

Köln, 15.11.2016

KEWS

Betr.: Immunfunktion und spezifische T-Zellantwort im Elispot
vom 26.10.16 bei [REDACTED]
wohnhaft [REDACTED]

wir berichten Ihnen über das Befundergebnis der Immunfunktionsdiagnostik und Ihrer spezifischen T-Zellantwort auf lysierte und NDV-infizierte Tumorzellantigene, die wir aus der Blutprobe vom 26.10.16 im Elispotssystem ermittelt haben. Die Untersuchungen wurden für folgende Indikation durchgeführt:

Diagnosen:

vorbestehende Diagnosen:

Bösartige Neubildung des nicht näher bezeichneten Gehirns
Oligoastrozytom Grad II ED. 2006 (C71.9);
Rezidiv d. bösartige Neubildung des nicht näher bezeichneten Gehirns
Oligoastrozytom Grad II ED. 2008 (C71.9);
Bösartige Neubildung des nicht näher bezeichneten Gehirns
anaplastisches Astrozytom Ed. + Op. 2013 (C71.9);
Chemotherapie-Sitzung wegen bösartiger Neubildung 2013 (Z51.1);
Bösartige Neubildung des nicht näher bezeichneten Gehirns
Glioblastom WHO Grad IV ED. + Op. 11/13 (C71.9);
Kombinierte Strahlen- und Chemotherapiesitzung wegen bösartiger Neubildung 12/13 bis 03.02.14 (Z51.82);
Vorhandensein eines operativ implantierten vaskulären Katheterversweilsystems 02/14 (Z95.81);
Hirnfarkt durch Thrombose präzerebraler Arterien ED. 03/14 (I63.0);

Prof. Dr. Volker Schirmacher
Wissenschaftliche Leitung
Tumor-Immunologie

Prof. Dr. med. Stefaan Van Gool
Facharzt für pädiatrische Hämato-Onkologie
Immunologe

Medizinische Leitung
Translationale Onkologie
Dr. med. Akos-Sigmund Bihari
Facharzt für Allgemeinmedizin
Transfusionsverantwortlicher Arzt
pharm. sachkundige Person
Tätigkeitsschwerpunkte:
Immunologie / Integrative Onkologie

Dr. med. Peter Seng
Facharzt für Laboratoriumsmedizin,
Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Dr. med. Katharina Sprenger
Fachärztin für Allgemeinmedizin
Transfusionsbeauftragte Ärztin
pharm. sachkundige Person
Pharmakovigilanz

Dr. med. Karin Ehlert
Fachärztin für Allgemeinmedizin
Hämostaseologie

Dr. med. Tobias Sprenger
Facharzt für Allgemeinmedizin
Corresponding Author / Gutachtertätigkeit
Yadigar Genc
Arzt

Tätigkeitsschwerpunkte:
Integrative Onkologie

Dipl.-Biol. Gisela Feldmann
Leitung des GMP-Labors
pharm. Qualitäts- u. biologisch
Sicherheitsbeauftragte Person

Dr. Dirk Lorenzen
pharm. Qualitäts- und biologisch
Sicherheitsbeauftragte Person
pharm. sachkundige Person
Dr. Maria Lulei
Leitung der Abteilung
Immun-Monitoring

Praxis für Immunologie
Translationale Onkologie

Dr. Wilfried Stücker
Pharmazeutische Biologie
Heilpraktiker
Tätigkeitsschwerpunkte:
Immunologie / Translationale Onkologie

Geschäftsführung
IOZK GmbH, IOZK GmbH & Co. KG
IOZK Laboratorium GmbH, DELTA VIR GmbH

Anamnese und bisherige Therapie:

02/06	ED + Op. Oligoastrozytom Grad II;
10/08	ED. + Op. Oligoastrozytom Grad II –Rezidiv;
10/08 - 05/09	lokale Radiation (Seeds) 54Gy, Wundheilungsstörung; Knochentransplantat;
09/12	ED. + Op. Anaplastisches Astrozytom;
09/12 – 05/13	Chemotherapie mit Temodal nach Stupp-Schema;
11/13	ED- + Op. Glioblastom WHO Grad IV
12/13 - 03.02.14	Radiochemotherapie - Temodal mit CCMU (Lomustin) alle 6 Wochen.
02/14	Chemotherapie wurde nicht weiter geführt;
02/13	Pat. wurde auswärts mit intraarterieller NDV-Therapie behandelt
03/14	ED iatrogener Hirninfarkt durch Thrombose präzerebraler Arterien;
03/14	Portexplantation
04/14	Erhalt von autologem Tumorzellantigen von der Universität Würzburg zur Nutzung für eine autologe Vakzination
04/14	Erstvorstellung im IOZK und Beginn einer spezifischen Immuntherapie mit loko-regionaler Radiofrequenz-hyperthermie des Schädels und onkolytischer Virotherapie (NDV)
05/14	Therapiezyklus mit 1. autologer DC-Vakzine
06/14	Therapiezyklus mit 2. autologer DC-Vakzine
08/14	Therapiezyklus mit 3. autologer DC-Vakzine
12/14	MRT- Restaging: Befundbesserung mit nahezu vollständiger Rückbildung der KM- anreichernden Zone im Randbereich des OP-Gebietes, kein Hinweis auf Rezidiv
26.02.15	Monitoring der spezifischen T-Zellantwort im Elispot: gute tumorspezifische Memory T-Zellantwort
07/15	Zunahme der Halbseitensymptomatik links Absetzen der auswärtig verordneten DCA und GMCnaf Therapie
15.07.15	Monitoring der spezifischen T-Zellantwort im Elispot
21.07.15	MRT-Restaging: stable disease
11.08.15	Schädelprellung mit anschließender Verstärkung der Halbseiten- Symptomatik
13.-20.08.15	Therapiezyklus mit 4. autologer DC-Vakzine und loko-regionaler Radiofrequenzhyperthermie des Schädels in Verbindung mit onkolytischer Virotherapie (NDV)
seit 09/15	1x pro Monat loko-regionale Radiofrequenzhyperthermie des Schädels in Verbindung mit onkolytischer Virotherapie (NDV)
12/15	MRT-Restaging: stable disease
28.04.16	Monitoring der spezifischen T-Zellantwort im Elispot: stabile, sehr gute Memory T-Zellantwort auf autologes Tumorantigen
26.10.16	Verlaufskontrolle der Immunfunktion und Monitoring der spezifischen T-Zellantwort im Elispot: weiter verbesserte, sehr gute Memory T-Zellantwort auf alle getesteten Virus infizierte GBM-Zelllinien, auf autologes Tumorzellantigen wie bisher schwach nachweisbar

Ergebnisse:

1.

Nachweis der spezifischen Immunantwort im Elispot

Zum Nachweis einer Erfolg versprechenden, spezifischen Aktivierung Ihres Immunsystems konfrontierten wir in vitro Ihre T-Zellen sowie aus Monozyten generierte dendritische Zellen mit virusinfizierten Tumorzellen aus Tumorzelllinien und mit autologem Tumorzellantigen im Elispotsystem. Werden T-Zellen mit einem ihnen bekannten Antigen konfrontiert, dann exprimieren sie Gamma- Interferon. Diese Gamma- Interferon Ausschüttung der Gedächtnis – T- Zellen wird pro Zelle im Elispotsystem mit einem Spot angezeigt. (s. Abb.1)

Abb. 1A

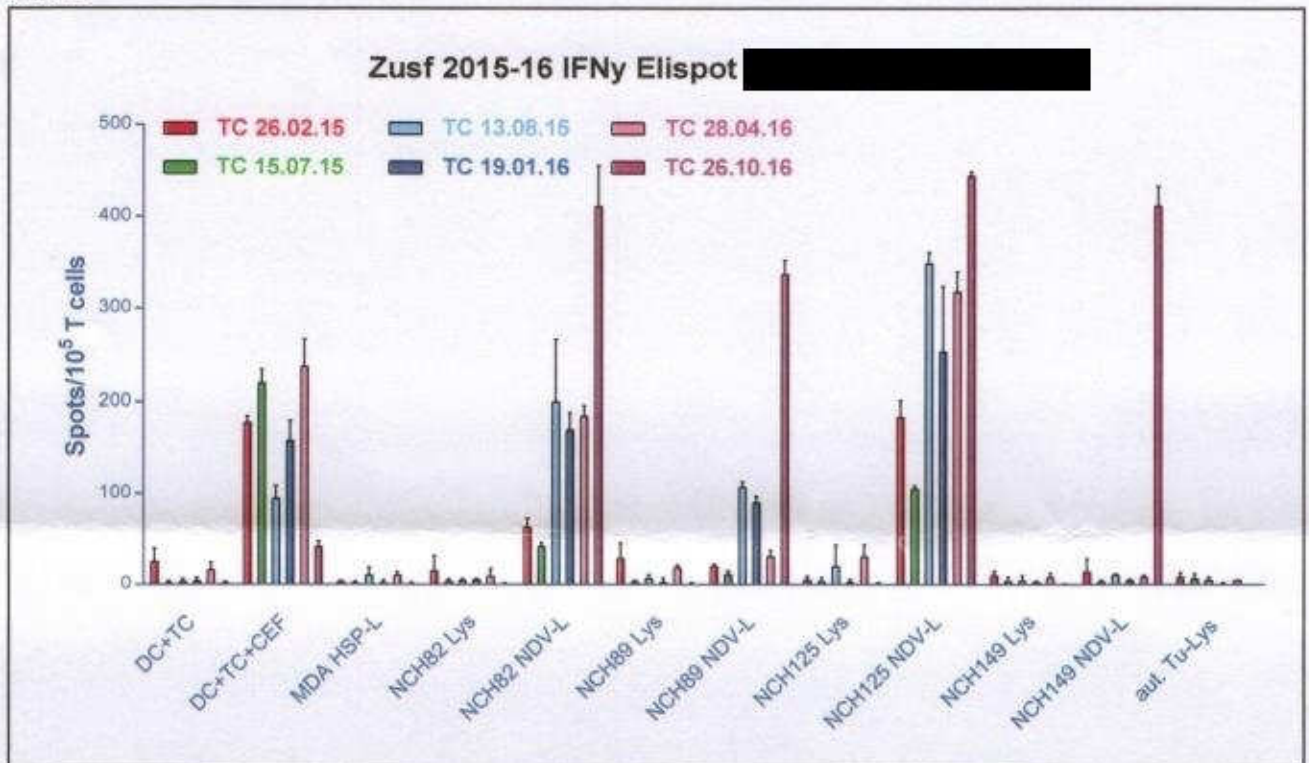
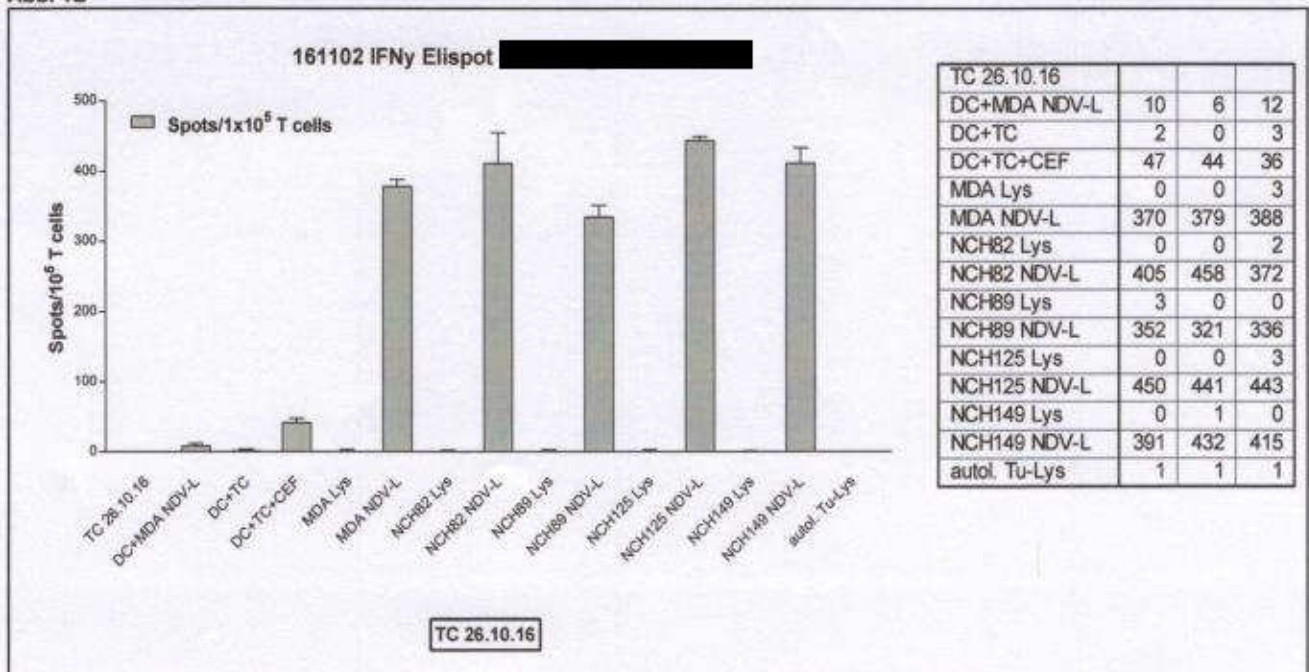


Abb. 1B



Legende zum Elispotttest vom 26.10.16:

Für den Elispotttest werden dendritische Zellen aus patienteneigenen Monozyten entwickelt und mit den autologen isolierten T- Zellen zusammengebracht, die dann gemessene gamma-Interferon Ausschüttung zeigt die Grundstimulation des Immunsystems an (s. 1. Balken DC+TC).

Im zweiten Test wird das immunologische Gedächtnis auf Zytomegalie-, Epstein-Barr- und Grippevirus (Recall-Antigene) als Referenzwert getestet. (s. 2. Balken DC+TC+CEF)

Der dritte Test ermittelt als Kontrolltest das immunologische Gedächtnis gegen Hitzeschockprotein versehene und lysierte Zellen aus einer Brustkrebszelllinie (s. 3. Balken MDA-HSP-L).

Der vierte bis elfte Test ermittelt das immunologische Gedächtnis gegen NDV- infizierte und lysierte Zellen aus vier verschiedenen Glioblastomzelllinien (s. 4. – 11. Balken MCH82, MCH89, MCH125 und MCH149).

Der letzte Test ermittelt das immunologische Gedächtnis gegen lysierte autologe Tumorzellen (s. 12. Balken aut. Tu-Lys).

2.

Das **Blutbild** und **Differentialblutbild** sind normwertig (s. Abb. 2).

Abb. 2

Kleines Blutbild					
Leukozyten	4,56	Tsd/ μ l	3,7 - 10,1		5,36
Erythrozyten	4,16	Mio/ μ l	4,0 - 5,7		4,37
HB	13,6	g/dl	12,6 - 17,4		14,0
HK	0,4	l/l	0,39 - 0,52		0,4
Thrombozyten	248	/nl	150 - 361		257
Differential Blutbild					
Neutrophile Granulozyten (relativ)	43,5	%	42 - 76		53,2
Lymphozyten (relativ)	39,0	%	18 - 45		36,2
Monozyten (relativ)	7,7	%	3 - 10		7,6
Eosinophile Granulozyten (relativ)	9,6	%	1 - 7		2,8
Basophile Granulozyten relativ	0,2	%	< 2		0,2

3.

Die Testung des **quantitativen Immunstatus** mit durchflusszytometrischer Lymphozytentypisierung zeigt –mit Ausnahme der erhöhten T-reg Zellen und der verminderten aktivierten T-Zellen- einen zufrieden stellenden Immunzellstatus (s. Abb. 3A u. 3B).

Abb. 3A

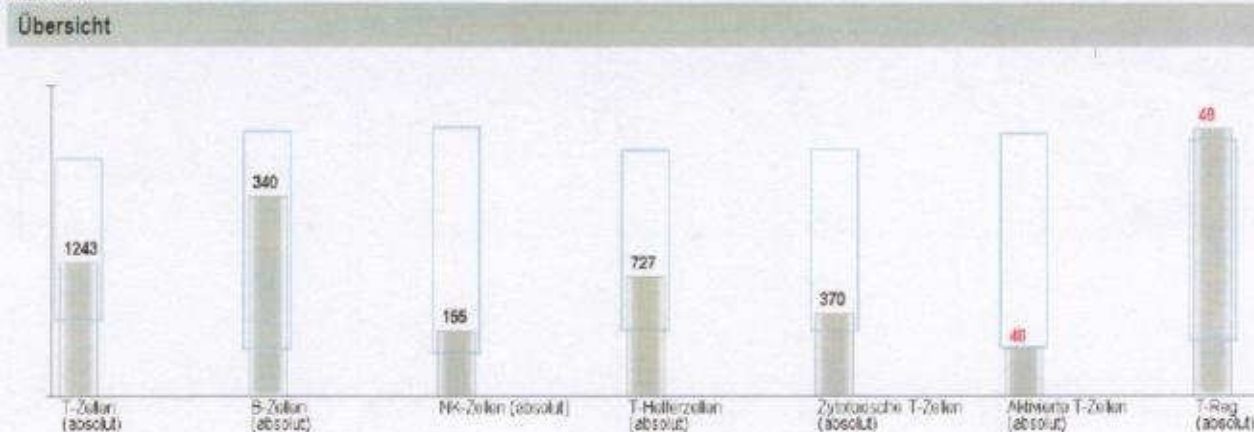
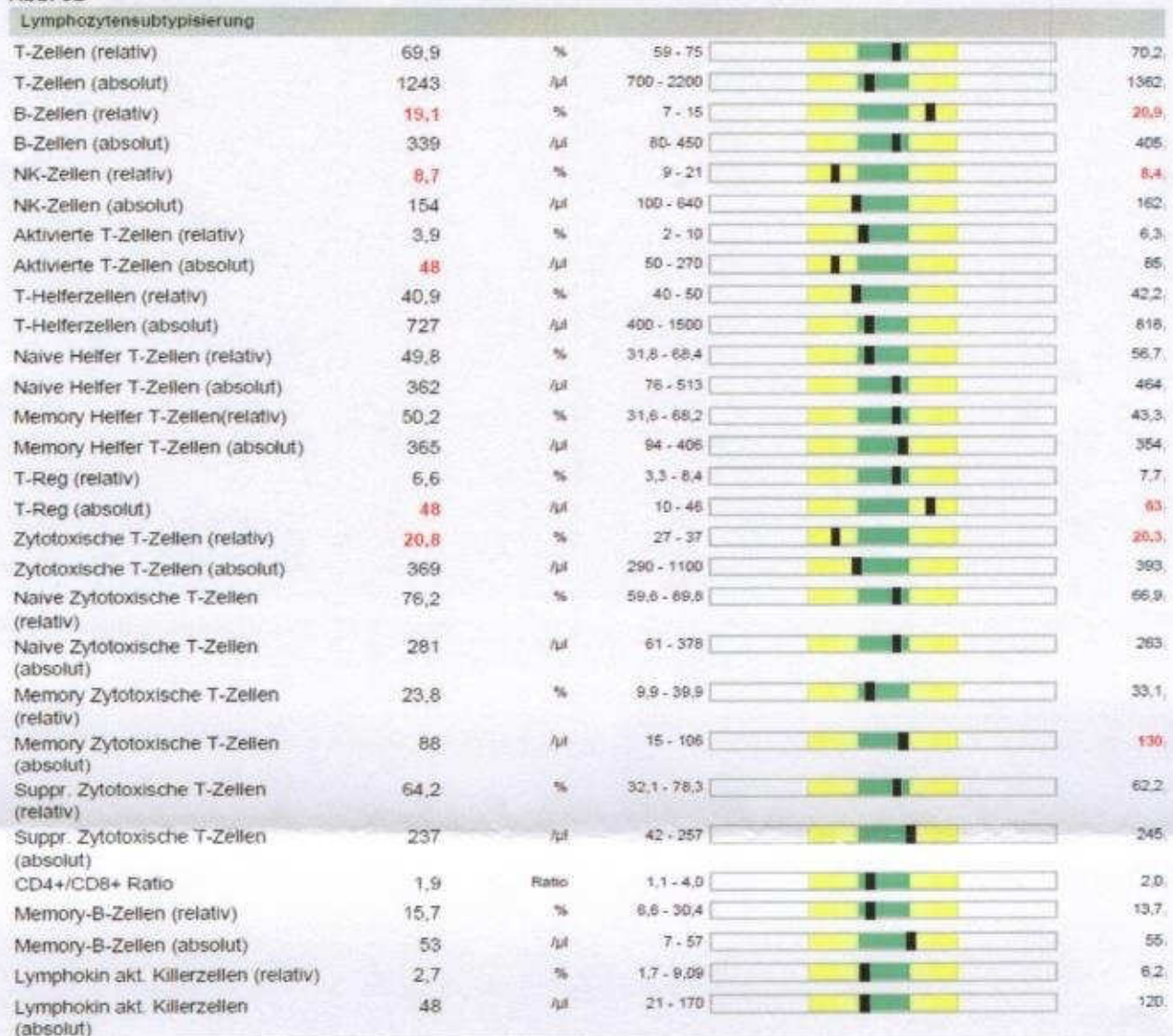


Abb. 3B



4.

Um die **qualitative Immunfunktion** zu ermitteln, wurde die zelluläre Zytokinausschüttung von Interleukin2 (TH1), Interleukin4 (TH2) und Gamma Interferon (TH1) getestet.

Das Verhältnis der genannten Zytokine zeigt die gewünschte zytotoxische TH1-Dominanz, die Funktion der natürlichen Killerzellen ist normwertig (s. Abb. 4).

Abb. 4

Intrazelluläre Zytokine	Normbereich	15.07.15	28.04.16	26.10.16
IL-2 (TH1)	25-51 % von CD4	49,0	43,0	48,7
IL-4 (TH2)	0,7-2,2 % von CD4	1,6	1,2	0,4(-)
Interferon gamma (TH1)	18-32 % von CD4	29,	24,0	24,4
Effektor: Target 1:1	4-10 %	7	3(-)	13(+)
Effektor: Target 5:1	15-30 %	25	14(-)	21
Effektor: Target 10:1	30-60 %	33	18(-)	33

5.

Der **Tumormarker S-100 Protein** ist wie bisher normwertig, aktuell < 20,0 pg/ml (Normbereich < 150).

6.

Aus dem peripheren Blut wurden Zellen isoliert um die Expression tumorrelevanter Gene quantitativ zu analysieren. Zum Tumorzellnachweis wurden vier verschiedene molekulare Marker (Telomerase, ERBB2, C-KIT, EGFR) eingesetzt, von denen einer (ERBB2) als Hinweis auf **zirkulierende Tumorzellen** in der untersuchten Blutprobe nachgewiesen wurde (s. Abb. 5).

Abb. 5

Zum Tumorzellnachweis wurden folgende molekulare Marker eingesetzt:	
Telomerase	Die Expression des Telomerase Gens kann in nahezu allen malignen Tumoren hochreguliert sein, nicht aber in Normalgewebe. Eine erhöhte Expression des Telomerase-Gens kann daher auf im Blut zirkulierende Tumorzellen hinweisen. neg: Es wurde keine Telomerase-Expression nachgewiesen.
ERBB2	Eine Überexpression von ERBB2 (HER2/NEU) ist in diversen Tumoren zu beobachten, u.a. bei Glioblastomen/Astrocytomen. Der Nachweis einer ERBB2-Überexpression kann also auf im Blut zirkulierende Tumorzellen hindeuten. pos: Es wurde ERBB2-Überexpression nachgewiesen.
C-KIT	C-KIT ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor der in Glioblastomen/Astrocytomen häufig überexprimiert ist. Der Nachweis einer C-KIT-Überexpression kann also auf zirkulierende Tumorzellen hinweisen. neg: Es wurde keine C-KIT-Überexpression nachgewiesen.
EGFR	Überexpression des Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) ist in Glioblastomen/Astrocytomen beschrieben. Der Nachweis einer EGFR-Expression in einer Blutprobe kann für die Anwesenheit von zirkulierenden Tumorzellen sprechen. neg: Eine EGFR-Expression wurde nicht nachgewiesen.

Vergleich der aktuellen Messwerte mit denen des Vorbefundes (s. Abb. 6):

Abb. 6

Gen-Expression	EGFR	ERBB2	C-KIT	Telomerase
28.10.2016	0	3,79	0,21	0
29.04.2016	0	1,21	0,22	0,3

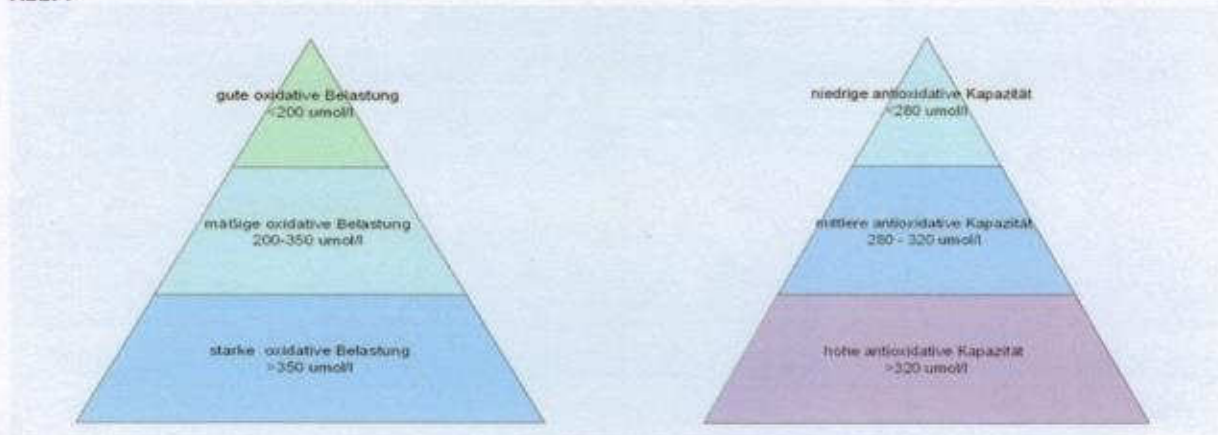
Werte über dem Grenzwert im **Fettdruck**, ceq = Zellequivalente

Im Vergleich zum Vorbefund ist die Expression ERBB2 gestiegen und liegt nun über dem Grenzwert (>2,0). Während im Vorbefund keine Tumorzellen nachweisbar waren, weist aktuell der erhöhte Expressionswert des Markers ERBB2 auf zirkulierende Tumorzellen im Blut hin. Somit ergeben sich Hinweise auf einen Anstieg der Tumorzelllast im Blut.

7.

Bei der Bestimmung des **oxidativen Status** zur Überprüfung der Fähigkeit des Blutplasmas, freie Radikale abzubauen bzw. unschädlich zu machen wurde eine **geringe oxidative Belastung** (42,0 µmol/l) und eine **hohe antioxidative Kapazität** (358,0 µmol/l) des Plasmas gemessen.

Abb. 7



8.

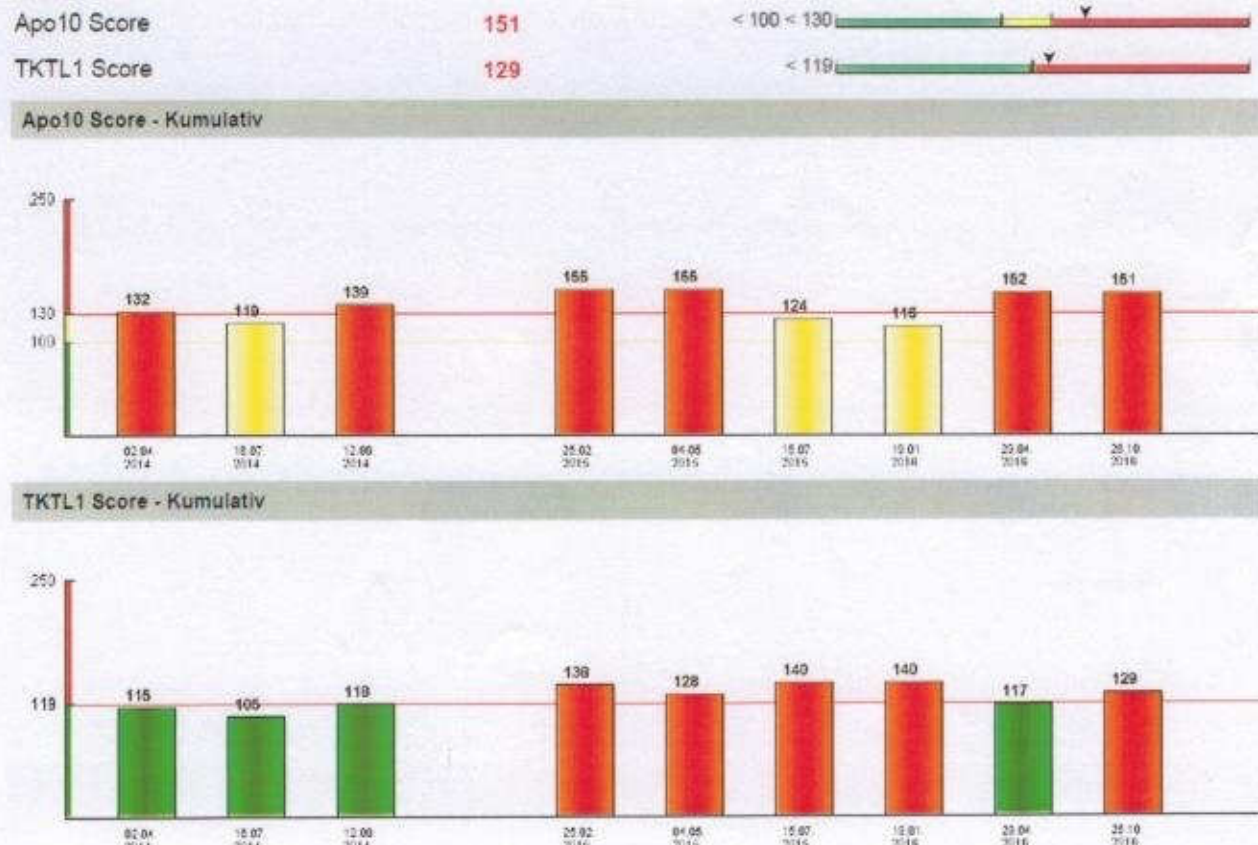
In den untersuchten Monozyten / Makrophagen wurde mit **151** ein über dem Grenzbereich liegendes **Apo 10** gefunden (normal < 100, Graubereich < 130). Ein erhöhter Wert weist auf das Vorhandensein von Zellen hin, die den normalen programmierten Zelltod abgeschaltet haben, wie es bei den meisten Tumorzellen der Fall ist.

Der EDIM **TKTL1-Bluttest** zeigt mit einem **Score 129** eine über dem Normbereich (< 119) liegende TKTL1-Konzentration (s. Abb. 8).

Der TKTL1-Bluttest untersucht die von Makrophagen aufgenommenen Tumorfragmente hinsichtlich der Präsenz des TKTL1-Proteins, das als Indikator dient für den Vergärungsstoffwechsel in Tumorzellen.

Ein erhöhter TKTL1- Score ist ein Hinweis auf eine TKTL1-bedingte Chemotherapieresistenz. Sie haben einen Vorteil, wenn Sie bei der Ernährung die leicht verdaulichen Kohlenhydrate verringern.

Abb. 8



9.

Die folgenden immunologisch relevanten Mikronährstoffe und Vitamine wurden bestimmt.

Mikronährstoffe intrazellulär:

Kalium mit 34,3 mmol/l vermindert	Normbereich: (43,5-48,7)
Magnesium mit 1,47 mmol/l vermindert	(2,25-2,80)
Calcium mit 1,64 mmol/l erhöht	(1,12-1,58)
Zink mit 5,43 mg/l normwertig	(4,0-7,5)
Kupfer mit 6,35 µmol/l vermindert	(12,8-25,8)
Selen mit 114,6 µg/l normwertig	(73-169)

Vitamine:

1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 mit 86,5 pg/ml	(18,0-111,2)
25-OH-Vitamin D3 mit 51,2 ng/ml normwertig	(>30,0)
Vitamin E mit 11,7 µg/ml normwertig	(5-18)
Vitamin C mit 13,9 µg/ml normwertig	(4,6-14,9)
Vitamin B12 mit 301,7 pg/ml normwertig	(197,0-771,0)
Methylmalonsäure mit 18,3 µg/l normwertig	(9-32),

es besteht somit kein Hinweis auf einen metabolischen Vitamin B12-Mangel.

Die Aminosäure Homocystein wurde mit 16,0 µmol/l bestimmt (Normbereich 5,0-15,0), es besteht somit eine moderate Erhöhung von Homocystein.

10.

Die **endokrinologische Diagnostik** zeigt eine normale Schilddrüsenfunktion.

11.

Die **Infektionsserologie**, die im Rahmen der gesetzlichen Bestimmungen (Arzneimittel-/Gewebe-gesetz) zu individuellen Therapieformen (AMG §13 und §4b, Sondervorschriften für Arzneimittel für neuartige Therapien) durchgeführt wurde, zeigte negative Befunde für Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, Lues, HBV, HCV und HIV. Für Chlamydia pneumoniae ergab sich ein Befund wie nach zurückliegender Infektion.

12.

Die **Basisdiagnostik** zeigte normwertige Befunde für Eisen- und Glukosestoffwechsel sowie Nieren- und Leberfunktion, auch die Immunglobulinproduktion (Nachweis von Albumin und Globulinen in der Eiweißelektrophorese) war normwertig. Zum Untersuchungszeitpunkt bestand kein laborchemischer Hinweis auf eine Entzündungsreaktion.

Befundinterpretation und Therapieempfehlung:

Die Elispotttestung vom 26.10.16 zeigt im Vergleich zum Vorbefund vom 28.04.16 eine weiter verbesserte, sehr gute spezifische Memory T-Zellantwort auf NDV-infiziertes und lysiertes allogenies Tumorzellantigen, die spezifische T-Zellantwort auf autologes Tumorzellantigen ist wie in den Vorbefunden gering nachweisbar (s. Abb. 1).

In der Zusammenschau der übrigen Befunde sehen wir zufrieden stellende Immunzellzahlen (s. Abb. 3A und 3B) und eine gute Funktion des adaptiven Immunsystems (zytotoxische T-Zellfunktion, TH1-Dominanz) und des angeborenen Immunsystems (gute Funktion der natürlichen Killerzellen, s. Abb. 4). Der Tumormarker S-100 Protein ist wie bisher normwertig (s. Pkt. 5).

Der Test auf zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut war positiv mit Nachweis von einem der vier getesteten Marker (s. Abb. 5) und Hinweis auf einen Anstieg der Tumorzelllast (s. Abb. 6). Bei diesem Test sehen wir häufig einen fluktuierenden Verlauf, was bei sonst stabilen tumorrelevanten Markern nicht mit einer Tumoraktivierung gleichzusetzen ist.

Der Marker Apo10 –Apoptosemarker für Zellen mit gestörtem programmierten Zelltod- ist unverändert zum Vorbefund, TKTL1 –der Marker für den Vergärungsstoffwechsel in Tumorzellen- ist leicht gestiegen und moderat erhöht (s. Abb. 8).

Wir empfehlen bis zur nächsten Verlaufskontrolle die Substitution und Antiinflammationsprophylaxe in unten genannter Dosierung fortzusetzen:

Magium K forte	2-0-2
Selen 300µg	2-0-0
Dekristol 20.000 I.E.	1x alle 14 Tage
Curcumin-Loges	2-0-2
Metformin	1-0-1
Boscari 400mg	3-3-3

Insgesamt sehen wir weiterhin ein sehr gutes immunologisches Ansprechen auf die durchgeführte Therapie.

Zur Aufrechterhaltung der genannten Immunzellfunktionen empfehlen wir die Fortsetzung einer loko-regionalen Radiofrequenz-Hyperthermie in Kombination mit onkolytischer Virotherapie (NDV) etwa einmal pro Monat und eine Verlaufskontrolle der Immunfunktion und Elispotdiagnostik im Abstand von 6 Monaten (nächste im April 2017).

Bei Rückfragen und zur Terminvereinbarung setzen Sie sich bitte mit unserem Sekretariat in Verbindung unter der Telefon-Nr. 0221 – 420 399 25.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. St. Van Gool

Dr. med. A. S. Bihari

Dr. med. P. N. Seng

Dr. med. T. Sprenger

Dr. med. K. Ehlert

Dr. med. K. Sprenger

Yadigar Genc
Arzt

Prof. Dr. V. Schirmmacher*
*wissenschaftliche Beratung

Dr. Wilfried Stücker*