildung 3-6	Temperaturverteilung bei Patienten mit radiologischer Remission unter ICE+RHT und ohne radiologisches Ansprechen.....	55
Abbildung 3-7	Durchschnittliche verabreichte Chemotherapiedosis für die einzelnen Zyklen.....	57
Abbildung 3-8	Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben für alle untersuchten Patienten.....	61
Abbildung 3-9	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für nicht-metastasierte und metastasierte Patienten .....	62
Abbildung 3-10	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für Patienten mit G2- und G3-Tumoren.....	62
Abbildung 3-11	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für <i>nicht-metastasierte Patienten</i> mit G2- und G3-Tumoren.....	63
Abbildung 3-12	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für <i>metastasierte Patienten</i> mit G2- und G3-Tumoren .....	64
Abbildung 3-13	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	65
Abbildung 3-14	Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben für Patienten mit NOS-Sarkom im Vergleich zu Patienten mit anderer Histologie .....	66

---

Abbildung 3-15 Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT .....	67
Abbildung 3-16 Kaplan-Meier-Kurven zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Therapie mit ICE + RHT in <i>nicht metastasierten</i> Patienten .....	67
Abbildung 3-17 Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben für alle untersuchten Patienten.....	68
Abbildung 3-18 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte und metastasierte Patienten .....	69
Abbildung 3-19 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für Patienten mit G2- und G3-Tumoren .....	70
Abbildung 3-20 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für <i>nicht-metastasierte Patienten</i> mit G2- und G3-Tumoren.....	71
Abbildung 3-21 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für <i>metastasierte Patienten</i> mit G2- und G3-Tumoren.....	71
Abbildung 3-22 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp .....	72
Abbildung 3-23 Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreien Überleben für Patienten mit NOS-Sarkom im Vergleich zu Patienten mit anderer Histologie .....	73
Abbildung 3-24 Kaplan-Meier-Kurve zum lokal progressionsfreien Überleben für alle Patienten.....	74
Abbildung 3-25 Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte und metastasierte Patienten .....	75
Abbildung 3-26 Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben für Patienten mit G2- und G3-Tumoren .....	76
Abbildung 3-27 Kaplan-Meier-Kurven zum lokal progressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp .....	76
Abbildung 3-28 Kaplan-Meier-Kurve zum fernprogressionsfreien Überleben für alle Patienten.....	77
Abbildung 3-29 Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben für nicht-metastasierte und metastasierte Patienten .....	78
Abbildung 3-30 Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben für Patienten mit G2- und G3-Tumoren .....	79
Abbildung 3-31 Kaplan-Meier-Kurven zum fernprogressionsfreien Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp .....	80
Abbildung 4-1 Zeitpunkt der Blutentnahmen unter Therapie mit ICE + RHT .....	82
Abbildung 4-2 Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation .....	83

---

## Anhang

Abbildung 4-3 Prinzip des $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung-Assays .....	87
Abbildung 4-4 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Therapiestart im Vergleich zur Aktivität bei gesunden Spendern.....	97
Abbildung 4-5 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende und zur Aktivität bei gesunden Spendern.....	98
Abbildung 4-6 NK-Zell-Aktivität bei Patient 8 (Zweitlinienpatient) vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende .....	99
Abbildung 4-7 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart, vor Zyklus 2 und vor Zyklus 4 .....	100
Abbildung 4-8 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor (Durchschnittswert) und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	101
Abbildung 4-9 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender.....	102
Abbildung 4-10 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Therapiestart im Vergleich zur Stimulierbarkeit in später applizierten Zyklen.....	103
Abbildung 4-11 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit unterschiedlichen Stimulationsmedien .....	104
Abbildung 4-12 NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml + TKD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender.....	106
Abbildung 4-13 NK-Zell-Aktivität von Zweitlinienpatienten, Erstlinienpatienten und gesunden Spendern, jeweils unstimuliert und stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	107
Abbildung 4-14 Absolute Zellzahlen in % des Ausgangswertes im Verlauf der Therapie mit ICE + RHT .....	108

### **8.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1 Wahrscheinlich wirksame Therapieprotokolle in der Therapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen .....	16
Tabelle 1-2 Wahrscheinlich unwirksame Therapieprotokolle in der Zweitlinientherapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen .....	17
Tabelle 1-3 Nicht sicher zu beurteilende Therapieprotokolle in der Zweitlinientherapie von Anthrazyklin-refraktären Weichteilsarkomen .....	18
Tabelle 1-4 TERs verschiedener Zytostatika.....	22
Tabelle 3-1 Patientencharakteristika .....	51
Tabelle 3-2 Erreichte Durchschnittstemperatur im Hyperthermieareal bei intratumoraler und endoluminaler Messung .....	53
Tabelle 3-3 Nebenwirkungsprofil der Chemotherapie und resultierende Dosisreduktion.....	57
Tabelle 3-4 Tumoransprechen auf die Kombinationstherapie.....	58
Tabelle 3-5 Lokale Ansprechraten bei Patienten mit metastasierter Erkrankung vor Therapiestart im Vergleich zur Ansprechraten aller Tumorlokalisationen .....	60
Tabelle 3-6 Medianes Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	65
Tabelle 3-7 Medianes progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	72
Tabelle 3-8 Progressionsfreie Überlebensrate nach 3, 6 und 12 Monaten für alle Patienten und die Subgruppen mit metastasierter und nicht-metastasierter Erkrankung.....	74
Tabelle 3-9 Medianes lokal progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	77
Tabelle 3-10 Medianes fernprogressionsfreies Überleben in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	80
Tabelle 4-1 PBL-Kulturmedium .....	84
Tabelle 4-2 Einfriermedium .....	84
Tabelle 4-3 K562-Kultumedium .....	85
Tabelle 4-4 Charakteristika der untersuchten Zweitlinienpatienten.....	94
Tabelle 4-5 Charakteristika der untersuchten Erstlinienpatienten .....	96
Tabelle 4-6 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Therapiestart im Vergleich zur Aktivität bei gesunden Spendern.....	97

Tabelle 4-7 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende und zur Aktivität bei gesunden Spendern .....	98
Tabelle 4-8 NK-Zell-Aktivität bei Patient 8 (Zweitlinienpatient) vor Zyklusstart im Vergleich zur Aktivität nach Zyklusende .....	99
Tabelle 4-9 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor Zyklusstart, vor Zyklus 2 und vor Zyklus 4 .....	100
Tabelle 4-10 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml .....	101
Tabelle 4-11 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spendern.....	102
Tabelle 4-12 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml und TKD 2 µg/ml bei Therapiestart im Vergleich zur Stimulierbarkeit in später applizierten Zyklen.....	103
Tabelle 4-13 NK-Zell-Aktivität bei Zweitlinienpatienten nach Stimulation mit unterschiedlichen Stimulationsmedien .....	104
Tabelle 4-14 NK-Zell-Aktivität bei Erstlinienpatienten vor und nach Stimulation mit IL-2 1000 U/ml + TKD 2µg/ml im Vergleich zur unstimulierten Aktivität gesunder Spender.....	106
Tabelle 4-15 NK-Zell-Aktivität von Zweitlinienpatienten, Erstlinienpatienten und gesunden Spendern, jeweils unstimuliert und stimuliert (IL-2 1000 U/ml + TKD 2µg/ml).....	107

## 8.4 Patientenaufklärung

Klinikum der Universität München □ Medizinische Klinik und Poliklinik III □ Marchioninstr. 15 □  
81377 München

Ansprechpartner:  
Prof. Dr. R. Issels/PD Dr. L. Lindner

Telefon +49 (0)89 7095 – 4768  
Telefax +49 (0)89 7095 – 4776  
[rolf.issels@med.uni-muenchen.de](mailto:rolf.issels@med.uni-muenchen.de)

<http://med3.klinikum.uni-muenchen.de>

Postanschrift:  
Marchioninstr. 15  
D-81377 München

Ihr Zeichen:

Unser Zeichen:  
rdi-mcl

München,

### Aufklärung und Einverständniserklärung über biologische Begleituntersuchungen

Ich erkläre mit hiermit einverstanden, dass bei Gewebeentnahmen im Rahmen der Chemo- und Hyperthermiebehandlung dieses Gewebe im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen durch die Studienleitungen weiter verwandt werden darf.

Darüber hinaus bin ich einverstanden, dass zusätzlich zu den notwendigen Blutabnahmen Extra-Blut (20 – 40 ml) für die Untersuchung immunologischer und biochemischer Merkmale abgenommen wird. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass derartige Untersuchungen zum jetzigen Zeitpunkt des Wissenstandes keinen direkten Nutzen für meinen Krankheitsverlauf bringen und in erster Linie der wissenschaftlichen Kenntnisverbreitung dienen. Es ist mir zugesichert worden, dass bei der Veröffentlichung derartiger Forschungsergebnisse der Datenschutz in Bezug auf meine persönlichen Daten eingehalten wird.

Patient: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Arzt: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_



## 8.5 Danksagung

Allen, die am Gelingen dieser Arbeit Anteil hatten, gilt mein herzlicher Dank. Hier ist zu allererst Herr Professor Rolf Issels, mein Doktorvater, zu nennen, dem ich für die Möglichkeit danken möchte, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe erarbeiten zu können, begleitet von anhaltendem Interesse, vielen Anregungen und konstruktiver Kritik.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. Valeria Milani und Frau Dr. Christina Limmroth für ihre Betreuung bedanken, die mir trotz teilweise etwas widriger Umstände stets mit Rat und Tat zu Seite standen.

Herrn Professor Wolfgang Hiddemann, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III am Klinikum Großhadern, gilt mein Dank für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik verfassen zu können.

An der Entstehung dieser Arbeit hatten aber auch viele andere Personen Anteil, Einerseits die Mitstreiter im Labor, vor den Aktenschränken und hinter dem Computer, wie Claudia Mayerhofer, Susanne Wenk, Birgit Sirch, Daniel Neumann, Christian Paulmann, Sultan Abdel-Rahman, Anne Müller, Beatrice Stockheim, Martina Lahm und Nelli Dieterle, die mich auch bei komischen Fragen nicht komisch angesehen haben, und andererseits natürlich meine Familie und Freunde:

Meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, möchte ich danken für den unermüdlichen Fluss an guten Ratschlägen, Aufmunterungen und Aufmerksamkeit (und Geld, zumindest zeitweise) während der Erarbeitung dieser Dissertation. Daneben gilt mein Dank meinen Geschwistern, und hier insbesondere meiner Schwester für (teilweise recht nervige) Korrekturlesemaßnahmen und Durchhalteparolen (die nicht nervig waren).

Leuchtende Vorbilder für all die Dinge, die ich hätte besser machen können, waren Regina Dick und Veronica Marcos-Nickol, denen ich auf diesem Wege auch dafür danken möchte, dass sie immer erreichbar waren, wenn ich mal wieder nicht wusste, wie's weitergeht.

Außerdem waren an der Entstehung dieser Arbeit zumindest in indirekter Form Angela, Melanie, Simone, Frank und auch Lauri beteiligt, denen ich zu jeder möglichen und unmöglichen Zeit mein Leid klagen durfte. Vielen Dank dafür!

## **8.6            *Publikationen***

Milani V, Pazos M, Issels RD, Buecklein V, Rahman S, Tschoep K, Schaffer P, Wilkowski R, Duehmke E, Schaffer M. „Radiochemotherapy in combination with regional hyperthermia in preirradiated patients with recurrent rectal cancer“. *Strahlenther Onkol.* 2008 Mar;184(3):163-8