

Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie
der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde
des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Direktor: Herr Prof. Dr. Schneppenheim

**Asparagindepletion und Asparaginase-Aktivität nach 2500 IE/m²
PEG-Asparaginase bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie
im Rahmen des pädiatrischen Therapieprotokolls COALL-06-97**

Promotion

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kirsten Wenner

aus München

Hamburg 2006

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 6 |
| 1.1 | Akute lymphatische Leukämie | 8 |
| 1.2 | Therapie der akuten lymphatischen Leukämie | 10 |
| 1.2.1 | Therapieprotokolle | 11 |
| 1.2.2 | Therapieprotokoll COALL-06-97 | 11 |
| 2 | L-ASPARAGINASE | 14 |
| 2.1 | Allgemeine Charakterisierung der Substanz | 14 |
| 2.2 | Geschichte der Asparaginase | 16 |
| 2.3 | Wirkmechanismus | 18 |
| 2.4 | Eigenschaften therapeutischer Asparaginasen | 20 |
| 2.5 | PEG-Asparaginase | 21 |
| 2.6 | Pharmakologie und Toxikologie | 23 |
| 2.7 | Nebenwirkungen der Asparaginase | 25 |
| 2.7.1 | Immunologische Nebenwirkungen | 25 |
| 2.7.2 | Nebenwirkungen aufgrund der Proteinbiosynthese | 26 |
| 2.8 | Asparaginasepräparate auf dem deutschen Arzneimittelmarkt | 27 |
| 2.9 | Klinische Bedeutung der Asparaginase | 29 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN..... | 30 |
| 3.1 | Zielsetzung | 30 |
| 3.2 | Patienten - Auswahlkriterien | 31 |
| 3.3 | Probengewinnung | 31 |
| 3.3.1 | Zeitpunkt der Probenentnahmen | 31 |
| 3.3.2 | Behandlung der Proben | 32 |
| 3.4 | Quantitative Bestimmung der Aminosäuren mittels HPLC (Ionenaustauschchromatographie) | 33 |
| 3.4.1 | Allgemeine Technik der Ionenaustauschchromatographie | 33 |
| 3.4.2 | Angewandte Methode zur quantitativen Aminosäurenanalyse | 37 |
| 3.4.3 | Derivatisierung und Detektion der Aminosäuren mit OPA (Ortho- Phthaldialdehyd) | 37 |
| 3.4.4 | Fluorometrische Bestimmung der Aminosäuren | 39 |
| 3.4.5 | Puffersystem und Pufferzusammensetzung | 39 |
| 3.5 | Erstellung einer Methode zur Evaluierung der Asparagindepletion ex- vivo in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit | 44 |
| 3.5.1 | Herstellung eines Standard-Serums | 45 |
| 3.5.2 | Herstellung eines mit PEG-Asparaginase angereicherten Serums | 45 |
| 3.6 | Photometrische Bestimmung der Asparaginase-Aktivität im Serum | 45 |
| 3.7 | Quantitative Bestimmung von Asparagin im Liquor mittels RP-HPLC (Labor Prof. Boos, Münster) | 46 |
| 4 | ERGEBNISSE | 48 |
| 4.1 | Asparaginkonzentration unter PEG-Asparaginase unterschiedlicher Verdünnung in Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationszeit | 48 |
| 4.2 | Patientenkollektiv | 52 |
| 4.3 | Asparaginkonzentration im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 52 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4 | Asparaginkonzentration im Liquor nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 55 |
| 4.5 | Asparaginase-Aktivität nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 60 |
| 4.6 | Asparaginkonzentration im Liquor in Relation zu Asparaginase-Aktivität nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase | 64 |
| 4.7 | Asparaginkonzentration im Serum nach 45 000 IE/m ² E. Coli-Asparaginase i.v. in dem COALL-Protokoll-05-92 | 66 |
| 4.8 | Vergleich von 45 000 IE/m ² nativer E. Coli Asparaginase i.v. mit 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. in den COALL-Protokollen 92 und 97 | 67 |
| 5 | DISKUSSION | 69 |
| 5.1 | Diskussion der Methode | 69 |
| 5.1.1 | Patienten und Auswahlkriterien | 69 |
| 5.1.2 | Aufarbeitung der Proben | 70 |
| 5.1.3 | Quantitative Aminosäurenbestimmung | 70 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse | 72 |
| 5.2.1 | Asparagin im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase COALL-Protokoll- 97 | 73 |
| 5.2.2 | Asparagin im Liquor nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase COALL-Protokoll- 97 | 76 |
| 5.2.3 | Asparaginase-Aktivität im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase /COALL-Protokoll 97 | 82 |
| 5.2.4 | Vergleich von 45 000 IE/m ² nativer E. Coli Asparaginase i.v. mit 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. in den COALL-Protokollen 89/92 und 97 | 83 |
| 5.2.5 | Ökonomische Aspekte des Vergleichs zwischen 2500 IE/m ² PEG-ASNase gegenüber 45 000 IE/m ² E. coli-ASNase | 84 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 87 |
| 7 | ANHANG | 90 |
| 8 | LITERATUR | 107 |
| 8.1 | Allgemeine Literatur | 107 |
| 8.2 | Spezielle Literatur | 107 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Relative Häufigkeit der malignen Erkrankungen im Kindesalter | 6 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung des COALL Protokolls-06-97 | 12 |
| Abb. 3: 3D-Darstellung der E.coli Asparaginase | 15 |
| Abb. 4: Wirkmechanismus der L-Asparaginase | 19 |
| Abb. 5: schematisches Darstellung der PEG-Asparaginase. | 21 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung des Ionenaustausches an einer Kunstharzmatrix mit sulfonierten Gruppen | 34 |
| Abb. 7: Schematische Darstellung eines Aminosäureanalyzers | 36 |
| Abb. 8: Darstellung der Reaktion von OPA (ortho-phthaldialdehyd) mit Aminosäuren | 38 |
| Abb. 9: Abhängigkeit von Temperatur und pH im Verlauf der Aminosäurenmessung am Biochrom 20 | 42 |
| Abb. 10: Darstellung der Aminosäurenanalyse eines Testgemisches (Asn vorhanden) | 43 |
| Abb. 11: Darstellung der Aminosäurenanalyse eines Patienten nach Gabe von 2500 IE/m ² PEG-ASNase (Depletion von Asn) | 43 |
| Abb. 12: Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei Serumproben mit Asparaginase unterschiedlicher Konzentration (1500 IE/l bis 0,00015 IE/l) | 51 |
| Abb. 13: Asparaginkonzentration im Serum. | 53 |
| Abb. 14: Verlauf der Asn-Konzentration im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 54 |
| Abb. 15: Prozentsatz der Patienten mit einer Asn-Depletion im Serum | 55 |
| Abb. 16: Verlauf der Asn-Konzentration im Liquor nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 56 |
| Abb. 17: Prozentsatz der Patienten mit einer Asn-Depletion im Liquor | 57 |
| Abb. 18: Prozentsatz der Patienten mit einer Asparagindepletion im Serum und Liquor nach 2500 IE/m ² PEG-ASNase. | 58 |
| Abb. 19: Mediane Liquorkonzentration von Asn im Liquor nach 2500 IE/m ² PEG-ASNase | 59 |
| Abb. 20: Asparaginkonzentrationen im Liquor in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 60 |
| Abb. 21: Mediane Asparaginase-Aktivität im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-ASNase i.v. | 61 |
| Abb. 22: Asparaginase Aktivität im Serum nach 2500 IE/m ² PEG-ASNase | 62 |
| Abb. 23: Prozentsatz der Patienten mit einer Asparaginase-Aktivität >100 IE/l nach 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. | 63 |
| Abb. 24: Asparaginkonzentration im Liquor in Relation zu Asn- Aktivität im Serum | 64 |
| Abb. 25: Asparagindepletion unter C-Asparaginase und PEG-Asparaginase. | 67 |
| Abb. 26: Darstellung der Flüssigkeitskompartimente des Liquor- und Bluthirnschrankensystems und Transportwege. | 77 |
| Abb. 27: Liste der COALL-assoziierten Kliniken | 90 |
| Abb. 28: Einwilligung der Eltern 1 | 91 |
| Abb. 29: Einwilligung der Eltern 2 | 92 |
| Abb. 30: COALL-06-97 LR-Standard | 93 |
| Abb. 31: COALL-06-97 LR-Standard Reinduktion | 94 |
| Abb. 32: COALL-06-97 LR-Reduziert | 95 |
| Abb. 33: COALL-06-97 LR-Reduziert Reinduktion | 96 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 34: COALL-06-97 HR-Standard/LR-Intensiviert | 97 |
| Abb. 35: COALL-06-97 HR-Standard/LR-Intensiviert Reinduktion | 98 |
| Abb. 36: COALL-06-97 HR-Reduziert | 99 |
| Abb. 37: COALL-06-97 HR-Reduziert Reinduktion | 100 |
| Abb. 38: Probenbegleitbogen Asn Serum/Liquor I | 101 |
| Abb. 39: Probenbegleitbogen Asn Serum/Liquor II | 102 |
| Abb. 40: COALL-07-03 LR-Standard | 103 |
| Abb. 41: COALL-07-03 LR-Standard Reinduktion | 104 |
| Abb. 42: COALL-07-03 HR-Standard/LR-Intensiviert | 105 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Therapeutische Asparaginasen | 20 |
| Tab. 2: Klinisch angewandte Asparaginasen auf dem deutschen Arzneimittelmarkt | 28 |
| Tab. 3: Pufferzusammensetzung | 41 |
| Tab. 4: Darstellung des Messvorgangs in einzelnen Schritten | 42 |
| Tab. 5: Testseren unterschiedlicher PEG-ASNase-Konzentration | 44 |
| Tab. 6: Asn-Konzentration bei Raumtemperatur / keine Inkubationszeit | 48 |
| Tab. 7: Asn-Konzentration bei Raumtemperatur / 120 min Inkubationszeit | 49 |
| Tab. 8: Asn-Konzentration bei 37°C / 90 min Inkubationszeit | 50 |
| Tab. 9: Asn-Konzentration bei 37°C / 150 min Inkubationszeit | 51 |
| Tab. 10: Asparaginkonzentration im Liquor in Bezug zur ASNase-Aktivität. | 65 |
| Tab. 11: Asparagin im Serum nach 45 000 IE/m ² i.v. E.coli-ASNase (COALL- 92) verglichen mit 2500 IE/m ² PEG-Asparaginase i.v. (COALL-97). | 68 |
| Tab. 12: Therapiekosten für Asparaginasetherapie im LR-Protokoll COALL-97 | 86 |
| Tab. 13: Therapiekosten für Asparaginasetherapie im HR-Protokoll COALL-97 | 86 |

1 Einleitung

In entwickelten Ländern stellen maligne Erkrankungen nach Unfällen die zweithäufigste Todesursache im Kindesalter dar.

Jährlich erkranken 13 von 100 000 Kindern unter 15 Jahren an einem Tumor oder einer malignen Erkrankung, wobei die Inzidenz in den verschiedenen Altersgruppen abhängig von dem jeweiligen Tumortyp unterschiedlich ist (*Abb.1*).

Leukämien sind mit 34,5% die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter.

80% der Leukämien sind akute lymphoblastische Leukämien (ALL), 15% akute myeloische Leukämien (AML) und ca. 2% sind chronisch myeloische Leukämien (CML) (*Graf 1995*).

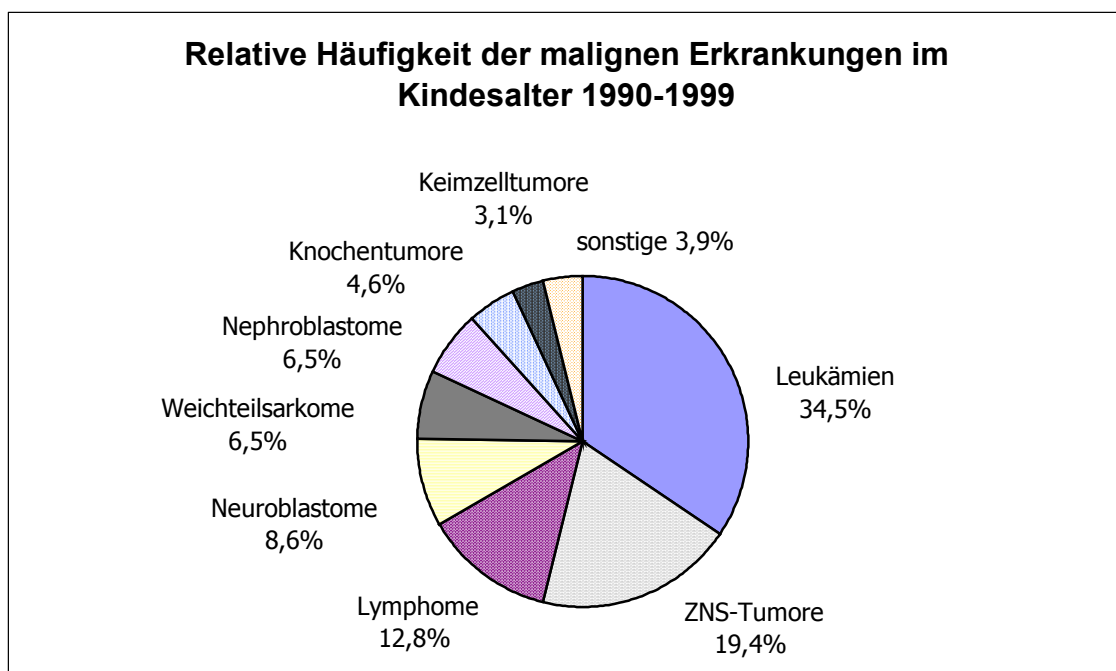


Abb. 1: Relative Häufigkeit der malignen Erkrankungen im Kindesalter

Quelle: Michaelis J, Kaatsch P, Spix C (2000) Jahresbericht 1999 des Deutschen Kinder-Krebsregister

Die gegenwärtige Therapie der ALL basiert auf einer Polychemotherapie, deren Ziel es ist, durch eine Kombination verschiedener Zytostatika den maligne transformierten Zellklon vollständig zu entfernen und eine Restitution der normalen Hämatopoese zu erreichen.

L-Asparaginase, ein Enzym des Aminosäurestoffwechsels, findet seit Jahren als fester Bestandteil dieser Polychemotherapien Anwendung in der Behandlung lymphatischer Leukämien. Es hydrolysiert Asparagin (Asn) zu Aspartat unter der Bildung von Ammoniak. Bisher nahm man an, dass den Leukämiezellen im Gegensatz zu gesunden Körperzellen das Enzym für die eigene Herstellung von Asparagin aus Aspartat fehlt. Und deswegen Asn für sie in diesem Falle eine essentielle Aminosäure darstellt. Eine Depletion von Asn im Blut würde somit bei Leukämiezellen zur Unterbrechung der Proteinbiosynthese und schließlich zum Zelltod führen. Neuere Forschungen an Leukämiezellen mit einem äußerst guten Ansprechen auf Asparaginasetherapie geben jedoch Anlass zu der Annahme, dass dieses Postulat nicht mehr stimmt und dass wahrscheinlich andere Apoptosewege, die durch die Asparaginase induziert werden, für den Zelltod verantwortlich sind.

Das hauptsächlich aus *Escherichia coli* Bakterien hergestellte Enzym führt als Fremdeiweiß häufig zu allergischen Reaktionen, die therapielimitierend sind. Eine an Polyethylen gekoppelte L-Asparaginase, die PEG-Asparaginase, weist gegenüber der nativen Form eine verlängerte Halbwertszeit auf, was in einer Dosisreduktion resultiert. Zusätzlich werden durch die chemische Modifikation allergene Epitope der Coli-Asparaginase maskiert. Dies ermöglicht den Einsatz von PEG bei therapielimitierenden allergischen Reaktionen auf native C-ASNase und gewährleistet somit häufig die Therapiefortführung.

Seit 1. April 1997 ist das Präparat auf dem deutschen Arzneimittelmarkt bei Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit auf native L-Asparaginasen zugelassen.

Diverse Studien konnten die vergleichbare Wirksamkeit von PEG-ASNase gegenüber normaler C-ASNase nachweisen (*Kurtzberg et al. 1988, Kurtzberg et al. 1990, Ettinger et al. 1995, Abshire et al. 1995, Patel et al. 1996*). Die hierbei angewandten Dosierungen liegen zwischen 1000-2500 IE/m² KOF i.m. oder i.v. (*Patel et al. 1996*).

Die überwiegende Mehrzahl der Studien wurden jedoch an Rezidiv-Patienten in der Reinduktion mit einer intramuskulären Applikation, wie sie in den USA favorisiert wird, vorgenommen. Weitere klinische Studien sind notwendig, um die Wirksamkeit nach intravenöser Applikation, die in Deutschland üblich ist, zu beurteilen und eine Dosisoptimierung erzielen zu können.

Die BFM-Gruppe konnte in einem Drug Monitoring von PEG-Asparaginase in einer Dosierung von 500 IE/m² und 1000 IE/m² i.v. zeigen, dass mit PEG-ASNase eine vergleichbar lange Depletion und somit eine vergleichbare Wirksamkeit erzielt werden kann, wie mit 10 000 IE/m² der nativen Asparaginase (*Müller et al. 2002, Vieira Pinheiro et al. 2001*).

Diese Ergebnisse zeigten jedoch auch inter-individuelle Schwankungen der Asparaginase-Aktivität. Bei 4 von 20 Patienten, die repetitive Gaben von C-ASNase oder Erwinase erhalten hatten, konnte ein rascher Abfall der Asparaginase-Aktivität nach Gabe von 500 IE/m² PEG-ASNase ohne klinische Zeichen einer allergischen Reaktion festgestellt werden. Als Ursache für den raschen Aktivitätsverlust vermutete man die Bildung von Antikörpern.

1.1 Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie ist eine hochmaligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems, die gehäuft im Kindesalter auftritt und unbehandelt schnell zum Tode führt. Die Erkrankung tritt mit einer Inzidenz von 3,5/100 000 unter 15jährigen auf. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt im Kleinkindesalter zwischen 2 und 5 Jahren (*Schrappé & Riehm 1997*).

Die Ätiologie der Erkrankung ist noch weitgehend unbekannt. Spontane somatische Mutationen sind als wahrscheinlichste Ursache bei der Mehrzahl der Fälle anzunehmen (*Greaves 1986, Greaves et Chan 1986, Williams et al. 1984, Pui et al. 1989*). Bestimmte Chromosomenanomalien gehen jedoch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher. Kinder mit einem Down-Syndrom weisen ein 15fach erhöhtes Erkrankungsrisiko auf (*Miller 1970*). Des Weiteren wird eine erhöhte Inzidenz von ALL bei Klinefelter-Syndrom, Fanconi-Anämie, Ataxia teleangiectatica oder Bloom's Syndrom beschrieben (*Sawitsky et al. 1966, Sasaki et al. 1973, Gotoff et al. 1967, Miller 1968*). Untersuchungen unter den

Überlebenden des Atombombenangriffs auf Hiroshima belegen eindeutig die erhöhte Inzidenz von Leukämien nach Strahlenexposition (*Bizzozzero et al. 1966, Folley et al. 1952, Brill et al. 1962*).

Chronische Exposition gegenüber Benzenen führt bei Erwachsenen zum Auftreten von AML, ein Zusammenhang zur ALL im Kindesalter zeigte sich nicht (*Aksoy et al. 1976, Vigliani & Sarta 1964*). Es konnte jedoch belegt werden, dass der Gebrauch von Alkylantien in der Chemotherapie von Leukämien selbst leukämoides Potential in sich birgt. Die meisten dieser durch Chemotherapien induzierten Leukämien waren AML (*Tucker et al. 1987*).

Ausgehend von einem maligne entarteten lymphoblastischen Zellklon kommt es zur Proliferation und Verdrängung des Knochenmarks mit nachfolgender hämatopoetischer Insuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie, wobei nicht immer alle drei Zellreihen gleichzeitig betroffen sein müssen.

Häufige klinische Symptome sind Fieber unklarer Genese, Gelenk- und Skelettschmerzen, erhöhte Blutungsneigung und gehäufte Infektanfälligkeit sowie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit.

Die Diagnose wird primär durch die zytologische Untersuchung des Knochenmarks oder des peripheren Blutes gestellt und gilt als gesichert, wenn > 25% der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks Lymphoblasten sind oder unreife Lymphoblasten im peripheren Blut nachweisbar sind.

Die morphologische Einteilung erfolgt nach der *French-American-British (FAB)-Klassifikation* in 3 Gruppen (L1-L3) (*Bennet et al. 1976*). Dies ist auch prognostisch von Bedeutung (*Miller et al. 1981, Lilleyman et al. 1986*). Mit Hilfe von Oberflächenmarkern und zytoplasmatischen Markern lassen sich immunologisch unterschiedliche Typen differenzieren, was sowohl prognostische als auch therapeutische Konsequenzen hat.

Der Nachweis bestimmter Aberrationen und Translokationen, wie z. B. des Philadelphia-Chromosoms t(9/22) lässt sich mit Hilfe molekularbiologischer und zytogenetischer Untersuchungen feststellen und hat ebenfalls eine große Bedeutung für die Prognose und Stratifizierung innerhalb der Therapieschemata (*Yunis et al. 1986*).

1.2 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Die Therapie der ALL basiert auf einer intensiven Polychemotherapie. Diese lässt sich in 3 Phasen gliedern: Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie. Ziel ist es, durch eine Kombination verschiedener antineoplastisch wirksamer Medikamente eine komplette Remission des Knochenmarkes zu erreichen, d.h. den maligne entarteten Zellklon aus dem Knochenmark zu entfernen und eine normale Hämatopoese wieder herzustellen.

Die Intensität der Therapie wird nach Risikofaktoren stratifiziert. Bisher gibt es kein universell anerkanntes Stratifizierungsmodell. Zu den häufigsten Kriterien zählen u.a. die periphere Leukozytenzahl bei Diagnosestellung und das Alter des Patienten.

Ziel der Induktionstherapie ist eine komplette Remission der leukämischen Zellmasse, d.h. <5% Blasten im Knochenmark in 4-6 Wochen zu erreichen. Die ursprüngliche Induktionstherapie bestand aus einer Kombination von Prednison und Vincristin. Obwohl unter dieser Therapie bei 85% der Patienten eine Remission erreicht werden konnte, verbesserte sich die Remissionsrate unter Hinzunahme von L-Asparaginase und/oder Anthrazyclinen auf 95% (*Ortega et al. 1977*).

Für die Konsolidierung werden heutzutage von den meisten Multicenterstudien Polychemotherapien mit Einsatz von 6-9 verschiedenen Zytostatika verwendet. Es konnte belegt werden, dass hierunter die Dauer der Remissionsrate auch für Patienten mit einem hohen Risiko erheblich verbessert werden konnte (*Paolucci et al. 1989, Henze et al. 1982, Riehm et al. 1990, Harms et al. 2000*).

Ziel dieser Konsolidierungstherapie ist es, die nun nicht mehr sichtbare leukämische Zellmasse weiter zu reduzieren. Trotz klinischer Remission sind nach Erreichen der Remission noch eine große Zahl leukämischer Zellen im submikroskopischen Bereich (10^8 - 10^{10} Zellen) vorhanden. Dieses so genannte 'minimal residual disease' kann mit Hilfe verschiedener Methoden wie z.B. Durchflußzytometrie (immunol. Marker), in-vitro-Zell-Kultivierung oder molekularbiologischen Methoden oder zytogenetischen Methoden nachgewiesen werden (*Farahat et al. 1998, Hanssen-Hagge et al. 1989, Morgen et al. 1989, Yokota et al. 1991,).*

Der Konsolidierung folgt die Reinduktion. Der Begriff wird verwendet, da die Therapieelemente denen der Induktionsphase sehr ähnlich sind. (*Henze et al. 1982, Rivera et al. 1991, Pinkerton et al. 1987*).

Im Anschluss an diese Therapiephasen folgt eine Dauertherapie mit 6-Mercaptopurin und MTX bis 2 Jahre nach Diagnosestellung.

1.2.1 Therapieprotokolle

Die Therapieschemata zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie werden in multizentrischen Studien erarbeitet, um eine optimale Zytostatikazusammenstellung mit einer höchstmöglichen ereignisfreien Überlebensrate bei möglichst geringen Nebenwirkungs- und Toxizitätsraten zu gewährleisten.

In Deutschland gibt es derzeit die kooperative Studie zur ALL-Behandlung (COALL) und die Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Studie, die Therapieprotokolle zur Primärtherapie der ALL konzipiert haben, sowie die ALL-REZ-BFM-Studie zur Behandlung von ALL-Rezidiven (*Harms et al. 2000, Riehm et al. 1995, Henze et al. 1997*).

Weitere Studien gibt es in Holland, England, Frankreich, den USA und anderen Ländern.

1.2.2 Therapieprotokoll COALL-06-97

Im Rahmen der Therapiestudie COALL-06-97 wurden Kinder >1 Jahr und Jugendliche bis zum 18. Lebensjahr mit einer neu diagnostizierten non-B-ALL behandelt. Patienten mit T-NHL und >25% Blasten im Knochenmark wurden als ALL-Patienten geführt und auch evaluiert.

Die Erfahrungen und Ergebnisse der vorangegangenen COALL-Studien 80, 82, 85, 89 und 92 sind in das vorliegende Protokoll übernommen worden.

Die Patienten wurden nach Prognosefaktoren wie initiale Leukozytenzahlen, Alter, Immunzytologie, Remissionsstatus an Tag 29 und chromosomalen Translokationen (t(9;22), t(4;11)) stratifiziert und entweder dem High-Risk oder Low-Risk Protokoll

zugeführt. Zusätzlich zu diesen Kriterien erfolgte eine weitere Unterteilung in 'Standard' und 'Reduziert' anhand des *PVA-Score*, einer 'in-vitro Resistenztestung' der entnommenen Leukämiezellen gegenüber den Medikamenten Prednisolon, Vincristin und Asparaginase (*Abbildungen der Therapieprotokolle COALL-97 HR/LR siehe Anhang*).

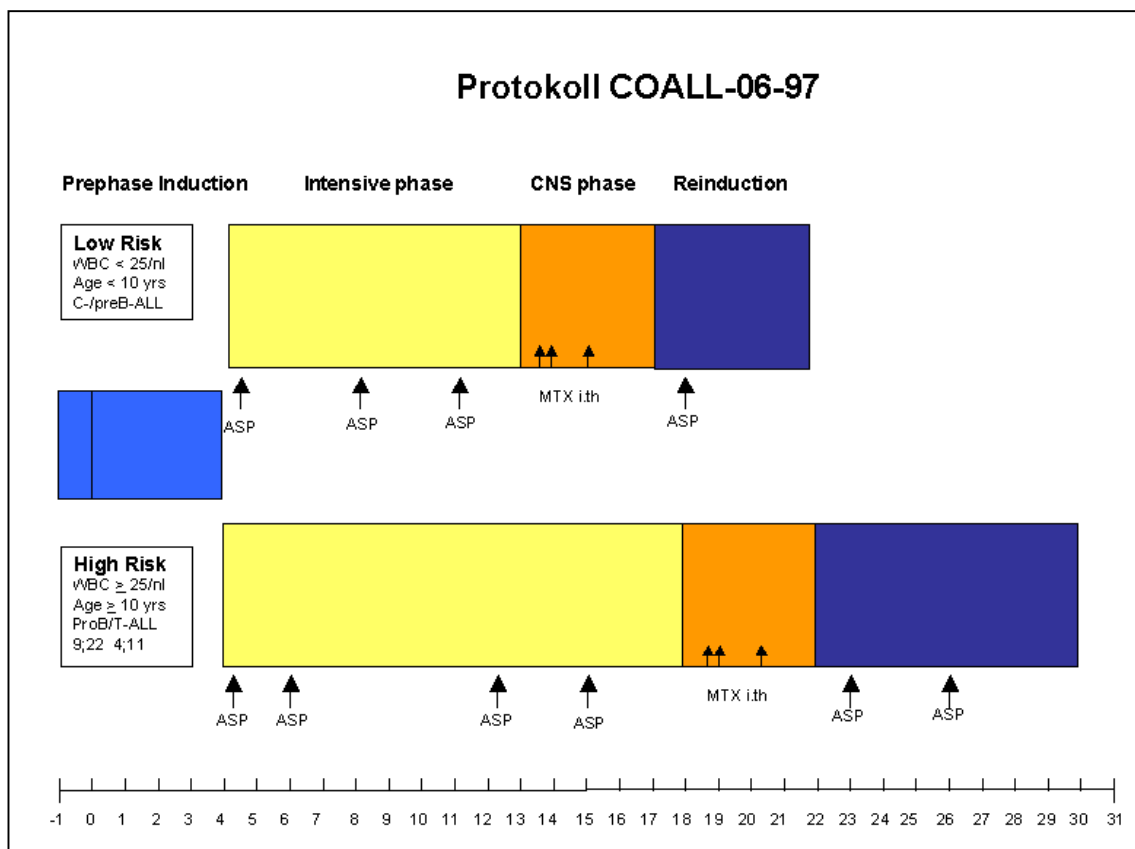


Abb. 2: Schematische Darstellung des COALL Protokolls-06-97

Zusätzliche Stratifikation in HR und LR-Gruppe wurde entsprechend der in-vitro-Resistenz durchgeführt

Im Rahmen der Induktionstherapie und Intensivtherapie, die im LR-Protokoll 13 Wochen und im HR-Protokoll 18 Wochen dauert, erhalten die Patienten Asparaginase medac in einer Dosierung von 45 000 IE/m² i.v. über 2 Stunden (LR-Patienten an den Tagen 31, 59 und 80 und HR-Patienten and den Tagen 32, 46, 87, 108).

In der Reinduktion wird Asparaginase medac[®] in gleicher Dosierung verabreicht (LR-Patienten am Tag 9 und HR-Patienten an den Tagen 9 und 30).

Kam es hierunter zu allergischen Reaktionen wurde bisher Erwinia-Asparaginase 2 x 45 000 IE/m² im Abstand von 48 Stunden gegeben. Da dieses Produkt jedoch mittlerweile vom deutschen Arzneimittelmarkt genommen wurde, kann derzeit auf PEG-Asparaginase (Oncaspar[®] der Firma Medac) in einer Dosierung von 2500 IE/m² zurückgegriffen werden, das seit dem 1. April 1997 auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zugelassen ist.

2 L-Asparaginase

2.1 Allgemeine Charakterisierung der Substanz

L-Asparaginase ist ein Enzym des Aminosäurenstoffwechsels, das ubiquitär in einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vorkommt (*Wriston 1973, Wriston 1985, Yurek et al. 1983*).

Es katalysiert die Hydrolyse von Asparagin zu Aspartat (Asparaginsäure) unter der Bildung von Ammoniak (*siehe Kap. 2.3*).

L-Asparaginase für den klinischen Gebrauch werden heutzutage fast ausschließlich aus bakteriellen Kulturen von *Escherichia coli* oder *Erwinia carotovora*¹ gewonnen (*siehe Kap. 2.7*).

Das Enzym beider Spezies besteht aus 4 identischen Untereinheiten mit jeweils einer katalytisch wirksamen Endsequenz (*Maita et al. 1974, Minton et al. 1986*). (*Abb.3*)

Die C-ASNase hat ein Molekulargewicht von ca. 141 000 Da; das der E-ASNase beträgt ca. 138 000 Da. PEG-Asparaginase, eine an Polyethylenglykol gekoppelte C-ASNase erreicht ein etwas höheres Molekulargewicht von 145 000 Da als die native C-ASNase, was sich in pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Veränderungen bemerkbar macht (*siehe Kap. 2.5*). Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes unterscheiden sich die E.coli-ASNase (pH 5,0) und Erwinia-ASNase (pH 8,7) sehr stark voneinander (*Abb. Tab 1*). Beide Enzyme zeigen eine hohe Stabilität und eine hohe Substratspezifität für L- und D-Aminosäuren mit vier und fünf C-Atomen, was sich in einer niedrigen Michaelis-Menten-Konstante (K_m 6-15 μ M) äußert (*Nakamura et al. 1971*).

Die Enzymaktivität wird hierbei nicht durch hohe Konzentrationen von Aspartat oder Ammoniak im Sinne einer Endprodukthemmung beeinflusst (*Schwartz et al. 1970*).

¹ auch *Erwinia chrysanthemi*

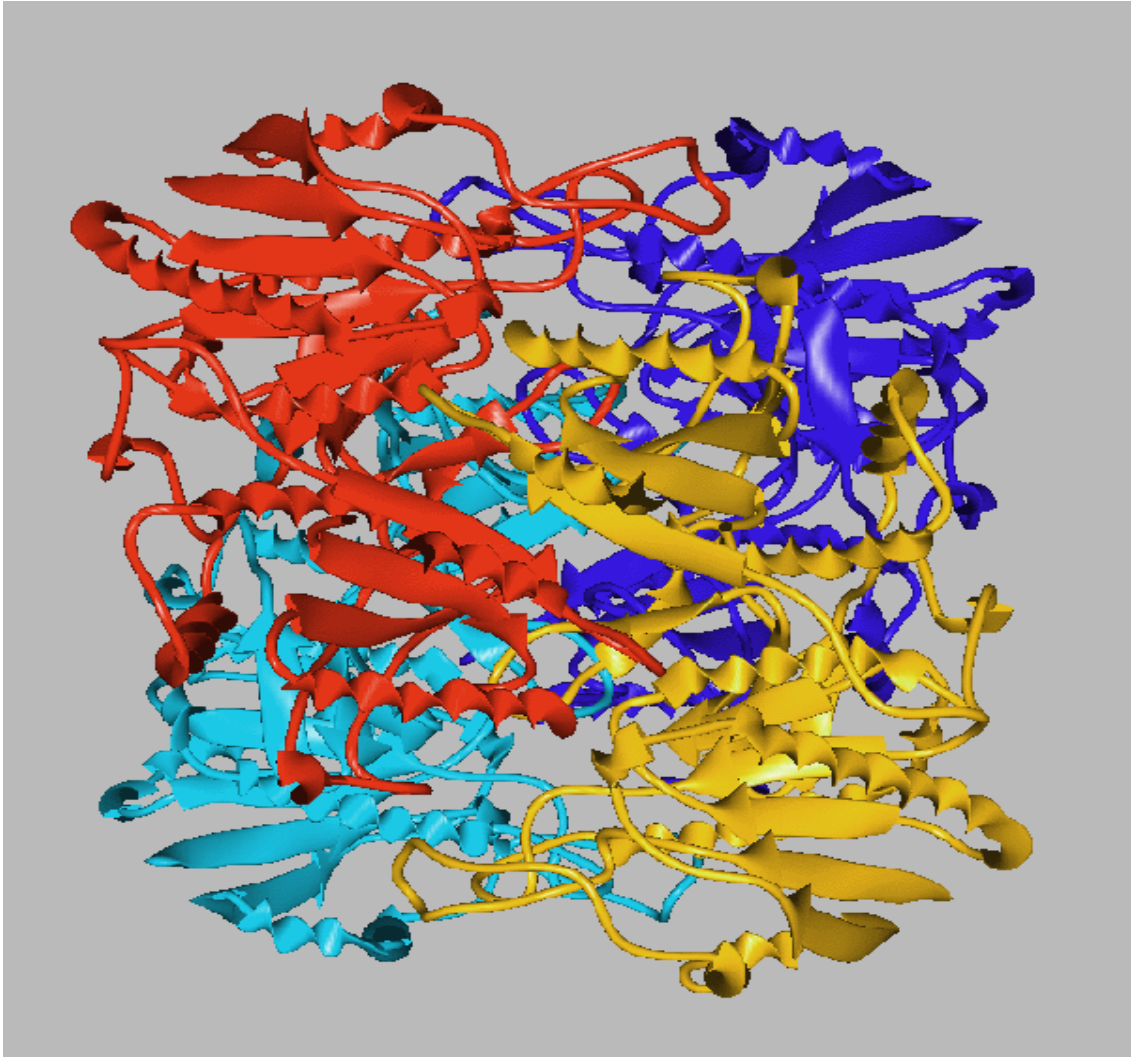


Abb. 3: 3D-Darstellung der E.coli Asparaginase

Dargestellt ist die Anordnung der 4 Untereinheiten in unterschiedlicher farbiger Markierung.

Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Clare E. Sansom, Department of Crystallography, Birkbeck College, London, UK and Venus Internet Ltd., London, UK.

2.2 Geschichte der Asparaginase

Die Entdeckung der Asparaginase und ihrer antineoplastischen Wirkung ist einem Zufall zu verdanken. 1953 beobachtete Kidd im Rahmen immunologischer Untersuchungen von Lymphomen die antiproliferative Wirkung von Meerschweinchenserum, das im Gegensatz zu Pferde- und Kaninchenserum einen Rückgang von Lymphomen in Mäusen und Ratten bewirkte. Kidd hatte aus dem Meerschweinchenserum gewonnenes Komplement dazu benutzt, Antigen-Antikörperreaktionen nachzuweisen (*Kidd 1953*).

Ausgehend von dieser Entdeckung konnte Broome später zeigen, dass nicht das Komplement Ursache für die antiproliferative Wirkung war, sondern das Enzym L-Asparaginase, das in sehr hohen Konzentrationen in Meerschweinchenserum enthalten ist (*Broome 1961*).

Unabhängig davon wiesen weitere Untersuchungen nach, dass bestimmte Tumoren wie z. B. das Walker Carcinosarcoma 256 und die L5178Y Leukämiezellen, L-Asparagin für das *in-vitro*-Wachstum benötigen (*Neumann und McCoy 1956, Haley et al. 1961*).

1964 gelang es Mashburn und Wriston nachzuweisen, dass aus *Escherichia coli*-Bakterien gewonnene L-Asparaginase eine vergleichbare Enzymaktivität und somit eine vergleichbare antineoplastische Wirkung besitzt wie aus Meerschweinchenserum hergestellte L-Asparaginase (*Mashburn und Wriston 1964, Roberts et al. 1966, Boyse et al. 1967*).

Diese Entdeckung machte es möglich, große Mengen hochgereinigter Enzympräparate für den klinischen Gebrauch herzustellen (*Campbell et al. 1967, Whelan et al. 1969, Ho et al. 1970*).

Erste klinische Studien zeigten die hohe Sensibilität lymphoblastischer Leukämien gegenüber der L-Asparaginase (*Dolowy et al. 1966; Roberts et al. 1966*). 1967 berichteten Hill und Oettgen über erste Remissionen im Menschen unter L-Asparaginase-Therapie (*Hill et al. 1967, Oettgen et al. 1967*).

Auf der Suche nach weiteren Quellen für die Asparaginasegewinnung wurden systematische Studien an verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt, die Asparagin zur Energiegewinnung hydrolysieren. *Erwinia carotovora*-Bakterien zeigten sogar eine höhere Asparaginase-Enzymaktivität als die bisher bekannte *E. coli*-ASNase (*Wade et al. 1971*).

Auch in anderen Mikroorganismen wie *Serratia marcescens* und *Vibrio succinogenes*, die zur Klasse der Wolinella gehören (*Distasio et al. 1976, Wade et al. 1968*), und zahlreichen anderen Bakterien und Pilzen konnten L-Asparaginasen nachgewiesen werden (*Altenbern et al. 1954, Manning et al. 1957, DeGroot et al. 1960*). Diese zeigen jedoch kaum antineoplastische Aktivität (*Haley et al. 1961*).

Somit erlangten lediglich Enzympräparate aus *E.coli*² und *Erwinia carotovora* klinische Bedeutung (*siehe Tab. 2 Klinisch gebräuchliche Präparate*).

Verschiedene Versuche sind unternommen worden, um die Immunogenität der L-Asparaginase als Fremdeiweiß abzuschwächen, sowie die Halbwertszeit zu verlängern und ihre Glutaminase-Aktivität zu reduzieren, um so eine optimale Therapie zu gewährleisten. Sowohl das Einführen von Polypeptid-Seitenketten (*Uren & Reagin 1979*) als auch eine Kopplung des Enzyms an verschiedene Polysaccharide, v.a. Dextrane und Polyethylenglykole (PEG), zeigten diesbezüglich einen Erfolg. Durch die kovalente Bindung von Monomethoxy-Polyethylenglykol oder Dextranen an die native L-Asparaginase kommt es zur Maskierung der allergenen Gruppen (*Park et al. 1981, Abuchowski et al. 1984, Wileman et al. 1986, Yoshimoto et al. 1986, Wada et al. 1990, Wileman et al. 1991*). Außerdem verlängert sich durch das größere Molekulargewicht und den erschwerten Abbau durch Proteasen die Halbwertszeit (*Asselin et al. 1993, Ho et al. 1986, Wada et al. 1990*).

Weitere Verfahren wie z. B. die Verwendung von Erythrozyten als Trägerkapsel (*Updike et al. 1976, Alpar & Lewis 1985*), Umgehung der Exposition des Organismus mit der L-ASNase durch Hämodialyse und extrakorporale enzymatische Hydrolyse an L-ASNase tragenden Oberflächen (*Gombotz et al. 1985, Edman et al. 1987*) oder die Polymerisation mit Albumin (*Poznansky et al. 1982*) erwiesen sich als zu aufwendig oder nicht effektiv genug, um eine Reduktion der unerwünschten immunologischen Wirkungen der L-ASNase zu erreichen ohne zu einem Aktivitätsverlust zu führen.

² von den bekannten E.coli-Asparaginasen EC-1 und EC-2 besitzt nur die EC-2-ASP antitumoröse Aktivität

2.3 Wirkmechanismus

L-Asparaginase ist ein Enzym des Aminosäurenstoffwechsels, das die Hydrolyse von L-Asparagin (L-Asn) zu L-Asparaginsäure (L-Asp) unter Abspaltung von Ammoniak katalysiert. L-Asparaginase stört somit den Aminosäurehaushalt, indem es die Konzentration von L-Asn reduziert. Im Gegensatz zu gesunden Körperzellen sind Leukämiezellen nicht in der Lage, Asparagin selbständig zu synthetisieren, da ihnen das hierfür erforderliche Enzym, die L-Asparaginsynthetase, fehlt. Für sie stellt L-Asparagin eine essentielle Aminosäure dar. Somit sind sie auf die Aufnahme von L-Asn aus dem Plasma angewiesen (*Prager et al. 1968, Astaldi et al. 1969, Haskell et al. 1970*).

Durch Zufuhr von L-Asparaginase kommt es zu einer Verarmung an L-Asn im extrazellulären Aminosäuren-Pool und somit zu einer selektiven metabolischen Störung des Proteinstoffwechsels der Tumorzellen. Ohne extrazelluläre Zufuhr von L-Asparagin kommt es zum Abbruch der Proteinbiosynthese und zum Zelluntergang der Leukämiezellen.

Auf zellulärer Ebene bewirkt der Mangel an L-Asn eine Hemmung der Nukleinsäurebildung sowohl für RNA- als auch DNA-Moleküle. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine L-Asparaginase-Konzentration ab 1 IE/l *in-vitro* den Einbau von Valin und Uridin hemmen (*Oettgen et al. 1967*).

Eine Korrelation zwischen der *in-vitro*-Hemmung des Uridin-Einbaus in RNA oder des Valin-Einbaus in Polypeptide von Leukämiezellen, die Patienten vor der Therapie mit L-Asparaginase entnommen worden waren, und dem klinischen Erfolg der Therapie bestand jedoch nicht (*Capizzi et al. 1971*).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie an Leukämiezellen mit t(12;21)-Translokation stellt jedoch den bisher angenommenen Wirkmechanismus aufgrund des Fehlens der Asparagin-Synthetase in Frage. Die t(12;21) Translokation führt zu einer TEL/AML1 Genfusion und ist in etwa 25% der akuten lymphoblastischen Leukämien nachweisbar. Diese Zelllinien weisen sich durch äußerste *in-vitro* Sensibilität gegenüber Asparaginase aus (*Ramakers et al. 2000*). Stams et al. postulierten, dass das „*enhancer core*“ der Asparagin-Synthetase durch das TEL/AML1-Gen unterdrückt würde und dadurch die Inhibierung der Asparagin-Synthetase und damit die Sensibilität gegenüber der Asparaginase erklärt wäre. Tatsächlich zeigte sich jedoch, dass t(12;21) positive Zellen

5-fach mehr Asparagin-Synthetase-mRNA exprimieren (*Stams et al. 2003*). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Zellen zu wenig Aspartat und Glutamin herstellen oder in das Zellinnere transportieren. Diese dienen als Substrat für die AS-Synthetase. Glutamindeprivation führt zu einer Aktivierung eines CD-95-vermittelten Apoptoseweges in Leukämiezellen (*Fumalrola et al. 2001*).

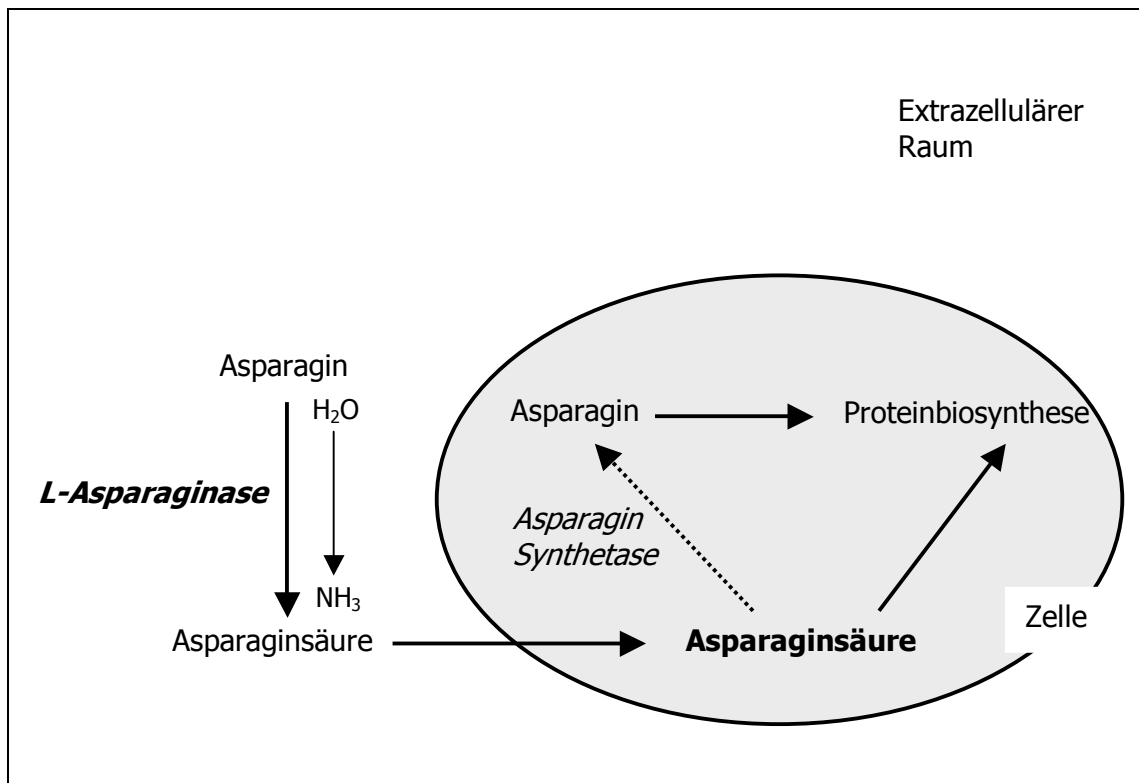


Abb. 4: Wirkmechanismus der L-Asparaginase

Der Unterschied zwischen einer normalen Zelle und Tumorzelle ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet, die die von der Asparaginsynthetase katalysierte Reaktion darstellt.

Die Hemmung der Proteinbiosynthese ist nur bedingt selektiv und betrifft zum Teil auch gesundes Gewebe, was sich in unerwünschten Nebenwirkungen äußert, auf die später noch eingegangen werden soll (*siehe Kap. 2.7*). Die Wirkung der L-Asparaginase ist bedingt phasenspezifisch, da die Hemmwirkung der Proteinbiosynthese in der G_1 - und S-Phase, den Phasen des größten Zell-turnovers, am effektivsten ist (*Takase et al. 1985*).

2.4 Eigenschaften therapeutischer Asparaginasen

| | Aktivität* (IU/mg Protein) | K _m (μM) | | Ratio Maximale Aktivität L-Asn/L-Gln | Molekular gewicht (Da) | Isoelektr. Punkt (pH) | Halbwerts Zeit (d) |
|----------------|-------------------------------|---------------------|-------|---|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | | L-Asn | L-Gln | | | | |
| E. coli | 280-400 | 12 | 3000 | 0,03 | 141.000 | 5,0 | 1,28 ± 0,35 |
| Erwinia | 650-700 | 15 | 1400 | 0,10 | 138.000 | 8,7 | 0,65 ± 3,12 |

Tab. 1: Therapeutische Asparaginasen

* eine IU hydrolysiert 1 μmol Asparagin pro Minute

Wiedergabe einer Tabelle von Capizzi & Holcenberg (1993) Asparaginase; in Cancer Medicine (3. Auflage) Lea & Fiebigger, Philadelphia, Kap. XVI-9, 796-803

Da die meisten Enzympräparate neben der katalytischen Aktivität für L-Asn auch eine Aktivität für L-Glutaminsäure (3-9%) besitzen, kommt es unter der Therapie ebenfalls zu einer Depletion von L-Gln. Die K_m für Glutamin ist etwa um das 100fache größer als die der Asn (*Miller et al. 1969*).

Hohe Asparaginasedosen führen somit auch zu einer Depletion von Glutamin im Serum, was einen Teil der Nebenwirkungen ausmacht (*siehe Kap. 2.6.2*).

2.5 PEG-Asparaginase

Wie bereits mehrfach erwähnt, handelt es sich bei der PEG-Asparaginase um eine E.coli-Asparaginase, die kovalent an Monomethoxy-Polyethylenglycol gebunden ist.

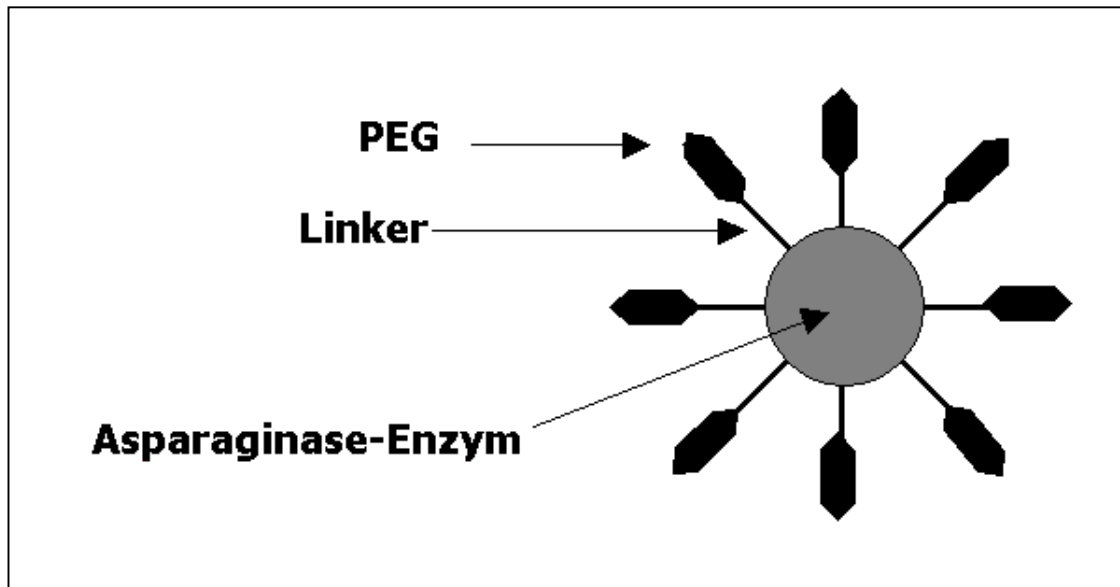


Abb. 5: schematisches Darstellung der PEG-Asparaginase.

Abbildung der kovalenten Bindung der Monomethoxy-Polyethylenglykol-Moleküle an die PEG-Asparaginase

[In Anlehnung an Holle LM. Ann. Pharmacother. 1997;31:616-624]

Der isoelektrische Punkt der PEG-ASNase ändert sich durch die kovalente Bindung nicht und entspricht somit dem der nativen Asparaginase.

Durch die kovalente Bindung der Asparaginase wird ein höheres Molekulargewicht von etwa 145.000 Da erreicht, wobei der Anteil des Monomethoxy-Polyethylenglycol etwa 5000 Da ausmacht (*Duncan et al. 1994*).

Folge des erhöhten Molekulargewichts ist die dadurch verlängerte Halbwertszeit von $5,73 \text{ d} \pm 3,24 \text{ d}$ versus $1,3 \text{ d} \pm 0,35 \text{ d}$ bei nativer E.coli Asparaginase (*Asselin et al 1993*).

PEG-Asparaginase kann aufgrund der längeren Halbwertszeit in deutlich niedrigeren Dosierungen und in größeren Applikationsintervallen verabreicht werden.

Ein weiterer Effekt der kovalenten Bindung an PEG ist die Maskierung der immunogenen Epitope. Hieraus folgt eine geringere Immunogenität als die der herkömmlichen E.coli Asparaginase, so dass sich der Einsatz der PEG-ASNase insbesondere als effektive Alternative bei Patienten ergibt, die allergisch auf native C-ASNase reagiert hatten. Etwa 70% der Patienten, die eine allergische Reaktion auf E.coli-Asparaginase gezeigt hatten, konnten unter PEG-ASNase die Therapie ohne Zeichen einer Hypersensitivität fortsetzen (Weiss 1992, Park et al. 1981, Kurtzberg et al. 1990).

Asselin et al. berichten jedoch von einer verkürzten Halbwertszeit ($1,82 \text{ d} \pm 0,26 \text{ d}$) nach 2500 IE/m^2 PEG-ASNase bei Patienten, die vorher eine allergische Reaktion auf C-ASNase gezeigt hatten. Bei nur 1 vom 7 Patienten mit einer milden allergischen Reaktion (leichte Urtikaria, Rötung und Schwellung an der Injektionsstelle i.m.) auf C-ASNase ($25\ 000 \text{ IE/m}^2$), war 7 Tage nach Applikation eine nachweisbare Aktivität nachweisbar (Asselin et al. 1993). Auch Ho et al. fanden eine kürzere Plasmahalbwertszeit bei Patienten mit vorausgegangener Sensibilisierung auf E. coli Asparaginase (Ho et al. 1986).

In Studien mit 174 teils mit C-ASNase vorbehandelten Patienten traten in 18% der Fälle allergische Reaktionen auf PEG-Asparaginase auf, von denen die meisten bei den Patienten auftraten, die zuvor schon sensibilisiert waren. Die Kreuzsensitivität zur nativen Form wird mit 32 % angegeben. (Product information. Rhone Poulanc Rorer. Oncaspar®. In: Gole WJ. Editor. Physician's desk reference, 49th ed. Montvale (NJ): Medical economics data production, 1995:1976-8).

Die Ansprechrate unter PEG-Asparaginase entspricht der nativer Asparaginase. In einer randomisierten, multizentrischen Studie an 21 pädiatrischen ALL-Rezidivpatienten (1-20 Jahre) konnte nach einer 2 wöchigen Induktionstherapie mit 2000 IE/m^2 PEG-ASNase i.m./i.v. alle 14 Tage als Monotherapie in 22 % der Patienten eine komplette Remission erreicht werden. In den nachfolgenden 3 Wochen wurde eine Kombinationstherapie mit Vincristin und Prednison durchgeführt. Hierunter konnte nach den insgesamt 5 Wochen Induktionstherapie in 78% der Patienten eine komplette (67%) oder partielle (11%) Remission beobachtet werden. Alle Patienten hatten vorher mehrfach C-ASNase erhalten. Einer der Patienten erfuhr eine therapielimitierende allergische Reaktion unter C-ASNase, erreichte hingegen unter PEG an Tag 35 eine CR (Ettinger et al. 1995). Die

Ergebnisse unter PEG sind vergleichbar mit einer Remissionsrate von 76% für ALL-Rezidivpatienten unter C-ASNase in gleicher Kombinationstherapie (*Sutow et al. 1971*).

In einer Studie an ALL-Rezidivpatienten (n=20), die keine allergische Reaktion auf C-ASNase gezeigt hatten, fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Gesamtansprechrates (60% unter 2500 IE/m² PEG alle 14d versus 50% unter 10 000 IE/m² C-ASNase 3x wöchentlich) (*Patel et al. 1996*).

2.6 Pharmakologie und Toxikologie

Die meisten Autoren proklamieren für das pharmakokinetische Verhalten der L-ASNase ein Ein-Kompartiment-Modell. Der Abbau des Enzyms erfolgt über das RES (retikuloendotheliales System)³ v.a. in der Leber (*Hall 1970, Brueck et al. 1989*).

Die Halbwertszeit der L-Asparaginase wird für die einzelnen Enzympräparate unterschiedlich angegeben. Diverse klinische Studien wurden unternommen um die Abhängigkeit zwischen Halbwertszeit und Wirksamkeit sowie Toxizität der verschiedenen Präparate nachzuweisen und zu vergleichen, um somit eine Dosisoptimierung zu erreichen.

Boos et al. konnten nachweisen, dass 2 verschiedene E.coli Präparate (Asparaginase Medac[®] und Crasnitin[®]) in der gleichen Dosierung von 10 000 IE/m² während der Induktion unterschiedliche Halbwertszeiten und Spitzenspiegel hatten. Die Spitzenspiegel 24h nach Gabe betragen nach dem Medac Präparat 2200 IE/l gegenüber 750 IE/l unter Crasnitin[®]. Die Tal-Aktivität war nach Medac etwa 6fach höher als die der Crasnitin Asparaginase (*Boos et al. 1996*).

In einer Studie von Asslin et al. konnte weder durch wiederholte Gaben noch durch die Höhe der Dosis ein Einfluss auf die Halbwertszeit ($1,24 \pm 0,17$ d unter 25.000 IE/m² C-ASNase vs. $1,35 \pm 0,3$ d unter 2.500 IE/m² C-ASNase) festgestellt werden (*Asselin et al. 1993*).

Gleichzeitige Messungen von Enzymaktivität und Konzentration von Asn im Plasma zeigten, dass Asn im Serum nicht nachweisbar (<1µM) ist, solange die Enzymaktivität >0,02 IE/ml beträgt. Hieraus entwickelte Holcenberg unter Einbeziehung kinetischer

Enzymeigenschaften ein mathematisches Modell, das eine optimale Dosierung und das Dosierungsintervall voraussagen sollte (*Holcenberg 1975, Holcenberg & Roberts 1977*). Dieses Modell wurde in einer Studie von Sallan et al. angewandt. Verglichen wurden die Halbwertszeiten drei verschiedener Asparaginasen. Nach 25 000 IE/m² Erwinase betrug diese 0,6 Tage, nach der gleichen Dosis E.coli ASNase betrug sie 1,2 Tage und nach 2500 IE/m² PEG-ASNase war die Halbwertszeit 5,8 Tage. Alle 3 Asparaginasen zeigten eine komplette Depletion solange die Aktivität > 0,03 IE/l lag (*Sallan et al. 1983*).

Die Enzymaktivität in Lymphflüssigkeit wurde mit 5-20% der des Plasmas angegeben. In interstitiellen Flüssigkeiten beträgt sie ca. 10%. Im Liquor wird die Aktivität der Asparaginase mit 0,19% der Plasma-Aktivität angegeben (*Capizzi 1993; Riccardi et al. 1981*).

Die Depletion von Asn im Liquor wird auf die systemische Wirkung der L-ASNase zurückgeführt und den damit verbundenen verringerten Transport von Asn durch die Blut-Hirn-Schranke sowie den Transport von Asn aus dem Liquor über die Blut-Hirn-Schranke ins Blut aufgrund des durch die Depletion veränderten Konzentrationsgradienten .

Riccardi et al. geben eine komplette Depletion von Asn im Liquor bei Asparaginase-Aktivitäten im Serum von 100 IE/l an (*Riccardi et al. 1981*). Die Spitzenspiegel der Asparaginase-Aktivität sind nach i.m. Gabe nur etwa halb so groß wie nach i.v. Administration (*Schwartz 1970*).

³ Auch als RHS (rethikulohistiozytäres System) oder MMS (Monozyten-Makrophagen-System) bezeichnet

Hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit fanden Nesbit et al. keine Unterschiede zwischen i.m. und i.v. Gabe. Jedoch war die Nebenwirkungsrate in Form von Hypersensitivität nach der intravenösen Applikation höher als nach intramuskulärer Gabe (Nesbit et al. 1979).⁴

2.7 Nebenwirkungen der Asparaginase

2.7.1 Immunologische Nebenwirkungen

Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören allergische Reaktionen, die in der Literatur mit einer Häufigkeit von 3-70% angegeben werden (Capizzi et al. 1971, Ettinger et al. 1997). Die meisten Fälle sind milde ausgeprägt (Hautausschlag, Urtikaria, Erythem, Ödem). Aber auch schwere Symptome wie Atembeschwerden und Bronchospasmus bis hin zum anaphylaktischen Schock (<1%) sind berichtet worden.

Ursache hierfür sind immunologische Reaktionen auf das Fremdprotein. Die hohe Immunogenität wird auf die Bildung spezifischer IgG-Antikörper zurückgeführt, die nicht nur zu allergischen Nebenwirkungen führen sondern auch mit einer erhöhten Clearance des Enzyms einhergehen (Fabry et al. 1985). Dies führt zu einer verkürzten Halbwertszeit und einer reduzierten Aktivität und somit zu einer verminderten Asparagindepletion (Asselin et al. 1993).

Capizzi beschrieb eine enge Korrelation zwischen dem Nachweis von Anti-ASNase-Antikörpern und dem raschen Abfall der Asparaginase Aktivität im Plasma, die etwa 2-4 Tage vor dem Auftreten einer Allergie nachweisbar waren (Capizzi 1993). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Studie von Killander et al. (Killander et al. 1976).

In einigen Fällen wurde eine rasche Inaktivierung der Asparaginase und die Bildung spezifischer IgG-Antikörper trotz Abwesenheit klinischer Symptome einer allergischen Reaktion gefunden. Dieses Phänomen wird als "silent inactivation" in der Literatur beschrieben (Capizzi et al. 1971).

⁴ Bei dieser Betrachtung ist jedoch die Wahrscheinlichkeit der Kontamination mit Endotoxinen und anderen bakteriellen Proteinen zu beachten, die besonders bei früheren Präparationen noch sehr hoch war und somit nur eingeschränkt mit den heutigen Präparaten vergleichbar ist.

Allergische Reaktionen traten in Multichemotherapie-Protokollen seltener auf als bei einer Monotherapie mit Asparaginase, was auf immunsupprimierende Effekte der Begleitchemotherapeutika zurückgeführt wurde (*Oettgen et al. 1970*).

Des Weiteren hat die Applikationsform Einfluss auf das Vorkommen von Nebenwirkungen. So kam es nach intravenösen Gaben zu häufigeren und schwereren Nebenwirkungen als unter der i.m. Gabe (*Nesbit et al. 1979*). Diese führt jedoch teilweise zu sehr schmerzhaften lokalen Schwellungen, die ebenfalls therapielimitierend sein können. Auch die wiederholte Applikation führt zu vermehrten Hypersensitivitätsreaktionen (*Nesbit et al. 1979, Oettgen et al. 1970*).

Normalerweise zeigen L-Asparaginasen unterschiedlicher Herkunft keine Kreuzreaktion, so dass bei Auftreten allergischer Reaktionen die Therapie mit einem anderen Präparat fortgeführt werden kann.

In vergleichenden nicht randomisierten Studien zwischen Erwinia-Asparaginase und der nativen E.coli-Asparaginase zeigte sich eine niedrigere Inzidenz allergischer Reaktionen unter Erwinase (7,5%) im Vergleich zu E.coli (29%) (*Barron et al. 1995*).

Da polyethylenglykol-gekoppelte Asparaginase ebenso wie die native Form aus Escherichia coli Bakterien gewonnen wird, kommt es zu einer Kreuzsensitivität (ca.32%). Jedoch werden durch die Bindung an Polyethylenglykol die immunogenen Epitope des Fremdproteins teilweise maskiert (*Näheres siehe Kap. 2.4.1*).

2.7.2 Nebenwirkungen aufgrund der Proteinbiosynthese

Weitere Nebenwirkungen, die auf die verminderte Proteinbiosynthese zurückzuführen sind, betreffen Störungen des Gerinnungssystems in Folge dessen es sowohl zu Blutungen als auch zu Thrombembolien kommen kann.

Es kommt zu einer Abnahme des Plasmafibrinogens und der Faktoren II, VI, VII, VIII und X.

Hingegen werden thrombembolische Ereignisse durch die verminderte Synthese von Antikoagulanzen wie ATIII, Protein C und S gefördert (*Ramsay et al. 1977, Nowak-Göttel et al. 1996*).

Funktionsstörungen der Bauchspeicheldrüse können in 10% zu einer akuten Pankreatitis führen, die in einigen Fällen auch als lebensbedrohlich beschrieben wurden (*Chambon et al. 1993, Sadoff et al. 1997*). Hypoglykämien, die eine Insulinsubstitution erforderlich machen, wurden ebenfalls beobachtet.

Direkte Wirkungen auf das Knochenmark bewirken eine milde bis moderate Suppression aller 3 Zell-Linien, die jedoch selten klinische Relevanz erreichen (*Kolarz et al. 1971*).

Eine ZNS-Beteiligung kann sich in Agitiertheit, Depression, Halluzinationen, Desorientiertheit, Krämpfen und Somnolenz bis hin zu Koma äußern, was auf den Eingriff in den Glutamin-, Glutamat- und Ammoniakstoffwechsel des Gehirns zurückgeführt wird (*Holland et al. 1974, Oettgen et al. 1970*). Neurologische Dysfunktionen sind selten und bilden sich meist spontan nach Absetzen des Präparates zurück.

Für die Dauer der Asparaginasetherapie kommt es zu einer Hyperlipoproteinämie mit einem Anstieg der Triglyceride, der VLDL und des Apolipoprotein 100 (*Parsons et al. 1997*).

Des Weiteren wurden Erhöhung der Transaminasen, der alkalischen Phosphatase, der LDH und des Bilirubins im Sinne einer hepatischen Dysfunktion beobachtet sowie eine Abnahme der Serumalbuminkonzentration, des Cholesterins und der Phospholipide (*Oettgen et al. 1970*).

In den ersten 2 Stunden nach Asparaginase-Gabe kann es zu Fieber und gastrointestinalen Störungen kommen.

2.8 Asparaginasepräparate auf dem deutschen Arzneimittelmarkt

Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt sind 3 verschiedene *E. coli* Präparate erhältlich.

Asparaginase medac[®] und Crasnitin[®] stammen von unterschiedlichen *E. coli* Stämmen. Boos et al. konnten nachweisen, dass sie sich bei gleicher Dosierung (10 000 IE/m² KOF alle 3 Tage) in ihrer Halbwertszeit unterscheiden.

Die Studiengruppe zeigte ebenfalls, dass sich unter dieser Dosierung auch die Aktivitäten der Präparate unterscheiden (475 IE/l bei Asparaginase medac[®] vs. 75 IE/l bei Crasnitin[®]). Während in der Induktion die Asparaginindepletion hierunter ausreichend

war, zeigte sich in der Reinduktion mit Crasnitin[®] (mittlerweile nicht mehr im Handel erhältlich) lediglich in 57% eine vollständige Depletion (*Boos et al. 1996*).

| Handelsnahme | Hersteller | Bakterium | Molekülmasse | Halbwertszeit |
|---------------------------------|------------|----------------------|--------------|--|
| Asparaginase medac [®] | Medac | E.coli (HAP, A1-3) | 133-141 kDa | 31,2h + 8,4h [*] 23,0 h + 2,5 h [°] |
| Crasnitin [®] | Bayer | E.coli (W,ATCC 9637) | 120 kDa | 17,7 h + 4,3 h [°] |
| Onacspar [®] | Medac | E. coli PEG-Konjugat | 145 kDa | 136,8h + 77,8h [*] |
| Erwinase [®] | Speywood | Erwinia chrysanthemi | 135 kDa | 15,6h + 3,12h [*] 7,2 h + 4,1 h [°] |

Tab. 2: Klinisch angewandte Asparaginasen auf dem deutschen Arzneimittelmarkt

* nach i.m. Gabe nach Asselin et al. 1993,

° nach i.v. Gabe nach Werber 1995

Die auf dem deutschen Arzneimittelmarkt nicht mehr erhältliche Erwinase[®] sowie Crasnitin[®] sind farblich grau hervorgehoben, soll hier aber der Vollständigkeit halber zum Vergleich erwähnt werden

2.9 Klinische Bedeutung der Asparaginase

Seit der Entdeckung seiner antileukämischen Wirkung wird Asparaginase nunmehr seit über 20 Jahren in der Chemotherapie der ALL und des NHL eingesetzt. Es wurden zwar vereinzelt komplette Remissionen in bis zu 50% der Patienten unter Einzeltherapie mit Asparaginase berichtet (*Jaffe et al. 1971, Nesbit et al. 1981*). Diese waren aber im Vergleich zur Kombinationschemotherapie deutlich geringer. Ortega et al berichteten 1977 eine initiale Remissionsrate von 95% unter der Kombination von Asparaginase, Prednison und Vincristin (*Ortega et al. 1977*). Seither konnte in verschiedenen Studien die klinische Bedeutung der Asparaginase als Teil von Multichemotherapie-Protokollen belegt werden (*Ertel et al. 1979, Jones et al. 1977, Clavell et al. 1986*).

Anfänglich wurde Asparaginase fast ausschließlich in der Induktionstherapie eingesetzt. Zunehmend etablierte sich jedoch auch die Anwendung in der Konsolidierungsphase und der sogenannten Maintenance-Phase. So verlängerte sich beispielsweise die Dauer der Remission um ein Drittel (*Nesbit et al. 1979*).

Sallan et al. konnten in einer randomisierten Studie zeigen, dass der Gebrauch von hoch-dosierter Asparaginase 1 mal wöchentlich zusammen mit Vincristin, Prednison und Doxorubicin eine signifikant höhere ereignisfreie Überlebensrate zur Folge hatte als die Kombinationstherapie ohne ASNase (*Sallan et al. 1983*).

3 Material und Methoden

3.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Begleitstudie des Therapieprotokolls COALL-06-97 zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämien im Kindesalter durchgeführt.

Es sollte die Wirksamkeit von 2500 IE/m² KOF PEG-ASNase (Oncaspar[®]) i.v. mit der von 45 000 IE/m² KOF *E.coli*-Asparaginase (Asparaginase medac[®]) i.v., wie sie bisher in dem COALL-Protokoll-92 und 97 verwendet wurde, verglichen werden. Hierzu wurde in dem COALL-Protokoll-06-97 die 3. bzw. die 4. C-ASNase Gabe (45 000 IE/m²) des Low Risk bzw. High Risk Protokolls durch 2500 IE/m² PEG-ASNase substituiert und die Dauer der Depletion von Asn im Serum bis zu 8 Wochen nach Gabe gemessen. Insbesondere sollte die Dauer der Asparagin Depletion im Serum mit den Daten, die nach Gabe von 45 000 IE/m² C-ASNase in dem COALL-Protokoll-92 erhoben wurden, verglichen werden. Neben der Depletion im Serum wurde auch die Asparagindepletion im Liquor, sowie die Asparaginase-Aktivität im Serum bestimmt.

Da es bisher überwiegend Daten zur intramuskulären Applikation von PEG-Asparaginase gab, sollten im Rahmen des Protokolls eigene Daten zur intravenösen Applikation von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase erhoben werden.

In der aktuellen Studie sollten zusätzlich zur Asparaginmessung im Serum die Asparaginase Aktivität unter 2500 IE/m² PEG-ASNase erfasst werden, um somit eine fundiertere Aussage über die Effektivität treffen zu können.

Die Asparaginmessungen im Liquor sollten Aufschluss über die ZNS-Wirksamkeit von PEG-Asparaginase geben.

Von besonderem Interesse bei dem Vergleich der beiden Präparate (45 000 IE/m² C-ASNase vs. 2500 IE/m² PEG-ASNase) war die Frage nach der Möglichkeit, C-Asparaginase eventuell durch PEG-Asparaginase in den künftigen Therapieprotokollen zu ersetzen, um somit eventuell die Rate der klinisch relevanten Allergien zu senken. Die bisherige Allergierate im COALL-Protokoll wird mit 30% angegeben (unveröffentlichte Daten), 10% dieser Patienten mit einer allergische Reaktion auf C-ASNase zeigen diese bereits nach der 2. Gabe, weitere 10 % jeweils nach der 3. und 4. Gabe. Diese macht ein Umsetzen auf ein anderes Präparat erforderlich. Es stellt sich

somit die Frage, ob eine gezielte Umsetzung von C-ASNase auf PEG-ASNase (mit dem Vorteil der Demaskierung der allergischen Epitope) nach der 2. Gabe weiteren Allergien vorbeugen könnte.

3.2 Patienten - Auswahlkriterien

In die Studie aufgenommen wurden 71 Patienten (38 Jungen und 33 Mädchen), bei denen eine ALL diagnostiziert wurde und die innerhalb des Studienprotokolls COALL-06-97 registriert waren und nach demselben Therapieschema behandelt wurden. Sechsdreißig Patienten wurden nach dem Low Risk Protokoll behandelt, Fünfdreißig nach dem High Risk Protokoll (*siehe Protokolle im Anhang*). Der Altersmedian lag bei 4 Jahren und 5 Monaten (1 Jahr 7 Monate – 15 Jahre).

Säuglinge und Kinder < 1 Lebensjahr mit ALL waren ausgeschlossen, ebenso wie Kinder, die an einem Rezidiv erkrankt waren oder einen primären ZNS-Befall erlitten hatten.

Außerdem waren Patienten mit bekannter vorheriger Allergie auf C-ASP im Rahmen der Therapie nicht für die Studie qualifiziert.

Da es sich um zusätzliche Blutentnahmen im Protokoll handelte, wurde die Studie der Ethikkommission vorgelegt und die Einverständniserklärung der Eltern eingeholt (*siehe Anhang*).

3.3 Probengewinnung

3.3.1 Zeitpunkt der Probenentnahmen

Um eine Aussage über eine ausreichend lange Asparagindepletion im Zusammenhang mit der Enzymaktivität machen zu können, war es nötig, einen möglichst langen Abstand zwischen zwei Asparaginasegaben zu bestimmen. Hierfür erwiesen sich folgende Zeitpunkte im Studienprotokoll COALL-06-97 als geeignet:

Die 3. Asparaginasegabe im Low-Risk-Protokoll am Tag 80 (2. MTX-ASP-Block) und entsprechend die 4. Gabe im High-Risk-Protokoll am Tag 108 (2. HIDAC-ASP-Block).

Direkt vor Gabe der PEG-Asparaginase wurde eine Blutprobe entnommen und der Leerwert bestimmt. Danach wurden wöchentliche Blutentnahmen über einen Zeitraum von 8 Wochen durchgeführt sowie Liquorproben im Rahmen der im Protokoll vorgesehenen Lumbalpunktionen zur Verabreichung intrathekaler MTX-Gaben gewonnen (*siehe Protokoll im Anhang*).

3.3.2 Behandlung der Proben

Es wurden 6ml Blut (ohne Zusätze) entnommen und direkt nach Blutentnahme auf Eis gestellt, um die Enzymaktivität zu stoppen. Sofort danach wurden die Proben gekühlt abgesehrt und in 2 Portionen a 1-2 ml Serum bei -20°C tiefgefroren und zur Bestimmung der L-Asparagin-Konzentration (1. Probe) und der Enzymaktivität (2. Probe) auf Trockeneis verschickt.

Ebenso wurden Liquorproben bei einer LP gewonnen und in 2 Portionen a 1-2 ml sofort nach Entnahme nach demselben Schema wie die Blutproben eingefroren und verschickt.

Da über die Dauer der Depletion der PEG-Asparaginase nach i.v.-Gabe mit der hier angewandten Dosis von 2500 IE/m^2 keine gesicherten Daten vorlagen, den Patienten durch die einmalige Gabe jedoch kein Therapienachteil entstehen sollte, wurden bei den ersten 10 Patienten der Studie die Proben der Woche 3-5 für die Bestimmung der Asparaginkonzentration im Blut sofort nach Entnahme einzeln verschickt und gemessen, so dass im Falle einer nicht ausreichenden Depletion eine erneute Dosis PEG-Asparaginase von 1000 IE/m^2 gegeben werden konnte.

Die Proben der Woche 0-2 sowie die Proben der Woche 6-8 wurden gesammelt verschickt. Die Messung der ersten 10 Patienten zeigte jedoch, dass bei $>50\%$ der Kinder eine Depletion über mindestens 5-6 Wochen nachzuweisen war, so dass bei den nachfolgenden Patienten die Proben gesammelt nach Beendigung der 8-wöchigen Messung verschickt werden konnten.

3.4 Quantitative Bestimmung der Aminosäuren mittels HPLC (Ionenaustauschchromatographie)

3.4.1 Allgemeine Technik der Ionenaustauschchromatographie

Aminosäuren sind polare Substanzen, die Protonen aufnehmen und abgeben können. Da sie sich wie Säuren und Basen verhalten, gehören sie zu der Gruppe der Ampholyte.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen funktionellen Gruppen in den Seitenketten besitzen sie unterschiedliche pK-Werte, die bei bestimmten pH-Werten einen unterschiedlichen Dissoziationsgrad annehmen.

Als isoelektrischen Punkt (IP) bezeichnet man den Zustand einer Aminosäure, an dem sie aufgrund des Dissoziationsgrades keine Nettoladung trägt und somit auch nicht im elektrischen Feld wandert. Somit lassen sich Aminosäuren entsprechend ihres IP mit Hilfe von pH-Veränderungen voneinander trennen. Dies Prinzip hat sich die Ionenaustauschchromatographie zu Nutzen gemacht.

Prinzip:

Bei saurem pH (pH1) liegen Aminosäuren als Kationen vor. In diesem Zustand werden sie auf eine Kationenaustauschersäule aufgebracht, eine hochpolymere Kunstharzmatrix, deren Polysterenkette durch cross-links (Divinylbenzen-gruppen) miteinander verbunden sind und die in sulfoniertem Zustand vorliegen und somit negativ geladen sind.

Kationenaustauscher werden gewonnen, in dem man sie in Säure quellen lässt, d.h. sie bilden mit den Salzen Kationen. Die entstandenen H_3O^+ -Ionen sind an SO_3^- gebunden. Die positiv geladenen Gruppen der zu untersuchenden Aminosäuren gehen mit der Sulfonylgruppe der Matrix eine Ionenwechselwirkung ein und verdrängen somit die Kationen aus ihrer Bindung (Ionenaustausch).

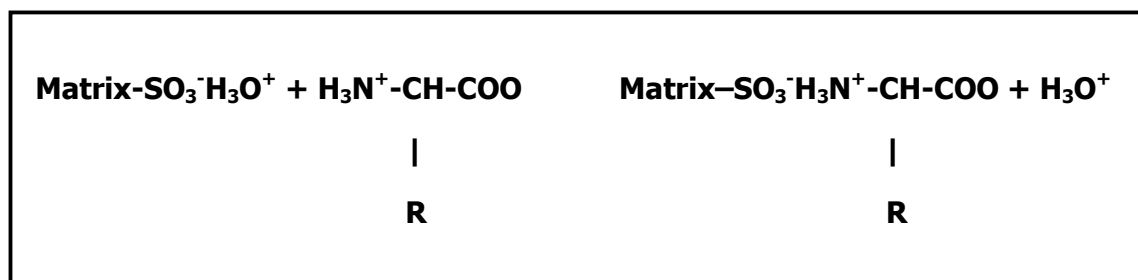


Abb. 6: Schematische Darstellung des Ionenaustausches an einer Kunstharzmatrix mit sulfonierten Gruppen

Steigerung des pH-Wertes, der Temperatur und der Pufferionenkonzentration resultieren im Erreichen des IP der Aminosäuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten und führen somit zum Verlust der ionischen Eigenschaft. Die Aminosäuren dissoziieren von den Sulfonylgruppen ab und gehen in Lösung.

Das Eluat wird mit einem photometrischen Reagenz versehen. Hierzu werden verschiedene Derivatisierungsreagenzien verwendet; wie z.B. Ninhydrin (Indantrionhydrat), ortho-Phthaldialdehyd (OPA), Phenylisothiocyanat (PITC) und 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc). Derivatisierungsreagenzien gehen chemische Verbindungen ein, die ein Fluoreszenzprodukt zur Folge haben, das dann wiederum photometrisch gemessen und quantitativ bestimmt werden kann. Von den oben genannten Reagenzien kann nur OPA sowohl zur pre-column als auch als post-column-Derivatisierung verwendet werden.

OPA weist eine zehnfach höhere Sensitivität gegenüber Ninhydrin auf und gehört zu den am meisten verwendeten Substanzen in der HPLC-Methode (High performance liquid chromatography).

Pre-column-Derivatisierung besitzt eine höhere Sensitivität als post-column-Derivatisierung, da bei der post-column-Derivatisierung eine Verunreinigung des Eluats durch die Trägersubstanz des Detergenz die Auftrennung der Aminosäuren erschwert.

Das Reaktionsgemisch aus Aminosäureneluat und Detergenz wird dem high temperature reaction coil zugeführt und zur Reaktion gebracht.

Es folgt die photometrische Bestimmung der Aminosäuren und schließlich die chromatographische Darstellung der Aminosäurentrennung, wobei die Retentionszeiten der einzelnen Peaks eine bestimmte Aminosäure identifizieren und die Fläche (Area under the peak= AUP) die Quantität der Aminosäure angibt.

Durch Variation der einzelnen Parameter wie z.B. Partikelgröße der Kunstharzmatrix, Grad der Sulfonierung, bzw. der cross-links, Säulendurchmesser und -länge, Flussrate, Pufferzusammensetzung, Temperatur und pH-Wert kann die Analyse beeinflusst und optimiert werden.

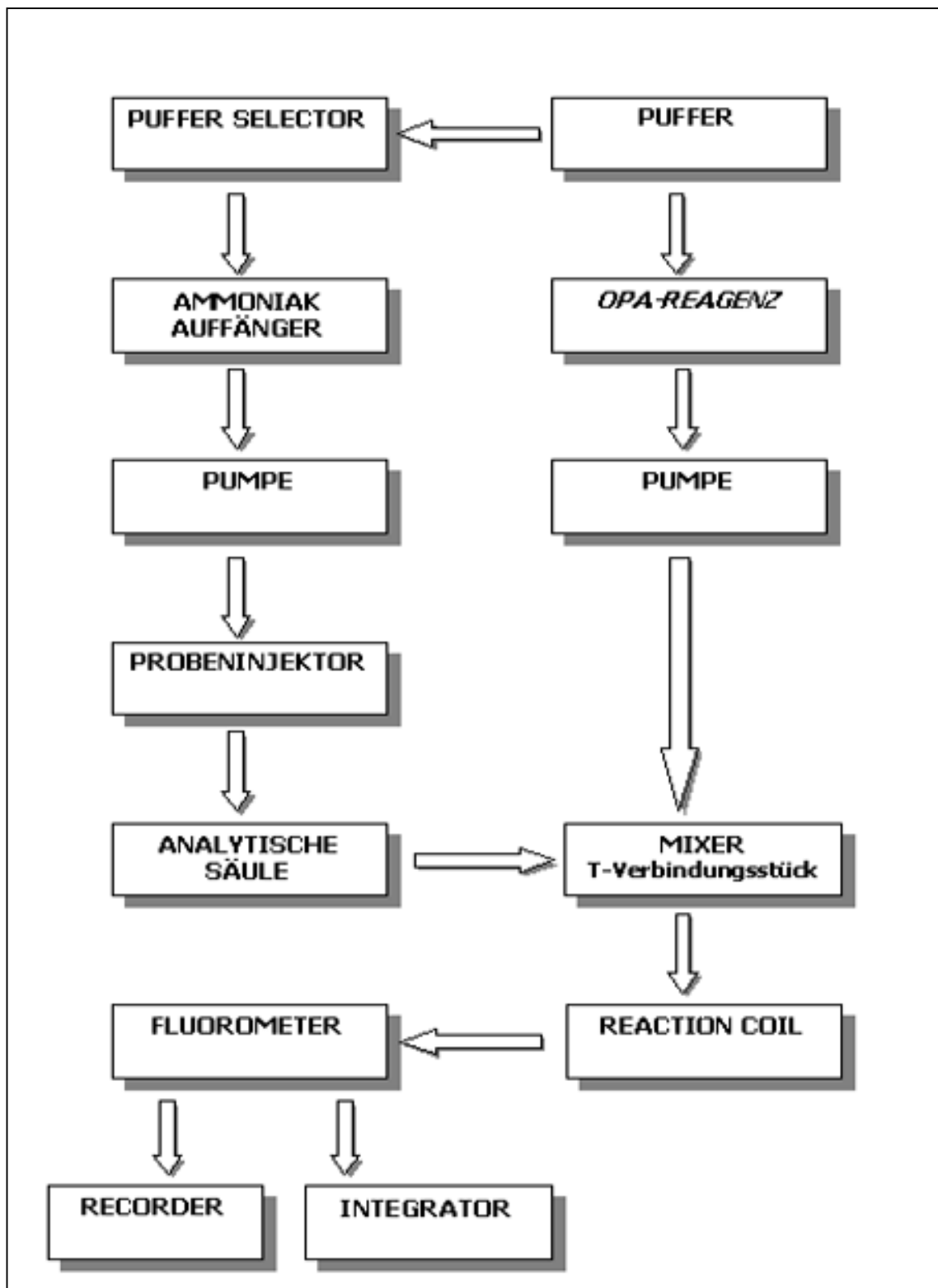


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Aminosäureanalyzers

3.4.2 Angewandte Methode zur quantitativen Aminosäurenanalyse

Methode: **HPLC** high performance liquid chromatography
Post-column-Derivatisierung mit OPA

Geräte: **Biochrom 20**
Aminosäurenanalysator mit HPLC-System

Aufarbeitung der Proben:

Zur Bestimmung der Proben wurden 100 µl Serum oder Liquor benötigt. Um freie Aminosäuren im Serum/ Liquor zu bestimmen, musste das Material zuerst deproteinisiert werden. Dies erfolgte unter Zusatz von 25µl 10%iger Sulfosalicylsäure. Nach 30minütiger Inkubation wurden 25µl 0,3 molare NaOH und 450µl Interne Standardlösung (400µl Norleucin-Lösung ad 10 ml mit Verdünnungspuffer aufgefüllt) hinzugegeben und bei 2000 U/s mindesten 2 Minuten zentrifugiert.

Zusätzlich zu den Proben wurde jeweils ein Testgemisch, bestehend aus 50µl Testlösung, 50µl Asparaginsäurelösung, 200µl Norleucinlösung, 200µl Glutaminsäurelösung ad 10ml mit Verdünnungspuffer, untersucht.

3.4.3 Derivatisierung und Detektion der Aminosäuren mit OPA (Ortho-Phthaldialdehyd)

Durch die Reaktion primärer Aminosäuren mit ortho-Phthaldialdehyd kommt es zu einem Fluoreszenzphänomen. Diese Reaktion findet in Gegenwart von Mercaptoethanol und einem Thiol bei einem pH-Wert zwischen 9,5 und 10 statt.

Die Isoindole als Reaktionsprodukt zeigen fluoreszierende Aktivität.

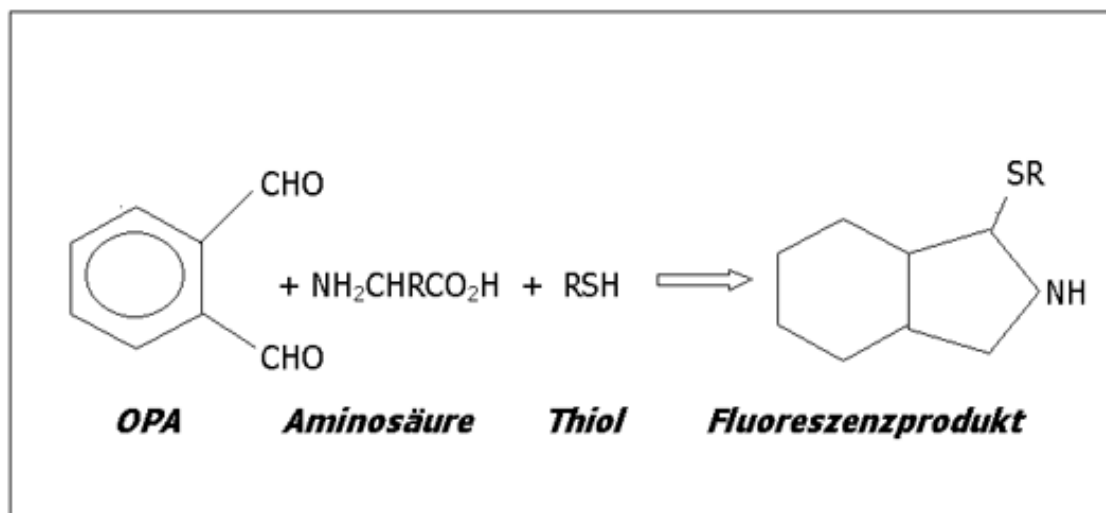


Abb. 8: Darstellung der Reaktion von OPA (ortho-phthaldialdehyd) mit Aminosäuren

Die Reaktionszeit ist sehr kurz und beträgt 1-3 min. Allerdings sind die Isoindolderivate relativ instabil und werden bei Raumtemperatur schnell abgebaut, so dass bei der pre-column-Derivatisierung für diese Reaktion ein pH von 7,2 eingehalten werden muss, um eine Stabilisierung der Produkte zu gewährleisten. Dies kann bei der post-column-Derivatisierung außer Acht gelassen werden.

Da OPA nur mit primären Aminosäuren reagiert, können sekundäre Amine wie z.B. Prolin und Hydroxyprolin mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Erstellung einer Reagenzlösung für OPA:

Hierzu werden 68 g Kaliumhydroxydplättchen in ca. 1 Liter H_2O gelöst und mit 123,6 g Borsäure auf 2 Liter mit H_2O aufgefüllt. Hinzugegeben werden 1 g ortho-Phthaldialdehyd, in 20ml Ethanol gelöst, sowie 4ml Triton X 100 und 4ml Mercaptoethanol. Diese Reagenzlösung wird 10 minütiger Stickstoffinsufflation ausgesetzt.

Die Fließgeschwindigkeit für das Reaktionsgemisch wurde auf 20 ml/h eingestellt.

3.4.4 Fluorometrische Bestimmung der Aminosäuren

Nachdem die Aminosäuren mit OPA derivatisiert wurden, erfolgt die Auftrennung über eine Lithiumionen-Säule und die fluorometrische Bestimmung.

Die Anregungswellenlänge hierfür beträgt λ_{ex} 330 nm. Die Emission erfolgt bei einer Wellenlänge von λ_{em} 450 nm.

3.4.5 Puffersystem und Pufferzusammensetzung

Es werden derzeit 2 verschiedene Puffersysteme zur Proteinanalyse verwendet.

Proteinhydrolysate werden normalerweise mittels eines Natrium Citrat Puffer Systems mit 3 bis 4 verschiedenen Puffern analysiert, wodurch die 17 am häufigsten vorkommenden Aminosäuren detektiert werden können. Für die Aminosäurenanalyse physiologischer Substanzen, wie z.B. Blut, Urin oder Gewebe wird ein aus 4 bis 5 verschiedenen Lithium Citrat Puffern bestehendes System verwendet. Hierdurch kann im Gegensatz zum Natrium Citrat Puffer eine bessere Auftrennung von Asparagin und Glutamin von den Aminosäuren Threonin und Serin erzielt werden.

Allgemeine Definition eines Puffers

Puffer sind Systeme aus einer schwachen Säure und ihrer konjugierten Base. Sie zeichnen sich durch einen stabilen pH-Wert aus, der sich auch unter Zugabe von Säuren oder Basen nicht ändert.

Die mathematische Grundlage zur Rechnung mit Puffersystemen bildet die *Henderson-Hasselbalch-Gleichung*: $pH = pK + \log \text{Base} / \text{konjugierte Säure}$. Die Pufferkapazität gibt die quantitative Leistungsfähigkeit eines Systems an.

Sie ist von der Gesamtkonzentration des Puffersystems abhängig sowie von der Entfernung des pK-Wertes des Puffersystems vom pH-Wert der Lösung. Die Pufferkapazität ist am größten, wenn $pK = pH$, d.h. wenn das Verhältnis Säure zu konjugierter Base 1:1 beträgt.

Die Pufferkapazität gibt die Anzahl der Protonen (Hydroxylumionen) in mmol an, die in 1 Liter Pufferlösung eine pH-Änderung von 1,0 bewirkt. Diese wird in $\text{mmol/l} \times pH$ angegeben.

Die Auswahl der Puffersysteme für die Ionenaustauschchromatographie richtet sich nach folgenden Kriterien.

Kationen werden nach ihrer Ladung und Größe (Hydratationshülle) ausgewählt. Je kleiner der Durchmesser, um so größer die Affinität zu den negativ geladenen Sulfonylgruppen der Säulenmatrix und um so kürzer die Retentionszeit der Aminosäuren. Anionen werden nach dem pK-Wert der Säure ausgesucht, der nach Möglichkeit dem gewünschten pH des Puffers entsprechen sollte. Bei konstantem pH gilt: je höher die Molarität eines Puffers, um so kürzer die Retentionszeit. Umgekehrt verkürzt sich die Retentionszeit ebenfalls bei steigendem pH und konstanter Molarität.

Zusammensetzung der Puffer:

| | Lade- puffer | Puffer 1 | Puffer 2 | Puffer 3 | Puffer 4 | Puffer 5 | Lithium Hydroxyd |
|----------------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| pH | 2,2 | 2,8 | 3,0 | 3,15 | 3,45 | 3,55 | 0 |
| Li+ Ionen-Konz. (M) | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,8 | 1,65 | 0,3 |
| Citrat (g) | 48,0 | 48,0 | 48,0 | 48,0 | 48,0 | 105,05 | 0 |
| Lithiumhydroxyd (g) | 42,0 | 42,0 | 42,0 | 42,0 | 42,0 | 35,0 | 62,95 |
| Lithiumchlorid (g) | 0 | 0 | 21,25 | 84,75 | 170,0 | 314,35 | 0 |
| Thiodiglycol 25% (ml) | 400,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isopropanol (ml) | 0 | 75,0 | 75,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Endvolumen (l) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| HCL | ad pH | | | | | | |

Tab. 3: Pufferzusammensetzung

Die Fließgeschwindigkeit für die Puffer ist mit 25 ml/h eingestellt. Dauer der Laufzeit der einzelnen Puffer sowie Temperatur sind nach dem Schema in Abbildung 9 eingestellt und automatisiert. Die reine Analysezeit für eine einzelne Probe beträgt hierbei 122 min (Schritt 1-8).

Nach jeder Probe folgt eine Säulenäquilibrierung (Schritt 9-12), die insgesamt 42 min dauert, so dass sich eine Gesamtmessdauer von 164 min für jede Probe ergibt.

Messvorgang einer Probe

| Schritt | Zeit (min) | Temperatur (°C) | Puffer | OPA |
|---------|------------|-----------------|---------|-----|
| 1 | 4:00 | 30°C | 1 | ON |
| 2 | 34:00 | 30°C | 2 | ON |
| 3 | 7:00 | 30°C | 3 | ON |
| 4 | 11:00 | 73°C | 3 | ON |
| 5 | 10:00 | 73°C | 4 | ON |
| 6 | 10:00 | 76°C | 4 | ON |
| 7 | 40:00 | 76°C | 5 | ON |
| 8 | 6:00 | 76°C | 6 | ON |
| 9 | 6:00 | 76°C | 1 | ON |
| 10 | 30:00 | 36°C | 1 (25%) | OFF |
| 11 | 5:00 | 36°C | 1 | ON |
| 12 | 1:00 | 36°C | 1 | ON |

Tab. 4: Darstellung des Messvorgangs in einzelnen Schritten

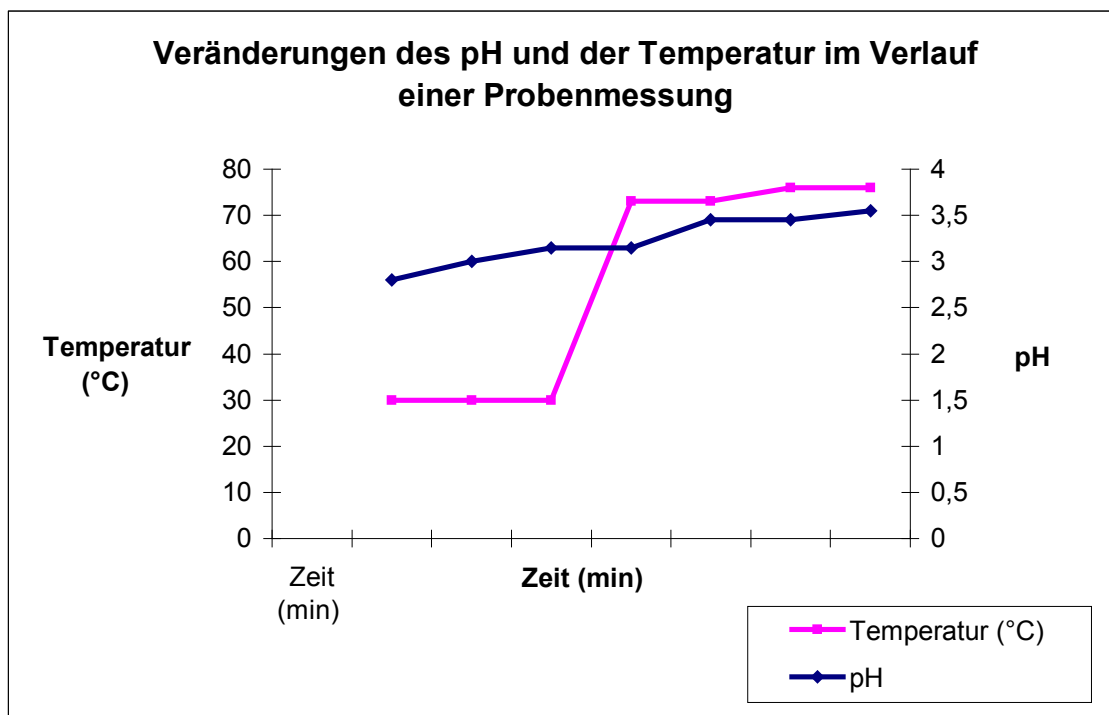


Abb. 9: Abhängigkeit von Temperatur und pH im Verlauf der Aminosäurenmessung am Biochrom 20

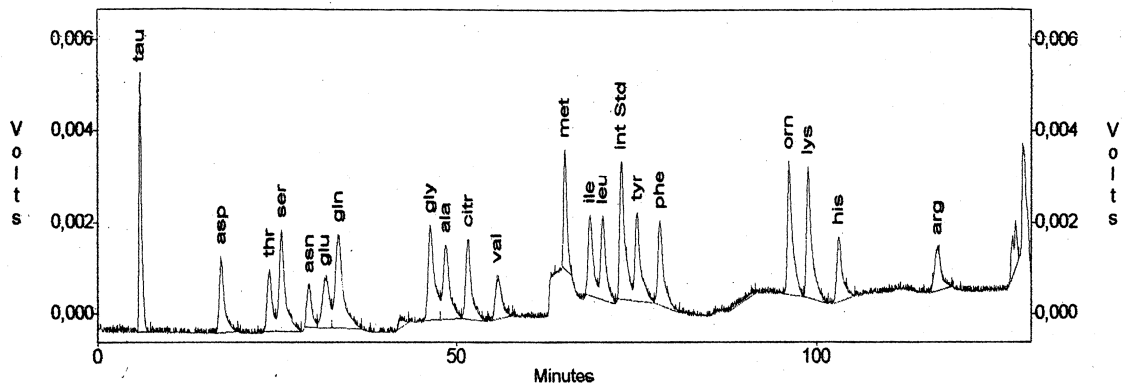


Abb. 10: Darstellung der Aminosäurenanalyse eines Testgemisches (Asn vorhanden)

Nachweisgrenze für Asn: 0,05 mg/dl

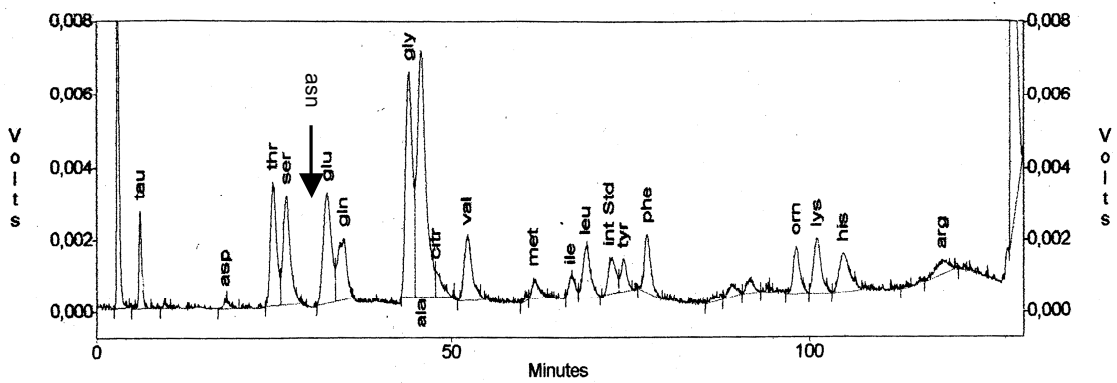


Abb. 11: Darstellung der Aminosäurenanalyse eines Patienten nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-ASNase (Depletion von Asn)

Nachweisgrenze für Asn: 0,05 mg/dl

3.5 Erstellung einer Methode zur Evaluierung der Asparaginepletion ex-vivo in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Als eventuelle Fehlerquelle bei der Interpretation von Asparaginkonzentrationen im Serum, gilt die möglicherweise noch nach der Blutentnahme bestehende Aktivität der Asparaginase, die zu falsch niedrigen Werten führen kann.

Um die Enzymaktivität zu stoppen werden die Blutproben üblicherweise direkt nach Entnahme auf Eis gestellt, zentrifugiert und bis zur Messung tiefgefroren.

Ein weiteres Verfahren, um die Enzymaktivität zu stoppen, ist der Zusatz von Asparaginase-Inhibitoren wie z.B. DONV (5-Diazo-4-oxo-L-norvalin), ein Asparaginabkömmling. Andere Asparaginanaloga, die auch zur Enzyminhibition eingesetzt werden können sind Asparaginsäure- β -semialdehyd (ASA) und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin. Werber et al. wiesen jedoch nach, dass sich das Absorptionsspektrum von DONV zum Teil mit dem von L-Asparagin besonders in niedrigen Nachweisbereichen überlagert und somit die exakte Bestimmung nicht möglich macht (Werber 1995).

Um mögliche Fehlerquellen bei der Interpretation der Asn-Konzentration durch Unterbrechung der Kühlkette (Temperaturerhöhung) berücksichtigen zu können, wurden insgesamt 4 Messreihen mit Serumproben unterschiedlicher PEG-Asparaginase-Konzentration in Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationszeit durchgeführt.

| Reihe | Inkubationszeit | Temperatur |
|-------|-----------------|----------------|
| 1 | Keine | Raumtemperatur |
| 2 | 120 min | Raumtemperatur |
| 3 | 90 min | 37°C |
| 4 | 150 min | 37°C |

Tab. 5: Testseren unterschiedlicher PEG-ASNase-Konzentration

Dargestellt sind Testseren bei unterschiedlicher Temperatur (Raumtemperatur~18°C und 37°C) sowie nach unterschiedlicher Inkubationszeit (keine = direkt nach Zugabe von PEG-ASNase-Konzentrationen, 90 min, 120 min und 150 min)

3.5.1 Herstellung eines Standard-Serums

Zur Herstellung eines Standard-Serums bekannter Asn-Konzentration wurde das Serum freiwilliger Testpersonen (Altersmedian 23,5 Jahre) gepoolt. Die Asn-Konzentration wurde mit dem Biochrom 20 Aminosäureanalyser nach der bereits beschriebenen Methode bestimmt und betrug 0,7 mg/dl (Normbereich 0,4 – 1,0 mg/dl).

Nach gründlicher Mischung und Bestimmung des Aminosäuregehalts wurde das Serum in Proben zu je 5ml (40 x 5ml) bei –20 °C eingefroren.

3.5.2 Herstellung eines mit PEG-Asparaginase angereicherten Serums

Dem Standard-Serum mit bekannter Asn-Konzentration (0,7 mg/dl) wurde PEG-Asparaginase (Oncaspar®) der Firma Medac GmbH, Hamburg zugesetzt. Hierzu wurden 100µl Oncaspar® zu 50ml Serum hinzugefügt.

Ausgehend von diesem so angereicherten Serum mit einer PEG-Asparaginase-Konzentration von 1500 IE/l wurden weitere Verdünnungsreihen hergestellt.

Die Festlegung dieser Konzentration basierte auf der hypothetisch erstellten physiologischen Konzentration von 3750 IE Oncaspar® bei einem Erwachsenen mit ca. 5l Blut. Hierbei ergibt sich eine Verdünnungskonzentration von 750 IE/l Blut. Die gewählte Ausgangskonzentration unseres Testserums von 1500 IE/l beträgt das Doppelte, so dass der physiologische Konzentrationsbereich sicher abgedeckt werden konnte.

Die Zugabe des Enzyms sowie das Aliquotieren in Proben zu je 2 ml wurden im Kühlraum bei –10°C im Eisbad vorgenommen, um somit eine vorzeitige Aktivierung der Asparaginase zu verhindern.

3.6 Photometrische Bestimmung der Asparaginase-Aktivität im Serum

Zusätzlich zu der Asn Konzentration im Serum und Liquor wurde die Enzymaktivität gemessen. Dies erfolgte in Kooperation mit dem Labor von Herrn Prof. Boos, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Kinderklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster, wo diese Messungen freundlicherweise für uns durchgeführt wurden.

Die photometrische Bestimmung der Enzym-Aktivität erfolgte über die Hydrolyse von L-Asparaginsäure- β -hydroxamat (AHA) bei 37°C. Asparaginase hydrolysiert AHA zu L-Aspartat und Hydroxylamin. Dieses kondensiert mit 8-Hydroxychinolin und oxidiert zu Indo-Oxin, das dann bei einer Wellenlänge von 710 nm photometrisch detektiert und quantifiziert werden kann. Die untere Nachweisgrenze mit dieser Methode liegt bei 2,5 IE/l Asparaginase. Die Variationskoeffizienten für diese Methode lagen für intra-Tages Variabilität bei 1,98 – 8,77% und für inter-Tages Variabilität bei 1,73 – 11% (*Lanvers et al. 2002*).

Verdünnungen für Kalibrationsgeraden

Es werden unterschiedliche Verdünnungen (50 IE/ml, 5 IE/ml, 0,5 IE/ml, 0,05 IE/ml) des entsprechenden Enzympräparates zur Erstellung von Kalibrationsgeraden erstellt. Somit werden die Kalibrationsbereiche von 2,5 – 1250 IE/l abgedeckt.

Richtigkeitskontrollen

Für PEG-ASNase wird eine Ampulle (750 IE/ml) 1:50 mit Plasma auf eine Konzentration von 15 IE/ml verdünnt (20 μ l PEG-ASNase + 980 μ l Leerplasma). 133,34 μ l dieser Verdünnung werden mit 19,867 ml Plasma gemischt (= 100 IE/l). Für die Richtigkeitskontrollen von 100 IE/l und 50 IE/l wird eine 20% +/--Abweichung von der Sollkonzentration toleriert.

3.7 Quantitative Bestimmung von Asparagin im Liquor mittels RP-HPLC (Labor Prof. Boos, Münster)

Das Labor der „Arbeitsgruppe für klinische Pharmakologie“ um Herrn Prof. Boos an der Wilhelms-Universität in Münster, das die Messungen der Asparaginase-Aktivität durchführte, nahm auch Messungen der Asn- Konzentration im Liquor vor, da die dort angewendete Methode eine niedrigere Nachweisgrenze von 0,2 μ M besaß.

Hierzu wurde eine Reverse-Phase- High performance liquid chromatography (RP-HPLC) Technik nach pre-column-Derivatisierung mit OPA eingesetzt. Die Fluoreszenz-Detektion nach Lenda & Svenneby (*Lenda & Svenneby, 1980*) wurde durch Boos et al. etwas modifiziert (*Boos et al., 1996*). Benutzt wurde ein HPLC-System von LKB, Bromma, Schweden mit einer Lithium Säule von Merck (LiChroCART250-4HPLC-Cartridge Li

Chospher 100 RP-18 endcapped). Die photometrische Detektion erfolgte mit λ_{ex} 340 und λ_{em} 450 nm.

Als Fließmittel über der Säule wurden ein 0,2 M Kaliumacetatpuffer (pH6) und Methanol verwendet, die mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,3 ml/min eingestellt waren.

Probenaufarbeitung

Das direkt nach Entnahme abzentrifugierte Serum wurde bis zur Deproteinisierung mit 10% Sulfosalicylsäure bei -20°C gelagert. Für die Analyse wurde 35 μl Probe mit 70 μl OPA versetzt und bei Raumtemperatur für 14 min derivatisiert, danach wurden 35 μl des Gemisches durch den Autosampler auf die HPLC-Säule gegeben.

Zur Systemkontrolle wurde 390 μl Standardhumanserum mit 10 μl Asparaginase gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 μl Sulfosalicylsäure wurde die Hydrolyse der Asn gestoppt. Das depletierte Serum (50 μl) wurde bei jeder Serie als Blindwert eingesetzt. Für die Richtigkeitskontrolle wurde das so deproteinisierte Serum mit 0,5 μM Asn gespikt.

4 Ergebnisse

4.1 Asparaginkonzentration unter PEG-Asparaginase unterschiedlicher Verdünnung in Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationszeit

Da es bei der Verarbeitung der Proben vom Zeitpunkt der Abnahme bis zum Verarbeiten dieser (Inaktivierung der Enzymaktivität mittels 10% Sulfosalizsäure) im Rahmen der Kühlkette zu möglichen Fehlerquellen kommen konnte, sollte evaluiert werden, welchen Einfluss längeres Stehen lassen der Proben auf die Asparaginkonzentration haben könnte.

Folgende Messreihen zur Bestimmung der Asparaginkonzentration in Abhängigkeit von Enzymkonzentration, sowie Zeit und Temperatur wurden durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.4.2. erläutert, basierte die Festlegung der Konzentration auf der zu erwartenden Asparaginkonzentration pro ml Blut. Dies entspricht $0,75 \text{ IE/ml} = 750 \text{ IE/l}$. Um den Bereich sicher abzudecken, wurde bei der ersten Versuchsreihe mit der doppelten der postulierten physiologischen Konzentration begonnen und von da an in 10er Schritten verdünnt.

Reihe 1:

| Probe | PEG-Konz. IE/l | Asn-Konz. mg/dl* |
|-------|----------------|------------------|
| 1 | 1500 | 0 |
| 2 | 750 | 0 |
| 3 | 150 | 0 |
| 4 | 15 | 0 |
| 5 | 1,5 | 0 |

Tab. 6: Asn-Konzentration bei Raumtemperatur / keine Inkubationszeit

*(Nachweisgrenze für Asn: $0,05 \text{ mg/dl}$)

Diese Proben wurden nicht inkubiert, sondern direkt nach Versetzen des Serums mit der ASNase und der Verdünnung gemessen. Alle Verdünnungen zeigte eine sofortige Depletion, so dass durch längeres Stehen lassen der Proben kein falsches niedriges Ergebnis zu erwarten ist. Somit galt es herauszufinden, ab welchen Konzentrationen

Asparagin nicht mehr depletiert würde und welchen Einfluss eine längere Inkubation auf die Asparaginkonzentration hat.

In Verdünnungsreihe 2 wurde bei einer Konzentration 15 IE/l begonnen, also ein Fünzigstel der postulierten physiologischen Konzentration. Diese war auch schon in der ersten Versuchsreihe sofort depletiert, so dass bei längerer Inkubation keine weitere Senkung der Asn-Konzentration zu erwarten war. Erst niedrigere Verdünnungen zeigten messbare Asn-Spiegel nach 120 min Inkubation bei Raumtemperatur, d.h. es ist davon auszugehen, dass diese auch direkt nach Zusatz der Asparaginase nicht depletiert waren (Tabelle 6 & 7). Lediglich die Probe mit 1,5 IE/l ASNase war direkt nach Zugabe des Enzyms depletiert, nach 120 min Inkubation war jedoch ein Asn-Spiegel von 0,2 mg/dl messbar. Es handelt es sich hierbei allerdings um eine so niedrige Asparaginase-Konzentration (ein Fünfhundertstel der postulierten physiologischen Verdünnung), dass es wahrscheinlich zu Schwankungen bei den Messungen kommen kann.

Reihe 2:

| Probe | PEG-Konz. IE/l | Asn-Konz. mg/dl* |
|-------|----------------|------------------|
| 1 | 15 | 0 |
| 2 | 1,5 | 0,2 |
| 3 | 0,15 | 1 |
| 4 | 0,015 | 1,7 |
| 5 | 0,0015 | 1,6 |
| 6 | 0,00015 | 1,6 |

Tab. 7: Asn-Konzentration bei Raumtemperatur / 120 min Inkubationszeit

*(Nachweisgrenze für Asn: 0,05 mg/dl)

Zwei weitere Messreihe wurden mit den selben Verdünnungen wie in Reihe 2 bei 37°C durchgeführt und 90 min bzw. 150 min inkubiert. Diese Messreihen simulieren Körpertemperatur. Sie sollten darstellen, ob die Erhöhung der Temperatur einen Effekt auf die Asparaginase-Aktivität hat. Auch Konzentrationen von 1,5 IE/l führen hier noch zu einer Depletion. Dies ist auch bei längerer Inkubation bei einer Verdünnung von

0,15 IE/l der Fall, was die angekurbelte Enzymwirkung bei Körpertemperatur erklärt. Die beiden letzten Messreihen spielen jedoch im Hinblick auf die Evaluation möglicher Fehlerquellen durch Unterbrechung bzw. nicht Einhalten der Kühlung eine untergeordnete Rolle.

Insgesamt kann man also aus den dargestellten Messreihen schließen, dass bei der anzunehmenden physiologischen Verdünnung des Asparagins durch unzureichendes Kühlen (Stoppen der Enzymaktivität) falsch negative Ergebnisse unwahrscheinlich sind. Um dennoch Fehlerquellen ausschließen zu können, sollten die Proben möglichst ohne Unterbrechung der Kühlkette transportiert und direkt nach dem Auftauen verarbeitet werden.

Reihe 3:

| Probe | PEG-Konz. IE/l | Asn-Konz. mg/dl* |
|--------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | 15 | 0 |
| 2 | 1,5 | 0 |
| 3 | 0,15 | 0,1 |
| 4 | 0,015 | 0,6 |
| 5 | 0,0015 | 0,7 |

Tab. 8: Asn-Konzentration bei 37°C / 90 min Inkubationszeit

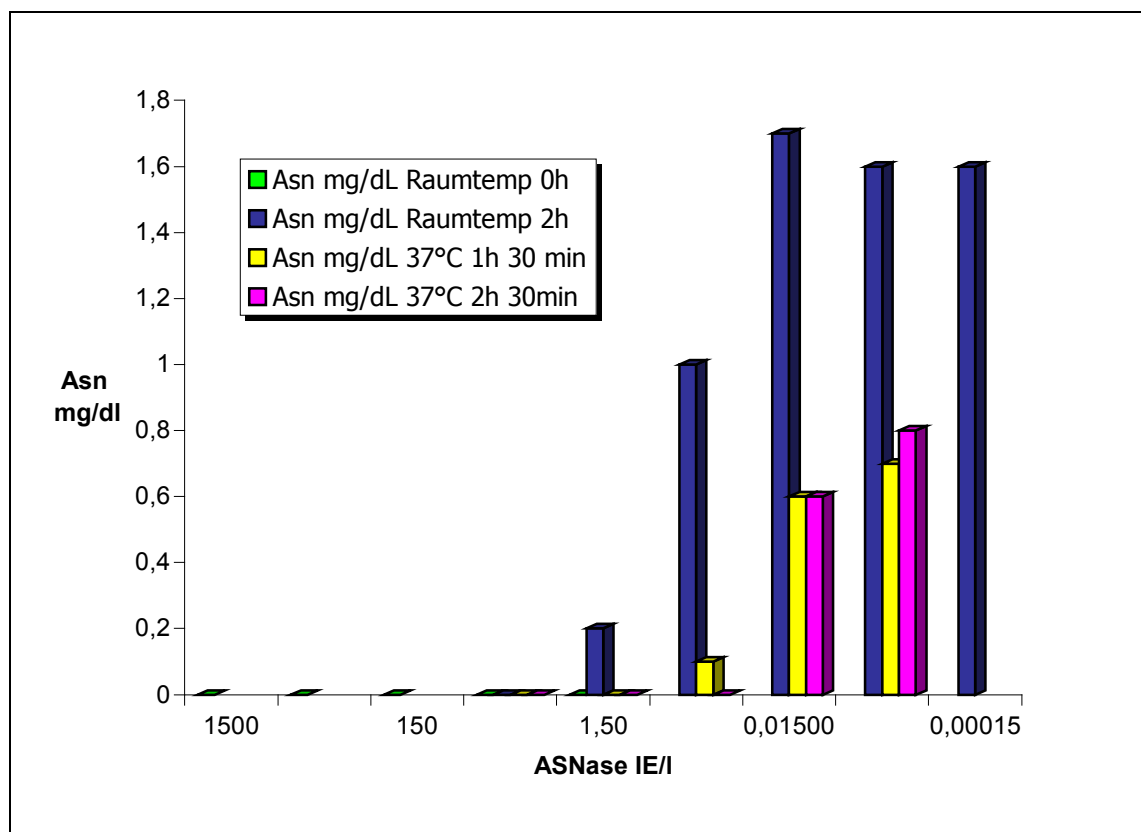
*(Nachweisgrenze für Asn: 0,05 mg/dl)

Reihe 4:

| Probe | PEG-Konz. IE/I | Asn-Konz. mg/dl* |
|-------|----------------|------------------|
| 1 | 15 | 0 |
| 2 | 1,5 | 0 |
| 3 | 0,15 | 0 |
| 4 | 0,015 | 0,6 |
| 5 | 0,0015 | 0,8 |

Tab. 9: Asn-Konzentration bei 37°C / 150 min Inkubationszeit

*(Nachweisgrenze für Asn: 0,05 mg/dl)

**Abb. 12: Abhängigkeit von Zeit und Temperatur bei Serumproben mit Asparaginase unterschiedlicher Konzentration (1500 IE/I bis 0,00015 IE/I)**

4.2 Patientenkollektiv

In der Zeit zwischen Mai 2000 und Dezember 2001 wurden insgesamt 71 Kinder mit ALL (38 Jungen und 33 Mädchen) aus 10 COALL-assoziierten Krankenhäusern (siehe Liste im Anhang) in die Studie aufgenommen.

Voraussetzung hierfür war die Registrierung und Behandlung nach dem Studienprotokoll COALL-06-97, sowie die schriftliche Einverständniserklärung der Eltern. Kinder mit einer allergischen Reaktion auf native E. coli Asparaginase waren von der Studie ausgeschlossen.

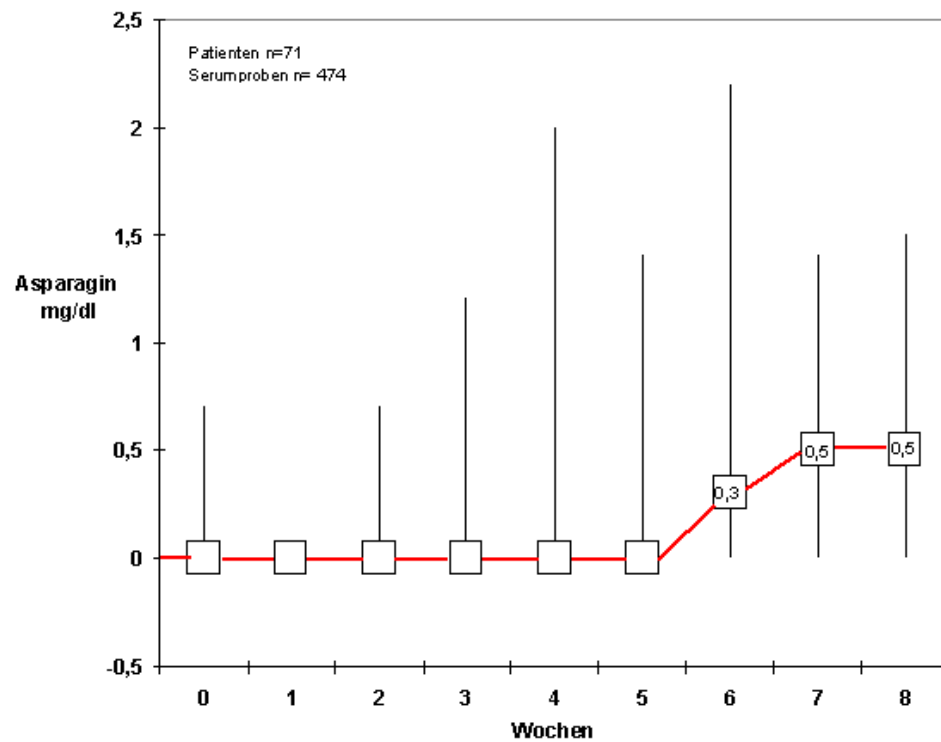
Die Altersverteilung lag zwischen 1 Jahr und 7 Monaten und 15 Jahren (Median 4 Jahre und 5 Monate).

36 Patienten wurden nach dem Low Risk-Protokoll, 35 Patienten nach dem High Risk-Protokoll stratifiziert und behandelt.

PEG-Asparaginase wurde als 2h-Infusion verabreicht, wobei ein Zehntel der Infusion innerhalb der ersten Stunde gegeben wurde.

4.3 Asparaginkonzentration im Serum nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

Insgesamt wurden 474 Serumproben von 71 Patienten analysiert (240 Serumproben von 36 LR-Patienten und 234 Serumproben von 35 HR-Patienten). 2 LR-Patienten und 9 der HR-Patienten hatten messbare Asn Spiegel vor Gabe der 2500 IE/m² PEG-ASNase. Die bei den übrigen Patienten nachweisbare Asn-Depletion ist auf die ca. 3 Wochen früher gegebene native C-ASNase zurückzuführen (2 Gaben im LR-Protokoll und 3 Gaben im HR-Protokoll).



| | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Höchstwerte Asn | 0,7 | 0 | 0,7 | 1,2 | 2,0 | 1,4 | 2,2 | 1,4 | 1,5 |
| Tiefstwerte Asn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Median | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0,5 | 0,5 |

Abb. 13: Asparaginkonzentration im Serum.

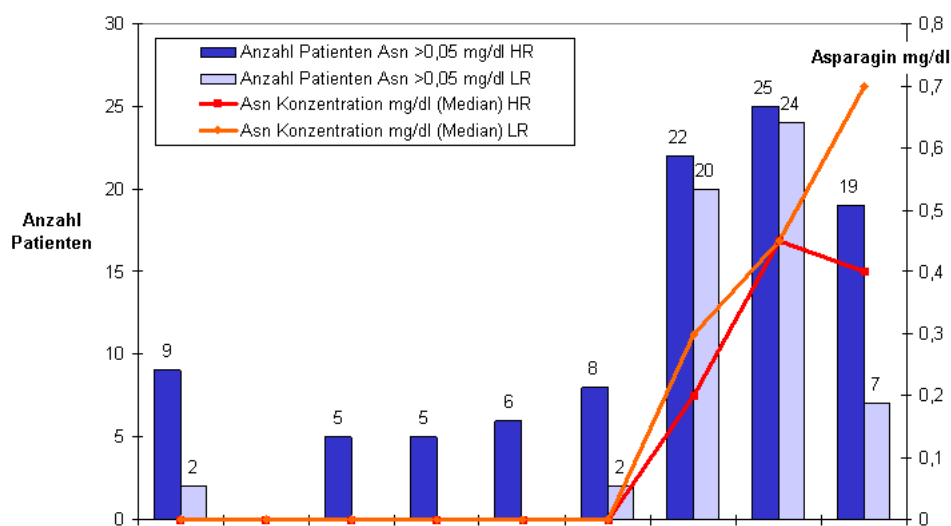
Dargestellt ist die Serumasparaginkonzentration in mg/dl nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.. Die Kästchen stehen für die Medianwerte, Striche geben den Höchstwert zum jeweiligen Zeitpunkt an. Die rote Linie gibt den Verlauf der Asn Spiegel an (Median).

Abbildung 13 zeigt den Verlauf der Asparaginkonzentration nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.. Erst in Woche 6 steigt der Medianwert der Asparaginkonzentration in messbare Bereiche > 0,05 mg/dl.

Keiner der LR-Patienten zeigte messbare Asn-Spiegel während der ersten 5 Wochen, wohingegen bei 5 von 28 HR-Patienten bereits 2 Wochen nach PEG-Gabe messbare Spiegel nachweisbar waren (Abbildung 14 & 15). Diese Patienten zeigten später auch rasch abfallende Asparaginase-Aktivitäten innerhalb der ersten 2-4 Wochen (siehe Abb.

22). Drei von 10 LR-Patienten hatten 8 Wochen nach PEG-Asparaginasegabe keine messbaren Asn-Spiegel (*Abb. 14*).

6 von 26 HR-Patienten zeigten messbare Asn-Spiegel in Woche 4, 8 von 27 in Woche 5 und bei 22 von 32 Patienten dieser Gruppe waren Asn-Spiegel $>0,05$ mg/dl 6 Wochen nach Gabe nachweisbar.

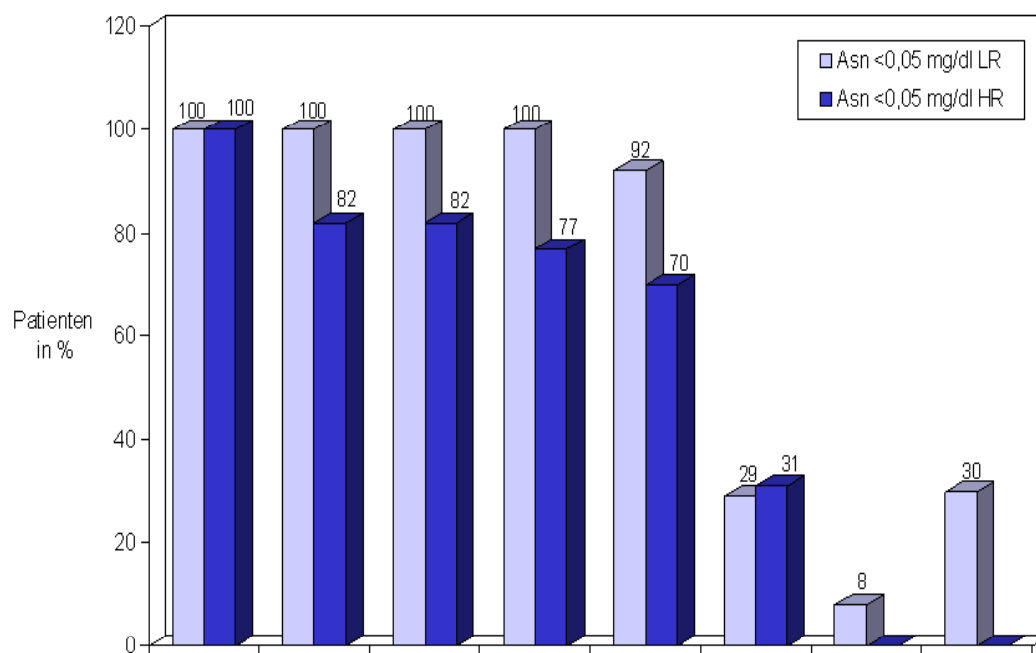


| Wochen nach Gabe | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|------|-----|
| HR Patienten | 22 | 27 | 28 | 28 | 26 | 27 | 32 | 25 | 19 |
| LR Patienten | 26 | 30 | 31 | 30 | 33 | 26 | 28 | 26 | 10 |
| Asn Konzentration in mg/dl HR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,45 | 0,4 |
| Asn Konzentration in mg/dl LR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0,45 | 0,7 |

Abb. 14: Verlauf der Asn-Konzentration im Serum nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

Die Darstellung zeigt den Verlauf der Asn-Konzentration (Median) bei High und Low Risk Patienten im COALL-97-Protokoll (rote und orange Linien) getrennt. Außerdem zeigt die Darstellung die Anzahl der Patienten mit Asn-Konzentrationen $>0,05$ mg/dl zum jeweiligen Zeitpunkt nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-ASNase (hell- und dunkelblaue Balken).

Dennoch zeigen 92% der Low Risk Patienten und 70% der High Risk Patienten eine ausreichende Asparaginepletion $< 0,05$ mg/dl bis einschließlich 5 Wochen nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase (*Abb. 15*).



| Wochen nach Gabe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Anzahl Patienten HR | 27 | 28 | 28 | 26 | 27 | 32 | 25 | 19 |
| Anzahl Patienten LR | 30 | 31 | 30 | 33 | 26 | 28 | 26 | 10 |

Abb. 15: Prozentsatz der Patienten mit einer Asn-Depletion im Serum

Getrennte Darstellung der HR- und LR-Patienten (dunkel- und hellblaue Balken) in % mit Asn Spiegeln < 0,05 mg/dl im Serum (Depletion) nach 2500 IE/m² PEG-ASNase.

4.4 Asparaginkonzentration im Liquor nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

Es wurden 173 Liquorproben von 58 Patienten analysiert. 84 Liquorproben stammten von insgesamt 29 HR-Patienten und 89 Proben von 29 LR-Patienten. Zum Zeitpunkt der Asparaginase-Gabe war lediglich im LR-Protokoll eine Lumbalpunktion zur intrathekalen Gabe von MTX vorgesehen, so dass zu diesem Zeitpunkt lediglich Daten aus dem LR-Protokoll vorliegen. In allen 10 erhältlichen Liquorproben lag Asparagin unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05 mg/dl. Bei 3 HR-Patienten war zu diesem Zeitpunkt eine Lumbalpunktion außerhalb des Protokolls vorgenommen worden, so dass hierbei Material gewonnen und analysiert werden konnte.

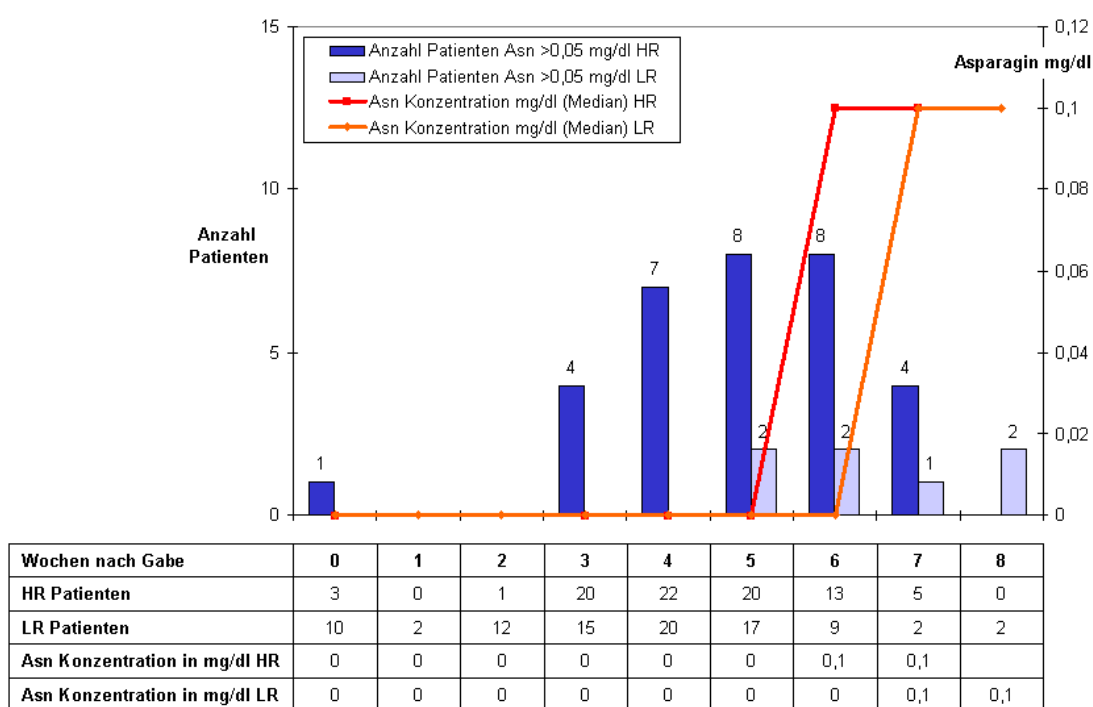
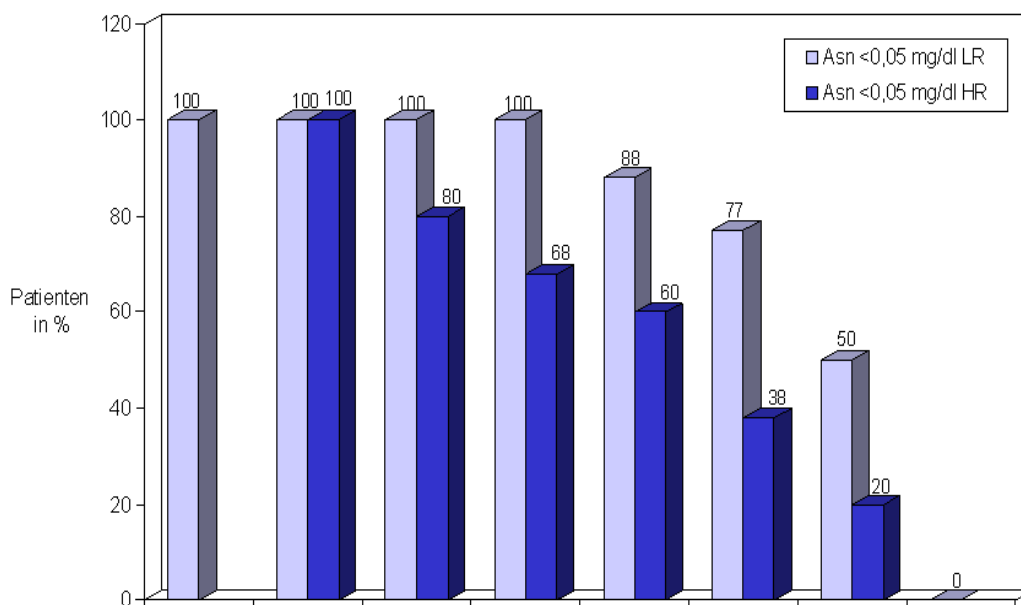


Abb. 16: Verlauf der Asn-Konzentration im Liquor nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

Getrennte Darstellung der Asn-Konzentrationen (Median) im Liquor bei High und Low Risk Patienten im COALL-97-Protokoll (rote und orange Linien), sowie Darstellung der Anzahl Patienten mit Asn-Konzentrationen >0,05 mg/dl zum jeweiligen Zeitpunkt nach Gabe (hell- und dunkelblaue Balken).

Einer von 3 Patienten zeigte nachweisbare Asn-Spiegel. Bis einschließlich 4 Wochen nach Gabe der PEG-ASNase waren alle LR-Patienten depletiert. Erst in Woche 5 zeigten 2 von 17 Patienten (12%) wieder nachweisbare Asn-Spiegel. Hingegen waren in 4 von 20 (20%) der HR-Patienten bereits nach 3 Wochen wieder messbare Spiegel nachweisbar. Diese Patienten waren dieselben, die auch in den Serumproben rasch (Woche 2) wieder nachweisbare Asn-Spiegel hatten, sowie rasch abfallende ASNase-Aktivitäten zeigten (*siehe Abb. 14 & 22*). (Nach 4 Wochen zeigten 32% (7/22) und nach 5 Wochen 40% der HR-Patienten (8/20) Asn-Konzentrationen >0,05 mg/dl (*Abb. 16*).

Abbildung 17 zeigt, dass sowohl HR- als auch LR-Patienten auch im Liquor eine ausreichende Depletion < 0,05 mg/dl bis 5 Wochen nach Gabe der PEG-ASNase aufweisen.



| Wochen nach Gabe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------|---|----|----|----|----|----|---|---|
| Anzahl Patienten HR | 0 | 1 | 20 | 22 | 20 | 13 | 5 | 0 |
| Anzahl Patienten LR | 2 | 12 | 15 | 20 | 17 | 9 | 2 | 2 |

Abb. 17: Prozentsatz der Patienten mit einer Asn-Depletion im Liquor

Getrennte Darstellung der HR- und LR-Patienten (dunkel- und hellblaue Balken) in % mit Asn Spiegeln < 0,05 mg/dl im Liquor.

Abbildung 18 zeigt noch einmal die Ergebnisse für Asparagin im Serum und Liquor gemeinsam. Insgesamt zeigen 5 Wochen nach Administration von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase 81% der Patienten eine Depletion < 0,05 mg/dl im Serum und 73% im Liquor.

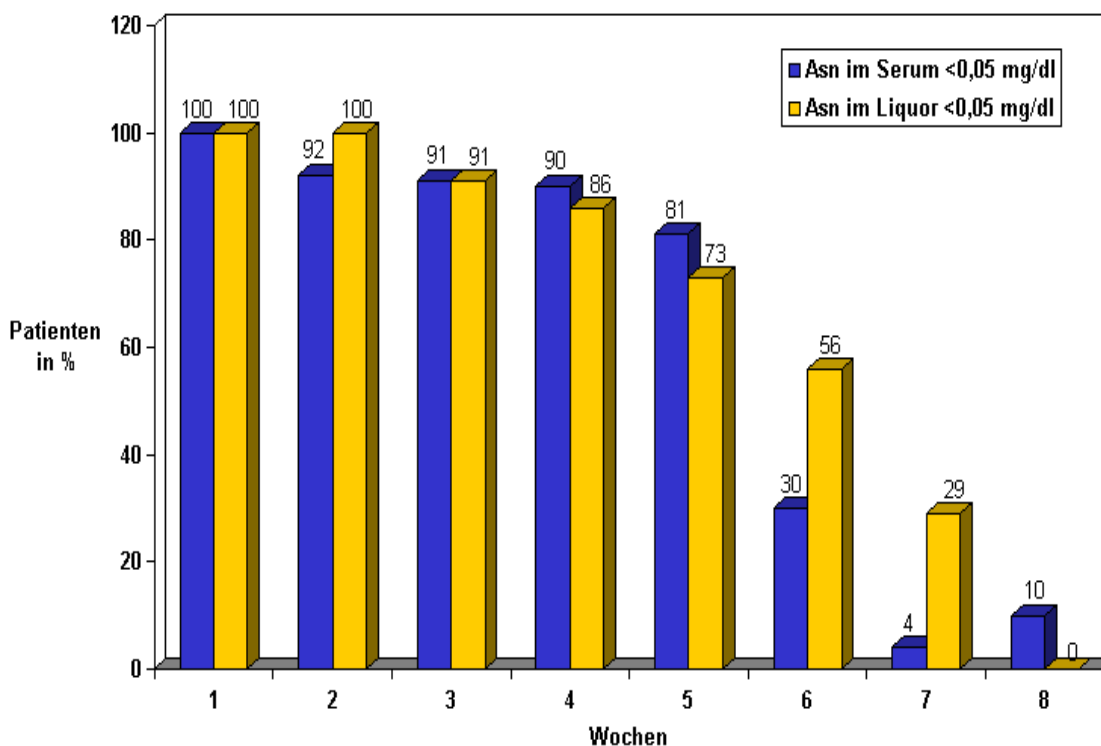


Abb. 18: Prozentsatz der Patienten mit einer Asparagindepletion im Serum und Liquor nach 2500 IE/m² PEG-ASNase.

Als Asn-Depletion wurden Asparaginkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05 mg/dl gewertet.

Da die verwendete Methode zum Nachweis von Aminosäuren mittels Ionenaustauschchromatographie eine relativ hohe Nachweisgrenze hatte, wurden die Liquorproben ebenso wie die Asparaginase-Aktivität in dem Labor von Herrn Prof. Boos, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Kinderklinik an der Universität Münster gemessen. Die Nachweisgrenze der dort angewandten Methode (RP-HLPC mit OPA) betrug 0,2 µM. Hierfür standen 184 Liquorproben von 59 Patienten zur Verfügung. Vor Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase waren ebenso wie bei den Messungen in Hamburg 10 Liquorproben zur Analyse erhältlich. Die mediane Asparaginkonzentration

bis zu 4 Tagen vor Gabe betrug $1,5 \mu\text{M}$ ($<0,2 - 5,3 \mu\text{M}$). Mediane Asparaginkonzentrationen nach 2, 3, 4 und 5 Wochen waren $<0,2 \mu\text{M}$, $0,2 \mu\text{M}$, $0,9 \mu\text{M}$ und $3,2 \mu\text{M}$. In 28 Liquorproben, die 6 Wochen oder später nach Gabe abgenommen wurden betrug die mediane Asn-Konzentration $5,1 \mu\text{M}$ ($0,4 - 17,1 \mu\text{M}$) (Abb. 19).

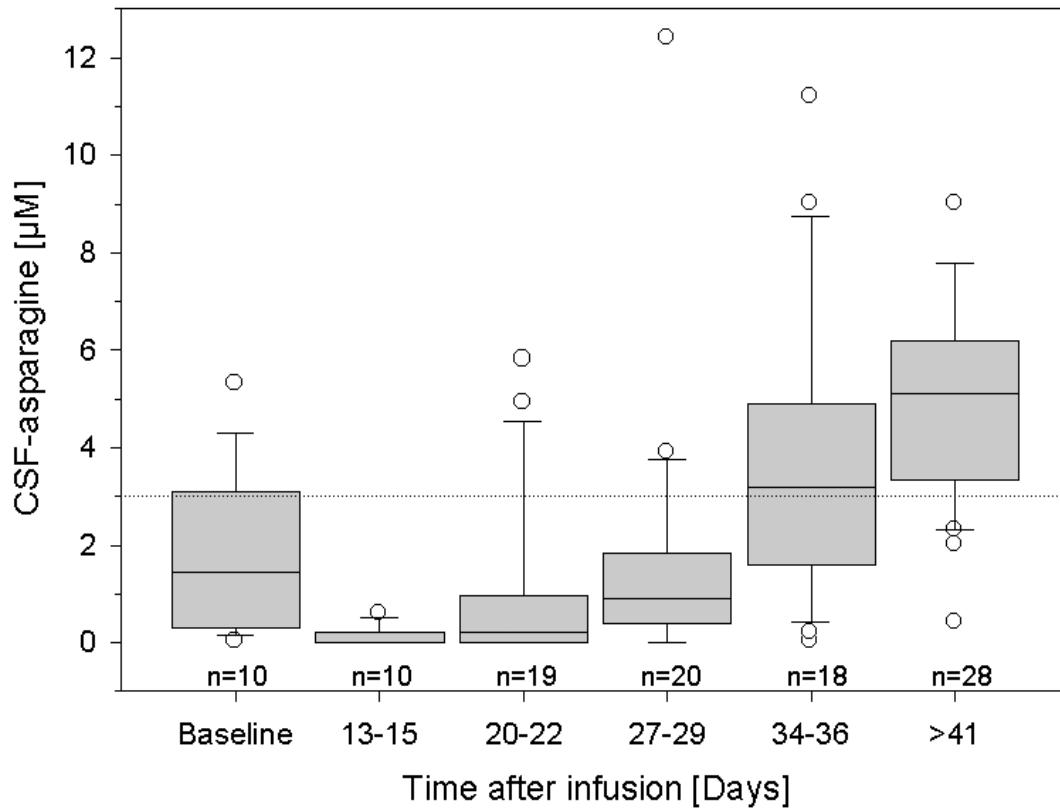


Abb. 19: Mediane Liquorkonzentration von Asn im Liquor nach 2500 IE/m^2 PEG-ASNase

Mediane Liquorkonzentrationen dargestellt als Boxplots in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von 2500 IE/m^2 KOF PEG-Asparaginase i.v. Die Boxplots zeigen die 25. – 75. Perzentile, der darin enthaltene Strich den Median, die Striche nach oben bzw. unten geben die 90., bzw. 10. Perzentile an; Kreise geben außerhalb dessen gelegene Werte an.

Die gestrichelte Linie bei $3 \mu\text{M}$ deutet den unteren Bereich der normalen Asn-Konzentration ($3,23-7,5 \mu\text{M}$) im Liquor bei Kindern an entsprechend den Untersuchungen von Gerrits et al. 1989 (n gesamt = 105, da gepoolte Boxplots, d.h. Proben zwischen den angegebenen Tagen wurden nicht erfasst). Mit freundlicher Genehmigung von Vieira Pinheiro & Boos et al.

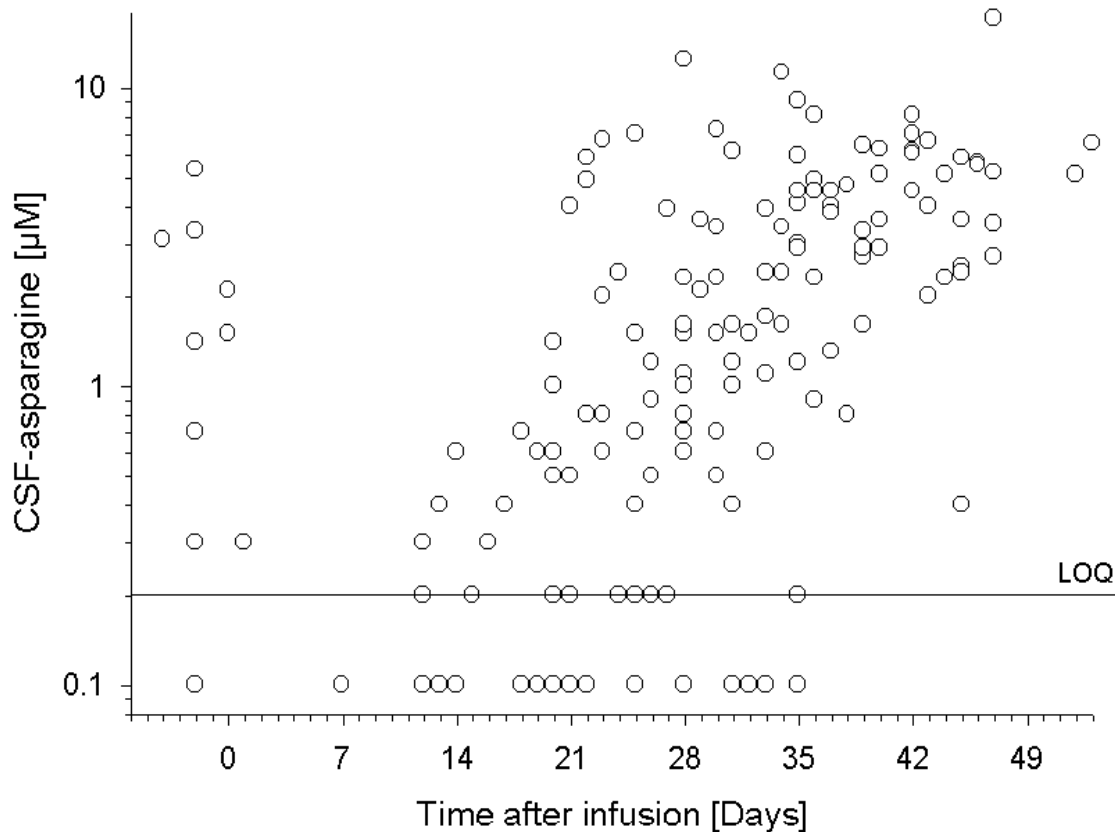


Abb. 20: Asparaginkonzentrationen im Liquor in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

mit freundlicher Genehmigung Vieira Pinheiro & Boos et al.

4.5 Asparaginase-Aktivität nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

Es wurden insgesamt 459 Serumproben von 67 Patienten analysiert. Die mediane Asparaginase-Aktivität betrug 1 Woche nach Administration von 2500 IE/m² 1189,5 IE/l (<2,5 – 2949 IE/l, 48 Proben), 2 Wochen nach Gabe 824 IE/l (<2,5 – 1502 IE/l, 44 Proben), 3 Wochen nach Gabe 310 IE/l (<2,5 – 653 IE/l, 40 Proben), 4 Wochen nach Administration 41 IE/l (<2,5 – 163 IE/l, 39 Proben) und 5 Wochen danach waren es 4 IE/l (<2,5 – 22 IE/l, 31 Proben).

In allen 117 Serumproben, die nach dem Zeitraum von 5 Wochen (>42 Tage) nach PEG-Gabe abgenommen und analysiert wurden lag die Asparaginase-Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze von 2,5 IE/l (Abb. 21).

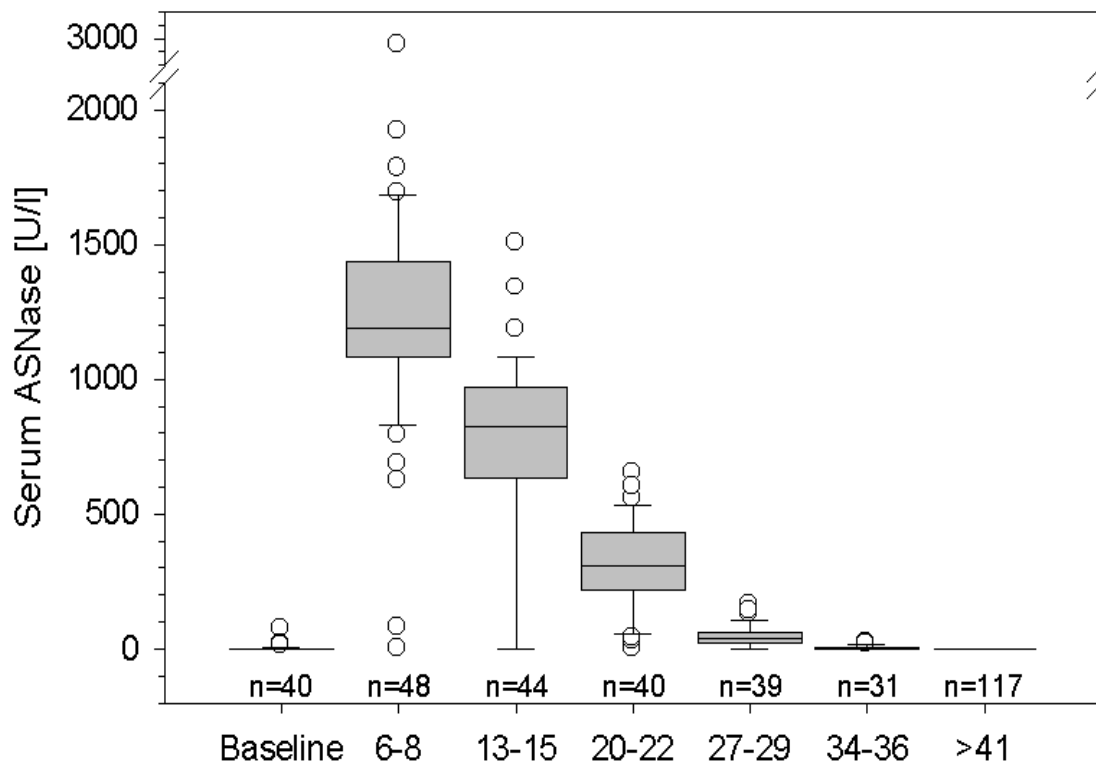


Abb. 21: Mediane Asparaginase-Aktivität im Serum nach 2500 IE/m² PEG-ASNase i.v.

Mediane Asparaginase-Aktivität im Serum dargestellt als Boxplots in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von 2500 IE/m² KOF PEG-Asparaginase. Die Boxplots zeigen die 25. – 75. Perzentile, der darin enthaltene Strich den Median, die Striche nach oben bzw. unten geben die 90., bzw. 10. Perzentile an; Kreise geben außerhalb dessen gelegene Werte an. (n gesamt = 359, da gepoolte Boxplots, d.h. Proben zwischen den angegebenen Tagen wurden nicht erfasst)

mit freundlicher Genehmigung Vieira Pinheiro & Boos et al.

Die mediane Asparaginase Aktivität vor PEG-Gabe war <2,5 IE/l (<2.5-71 IE/l; 40 Proben). In 30 von 40 Proben war keine Aktivität messbar. 10 Proben wiesen nachweisbare Aktivitäten >2,5 IE/l bis max. 71 IE/l nach, was, wie bereits bei den Ergebnissen der Serumdaten erwähnt wurde, auf die vorherigen E. coli Gaben zurückzuführen ist. Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Aktivität. Hierbei ist in einigen

Fällen ein rascher Aktivitätsabfall innerhalb der ersten 2-4 Wochen zu verzeichnen. Hierbei handelt es sich um dieselben Patienten aus dem HR-Protokoll, die früh wieder messbare Asn-Spiegel im Serum und Liquor aufwiesen (siehe Abb. 14 & 16).

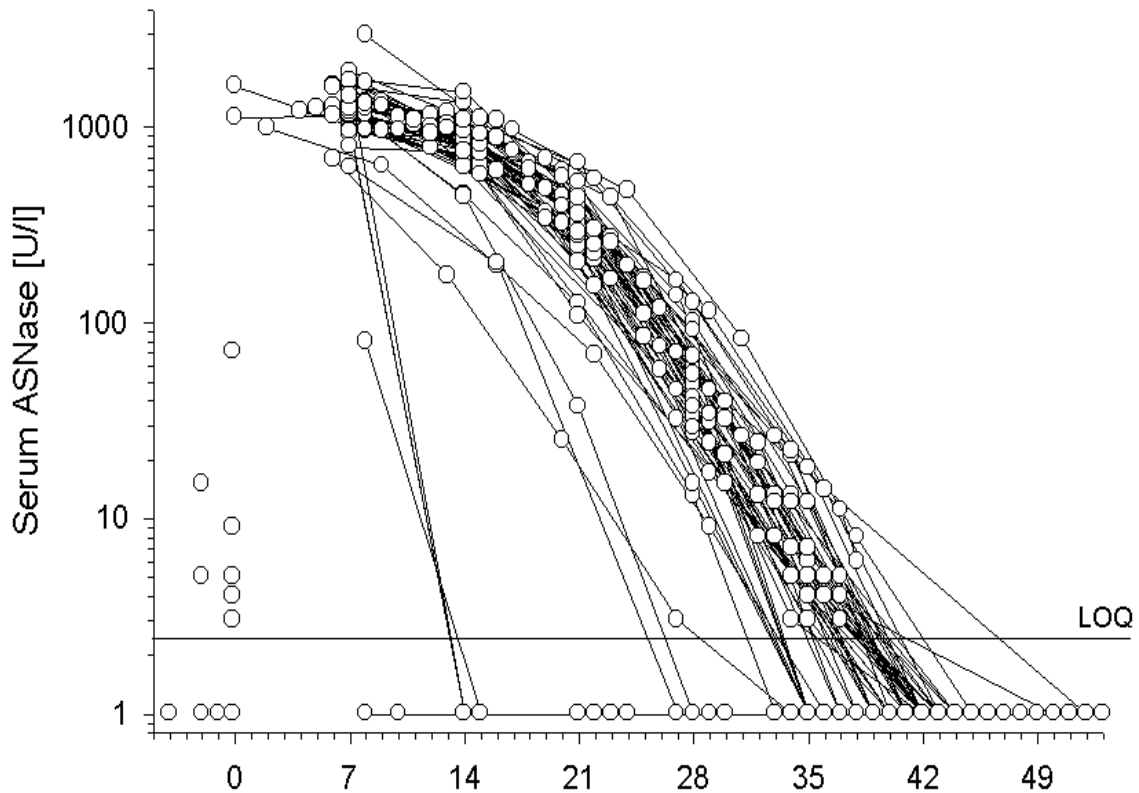
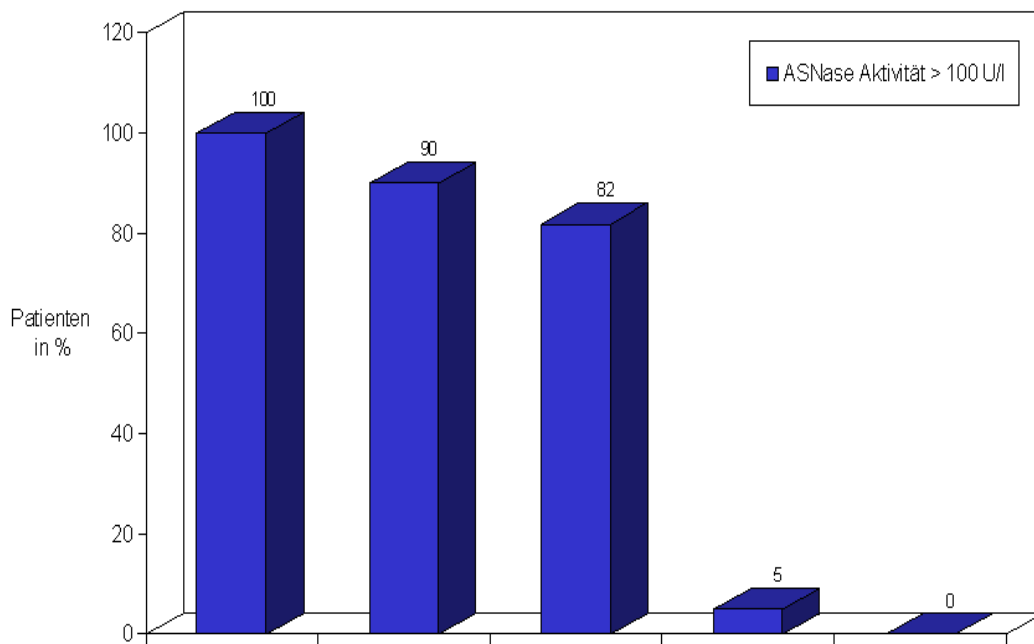


Abb. 22: Asparaginase Aktivität im Serum nach 2500 IE/m² PEG-ASNase

Logarithmische Darstellung der Asparaginase-Aktivitätsverläufe im Serum in Abhängigkeit von der Zeit nach Gabe von 2500 IE/m² KOF PEG-Asparaginase i.v.. Aufgrund der Zweidimensionalität kommt es zu Überlagerungen einzelner Kreis bei gleichen Werten.

mit freundlicher Genehmigung Vieira Pinheiro & Boos et al.

Eine Asparaginase-Aktivität >100 IE/l wurde in 61 von 61 Proben (100%) nach einer Woche, in 55 von 61 Proben (90%) nach 2 Wochen, in 42 von 50 Proben (82%) nach 3 Wochen, in 2 von 37 Proben (5%) nach 4 Wochen und in keiner von 61 Proben 5 Wochen nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase, wie in Abbildung 23 dargestellt, beobachtet.



| Wochen nach Gabe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------|----|----|----|----|----|
| Anzahl Patienten | 61 | 61 | 50 | 37 | 61 |

Abb. 23: Prozentsatz der Patienten mit einer Asparaginase-Aktivität >100 IE/l nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v.

4.6 Asparaginkonzentration im Liquor in Relation zu Asparaginase-Aktivität nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase

Bei einigen Liquorproben war eine Korrelation zu der Asparaginase-Aktivität im Serum des selben Entnahmetages möglich. Hierbei zeigte sich, dass bei niedrigen Asparaginase-Aktivitäten <2,5 – 100 IE/l nachweisbare Asn Spiegel mit einem Median von 1.2 μM (range: <0,2-9,0 μM ; 32 Proben) messbar waren. Wohingegen höhere Asparaginase-Aktivitäten >100 IE/l niedrige bzw. nicht nachweisbare Asparaginkonzentrationen von <0.2 μM (range: <0.2-0.8 μM ; 27 Proben) zur Folge hatten (Abb. 24).

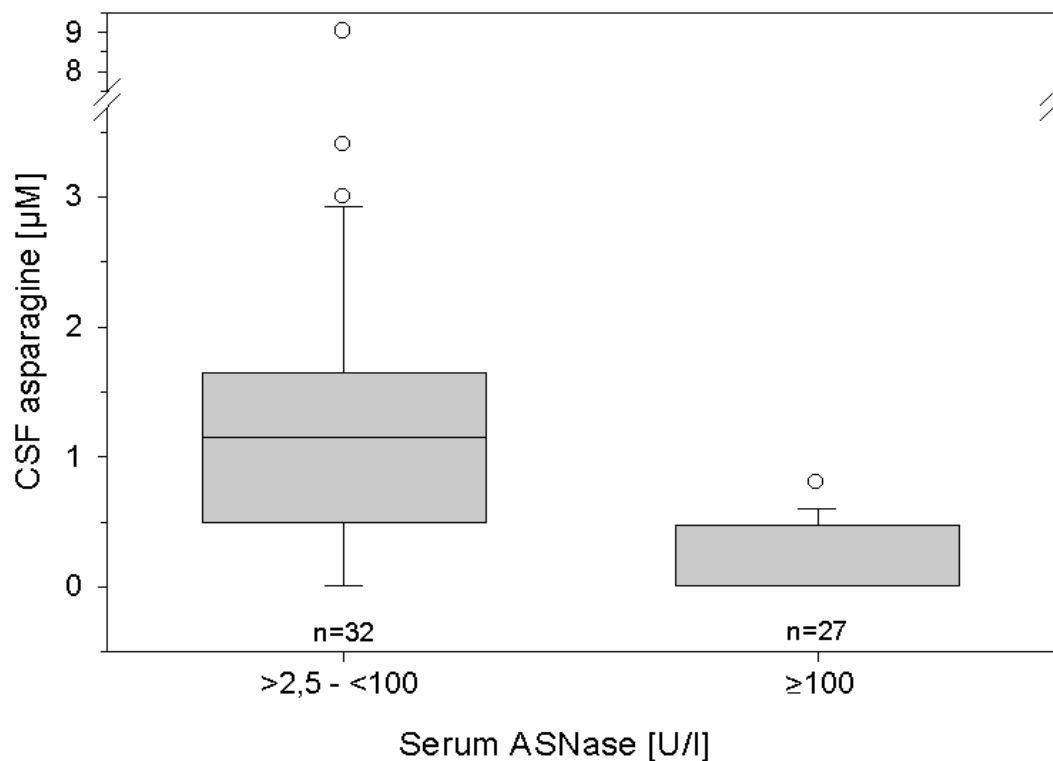


Abb. 24: Asparaginkonzentration im Liquor in Relation zu Asn- Aktivität im Serum

Asparaginkonzentration im Liquor in Relation zu Asn- Aktivität im Serum des selben Tages nach 2500 IE/m² PEG-ASNase. Die Boxplots zeigen die 25. – 75. Perzentile, der darin enthaltene Strich den Median, die Striche nach oben bzw. unten geben die 90., bzw. 10. Perzentile an; Kreise geben außerhalb dessen gelegene Werte an.

mit freundlicher Genehmigung Vieira Pinheiro & Boos et al.

Die folgende Tabelle zeigt den Verlauf der Asparaginkonzentration bei jeweiligen Asparaginase-Aktivitäten zum selben Zeitpunkt nach Administration der PEG-ASNase.

| Tag nach Gabe | Serum ASNase (IE/l) Median (range) | Asn im Liquor (μM) Median (range) |
|----------------------|---|--|
| Vor Gabe | < 2,5 (<2,5 – 71) | 1,5 (<0,2 – 5,3) |
| 7 \pm 1 | 1189 (<2,5 – 2949) | keine Abnahme |
| 14 \pm 1 | 824 (<2,5 – 1502) | < 0,2 (<0,2 – 0,6) |
| 21 \pm 1 | 310 (<2,5 – 653) | 0,2 (<0,2 – 5,8) |
| 28 \pm 1 | 41 (<2,5 – 163) | 0,9 (<0,2 – 12,4) |
| 35 \pm 1 | 4 (<2,5 – 22) | 3,2 (<0,2 – 11,2) |
| \geq 42 | < 2,5 | 5,1 (<0,2 – 17,1) |

Tab. 10: Asparaginkonzentration im Liquor in Bezug zur ASNase-Aktivität.

Überschüssiges Material aus den Liquorproben wurde zur Messung von Asparaginase Aktivität im Liquor verwendet. In allen 111 verfügbaren Proben von 39 Patienten war die mediane Asparaginase-Aktivität unterhalb der nachweisbaren Grenze von 2,5 IE/l.

4.7 Asparaginkonzentration im Serum nach 45 000 IE/m² E. Coli-Asparaginase i.v. in dem COALL-Protokoll-05-92

Zum Vergleich mit den aktuell in dieser Arbeit erhobenen Daten standen Daten aus einer früheren Arbeit (bisher nicht veröffentlicht) zur Verfügung. Hierbei waren Daten im Rahmen des COALL-Protokoll-92 erhoben worden, die jedoch im Gegensatz zu der aktuellen Studie zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen worden waren.

Es standen insgesamt 350 Serumproben von 51 Patienten zum Vergleich zur Verfügung. Hiervon stammten 123 Proben von 19 LR Patienten: 27 Proben von 11 Patienten nach der ersten Gabe C-ASNase, 21 Proben von 11 Patienten nach der zweiten Gabe, 36 Proben von 11 Patienten nach der dritten Gabe und 39 Proben von 11 Patienten während der Reinduktion nach der vierten Gabe C-ASNase. Von 32 HR Patienten standen insgesamt 227 Proben zur Verfügung: 20 Proben von 13 Patienten nach der ersten Gabe C-ASNase, 67 Proben von 21 Patienten nach der zweiten Gabe, 22 Proben von 10 Patienten nach der dritten Gabe, 58 Proben von 16 Patienten nach der vierten Gabe und 26 Proben von 13 Patienten nach der fünften Gabe während der Reinduktion und 34 Proben von 8 Patienten nach der sechsten Gabe während der Reinduktion.

Vor der Gabe von 45 000IE/m² C-ASNase lag der mediane Asparaginspiegel bei 6 mg/l (n=20). Bei 4 von 20 Patienten war kein Asn messbar (<0,05 mg/dl). Alle vier Patienten waren HR Patienten und hatten vorher 4 bis 6 mal C-ASNase erhalten.

Insgesamt lag der Asparaginspiegel im Median mindestens 5 Wochen unterhalb der Nachweisgrenze. Erst in Woche 6 war wieder ein messbarer Spiegel nachweisbar. Nach 7 Wochen lag die Asn-Konzentration bei 0,5 mg/dl. Zwei Drittel der Patienten (17/26, 65%) zeigten bis zu 5 Wochen nach Administration von 45 000 IE/m² C-ASNase eine Depletion. Einige der Patienten hatten kurz nach der Exposition wieder messbare Asn-Spiegel. Bei drei Patienten wurden bereits nach 1 Woche wieder messbare Spiegel erreicht (1 LR Patient nach der vierten Gabe C-ASNase und 2 HR Patienten ebenfalls nach der vierten Gabe). Nur 4 LR-Patienten hatten messbare Asparaginkonzentrationen innerhalb der ersten 3 Wochen (ein LR Patient (4. Gabe) nach 1 Woche, zwei (2. Gabe) nach 2 Wochen und 1 Patient (3. Gabe) nach 3 Wochen). Wohingegen bei 18 HR Patienten Spiegel >0,05 mg/dl während dieser Zeit nachweisbar waren. Zwei der HR Patienten (4. Gabe) hatten bereits 1 Woche nach C-ASNase nachweisbare Spiegel, 6

Patienten (2 nach der 4. Gabe, 4 nach der 3. Gabe) 2 Wochen nach C-ASNase und 10 Patienten 3 Woche nach C-ASNase.

4.8 Vergleich von 45 000 IE/m² nativer E. Coli Asparaginase i.v. mit 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v. in den COALL-Protokollen 92 und 97

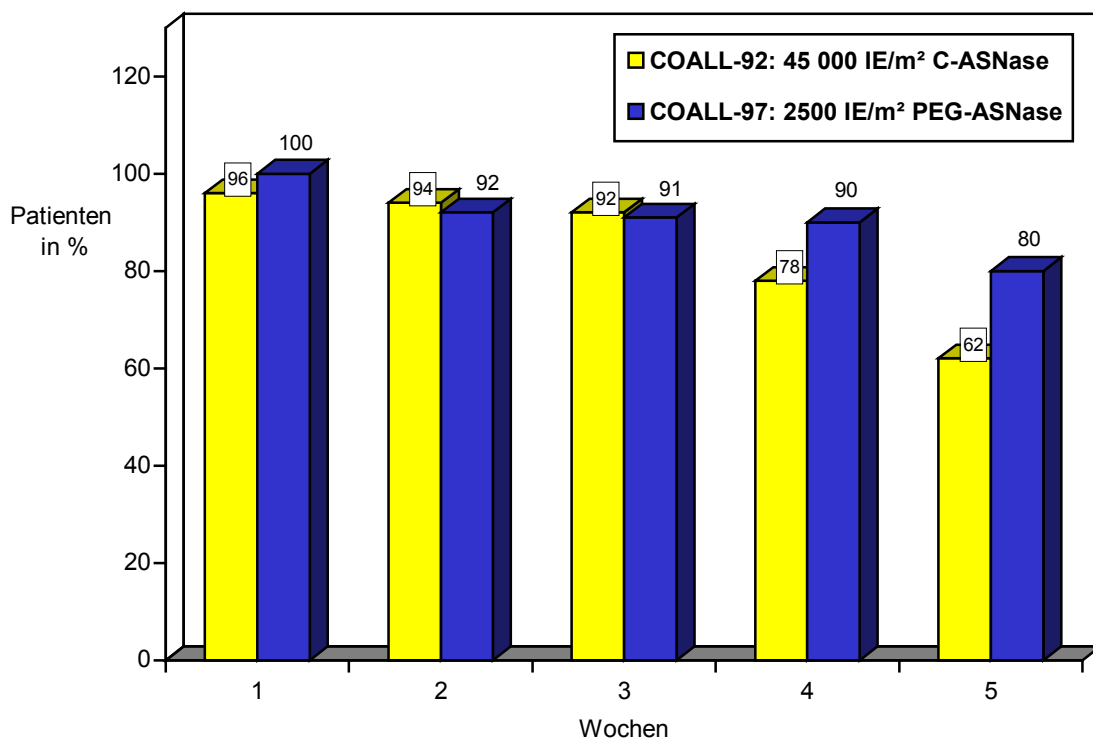


Abb. 25: Asparagine depletion unter C-Asparaginase und PEG-Asparaginase.

Vergleich der COALL-Studien-92 und -97. Dargestellt ist der Prozentsatz Patienten mit einer Asn Konzentration < 0,05 mg/dl nach 1 x 45 000 IE/m² C-ASNase (COALL-92) und 2500 IE/m² PEG-ASNase (COALL-97)

Der Vergleich zwischen den COALL-Protokollen -92 und -97 zeigt eine gleich lange Depletion von Asn im Serum bis 5 Wochen nach Gabe von entweder 45 000 IE/m² C-ASNase oder 2500 IE/m² PEG-ASNase bei der Mehrheit der Patienten. Nach C-ASNase zeigten zwei Drittel aller Patienten (65%) eine ausreichende Depletion für 5 Wochen. Nach PEG-ASNase waren es sogar 81% der Patienten zu diesem Zeitpunkt, wobei der Unterschied nicht signifikant war ($p > 0,005$, Tabelle 11)

| Woche | Anzahl der Patienten mit Asparagin <0,05 mg/dl | | Signifikanz |
|----------|--|--------------|-------------|
| | E.coli | PEG | |
| 1 | 73/77 (95%) | 57/57 (100%) | >0,05 |
| 2 | 60/68 (89%) | 54/59 (92%) | >0,05 |
| 3 | 50/61 (82%) | 53/58 (91%) | >0,05 |
| 4 | 35/49 (71%) | 53/59 (90%) | <0,05 |
| 5 | 17/26 (65%) | 43/53 (81%) | >0,05 |

Tab. 11: Asparagin im Serum nach 45 000 IE/m² i.v. E.coli-ASNase (COALL-92) verglichen mit 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v. (COALL-97).

In beiden Protokollen gab es Patienten mit einem frühen Anstieg des Asparagins im Serum. Wenn man HR und LR Patienten getrennt betrachtet, so gab es nach beiden Asparaginasepräparaten mehr HR Patienten, die früh wieder messbare Asn-Spiegel hatten. Nach PEG-ASNase waren es 10 HR-Patienten und keine LR Patienten mit früh wieder messbaren Spiegeln, wohingegen es nach C-ASNase 18 HR Patienten und 4 LR Patienten waren.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Patienten und Auswahlkriterien

Patienten mit einer vorausgegangenen Allergie auf C-ASNase wurden nicht in die Studie aufgenommen. Diese Überlegung basierte auf der bereits erwähnten Tatsache, dass Patienten mit einer vorausgegangenen Allergie auf Asparaginase auch z.T. eine verkürzte Halbwertszeit der PEG-ASNase zeigten (*Asselin et al. 1993*). Wang et al. untersuchten an einer relativ kleinen Fallzahl von 24 Patienten mit einer neu diagnostizierten ALL die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen native E.coli-Asparaginase, Erwinase und PEG-ASNase. Sowohl bei Patienten mit einer allergischen Reaktion (n=18) als auch bei den Patienten die klinisch nicht reagiert hatten (n=6), fanden sich Kreuzreaktionen von PEG-Antikörpern mit Coli-Antikörpern. 67% der Patienten (4/6), die nicht allergisch reagiert hatten und nur C-ASNase erhalten hatten, zeigten eine Kreuzreaktion gegenüber PEG-ASNase, jedoch keine gegenüber Erwinase-Antikörpern. Patienten, die auf C-ASNase allergisch reagiert hatten, waren auf E-ASNase umgestellt worden und zeigten in 72% eine Reaktion mit PEG-ASNase (*Wang et al. 2003*). In dieser Studie wurden jedoch keine Asparaginspiegel bestimmt, so dass fraglich ist, ob Antikörperbildung in dem selben Maße zu einem Aktivitätsverlust und somit zu einer ineffektiven Asparaginasetherapie führt.

Vor dem Hintergrund, dass PEG-ASNase bisher nur zum Einsatz kam, wenn eine Allergie auf C-ASNase die weitere Therapie limitierte, wäre eine Untersuchung solcher Kinder im Nachhinein aufschlussreich gewesen. So hätte man z.B. den raschen Abfall der Asparaginase-Aktivität der stillen Inaktivierer mit dem Aktivitätsabfall derjenigen vergleichen können, die vorher klinisch auf C-ASNase reagiert hatten und eventuell Unterschiede feststellen können. Da aber im zukünftigen Protokoll ein Monitoring der ASNase stattfindet, kann eine rasche Inaktivierung sowohl bei Patienten, die klinisch mit einer allergischen Symptomatik reagieren, als auch bei solchen Patienten, die klinisch unsymptomatisch sind jedoch Antikörper bilden, früh erkannt werden.

5.1.2 Aufarbeitung der Proben

Zur Bestimmung der Aminosäuren im Serum sollte nach Entnahme der Proben und nach Bearbeitung der Proben auf Eis die noch im Serum vorhandene Asparaginase inaktiviert werden. Hierzu wurde in unserem Assay 10%ige Sulfosalizylsäure hinzugegeben, die das Serum deproteiniert und somit die Aktivität der Asparaginase stoppt. Dies ist eine gängige Methode, die von diversen Autoren als effektiv beschrieben wurde (*Fürst et al. 1990, Graser et al. 1985, Kellner et al. 1994*).

Weitere Möglichkeiten der Deproteinisierung sind die Zugabe von eisgekühltem Acetonitril, das jedoch durch unvollständige Proteolyse bzw. unvollständige Extraktion falsche Werte liefert, und Perchlorsäure, die wiederum zu einer starken Ansäuerung des Serum führt.

Werber konnte nachweisen, dass der Einsatz von DONV, einem Asparaginaseinhibitor, der irreversibel mit dem aktiven Zentrum der Asparaginase reagiert, zu Ungenauigkeiten in der Asn-Bestimmung führte (*Werber 1995*).

5.1.3 Quantitative Aminosäurenbestimmung

Zur Bestimmung der Aminosäuren im Plasma und Liquor wurde uns die vorhandene Methode des Stoffwechsellabors unter der Leitung von Herrn Prof. Kohlschütter der Universitätskinderklinik Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung des Asparagins wurde eine HPLC-Methode (high performance liquid chromatography) mit Post-column-Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze für Asparagin mit der beschriebenen Methode lag bei 0,05 mg/dl (entspr. 3,78 μM). Die Bestimmungsgrenze der meisten in der Laborroutine verwendeten Aminosäureanalyser liegt bei 1 μM (*Capizzi et al. 1993*). Die untere Nachweisgrenze des Münsteraner Labors der Gruppe um Herrn Boos lag bei 0,2 μM für Asn im Liquor und im Plasma. Dies ist ein deutlicher Unterschied, weswegen die Liquorproben in beiden Laboren parallel gemessen wurden. Die Serumproben wurden hingegen nur in unserem Labor in Hamburg analysiert, da es um den Vergleich mit den vorherigen Proben aus der Studie COALL-97 ging. In dieser Studie waren keine Liquorproben bestimmt worden, so dass es keine Vergleichsdaten gab.

Unter der Therapie mit Asparaginase kommt es zu einer Depletion von Asparagin im Serum, weswegen die Aminosäure in geringsten Mengen nachweisbar sein sollte. Speziell hierfür ausgerichtete Labore wie die von Capizzi beschriebenen oder das der Arbeitsgruppe um Boos arbeiten aus diesem Grunde entsprechend an sensitiveren Methoden.

Die Aminosäurenanalyse in Münster wurde mittels einer Pre-column-Derivatisierung mit OPA durchgeführt. Die Vorsäulenderivatisierung mit OPA und anschließender Fluoreszenzdetektion zeigte gegenüber anderen Methoden die sensitivsten Ergebnisse (*Fürst et al. 1990*).

Wie bereits in Kapitel 3.3.1. erwähnt, wird die höhere Sensitivität der Pre-column-Derivatisierung darauf zurückgeführt, dass bei der post-column-Derivatisierung eine Verunreinigung des Eluats durch die Trägersubstanz des Detergenz auftritt. Die Folge sind Peakaufweitung und –abflachung in der nachfolgenden photometrischen Detektion. In Hamburg stand uns ein System mit post-column-Derivatisierung zur Verfügung, was den Unterschied der Nachweisgrenze in erheblichem Maße beeinflusst. Ein weiterer Einflussfaktor auf die unterschiedliche Nachweisgrenze betrifft die Partikelgröße der verwendeten Kunstharzmatrix auf den verwendeten Säulen. Beide Methoden verwendeten zwar eine Lithiumionensäule, die Partikelgröße der Münsteraner Methode betrug jedoch 5 μM im Gegensatz zu 8 μM bei der in Hamburg verwendeten Säule. Kleinere Partikel erlauben bei gleicher Fließgeschwindigkeit und Säulenlänge eine größere Auftrennung, was darauf zurückzuführen ist, dass kleine Partikel die Anzahl der zur Verfügung stehenden aktiven Gruppenerhöhen, d.h. der Diffusionsweg der aktiven Gruppen ist kürzer.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Daten zwischen der Gabe von 45 000 IE/m² C-ASNase in den Vormessungen des Protokolls-92 und 2500 IE/m² PEG-ASNase wurde die selbe Methode verwendet. Die Liquorproben wurden zusätzlich mit der sensitiveren Methode des Labors in Münster untersucht.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Unter der Therapie mit Asparaginase kommt es in 3-70% der Fälle zu allergischen Reaktionen, die zum Teil schwerwiegend verlaufen und therapielimitierend sein können (*Dorr, von Hoff 1994, Capizzi & Holcenberg 1993*). Auch in den COALL-Studien-92 und -97 wurden bei einem Drittel der Patienten allergische Reaktionen verzeichnet (*nicht veröffentlichte Daten*). Durch die Bindung von nativer Asparaginase an Polyethylenglykol kommt es zu strukturellen Veränderungen. Der Einsatz von PEG-ASNase weist insofern eine Verbesserung der Asparaginasetherapie auf, als dass oftmals in Fällen einer therapielimitierenden allergischen Reaktion auf C-ASNase durch den Einsatz von PEG-ASNase eine Therapiefortsetzung gewährleistet werden kann.

Die meisten pharmakokinetischen Studien wurden nach intramuskulärer Applikation durchgeführt (*Ertel et al. 1979, Nesbit et al. 1979, Asselin 1993, Avramis et al. 2002*).

In jüngerer Zeit wurden jedoch auch pharmakokinetische Studien nach 500, 1000 IE/m² PEG-ASNase i.v. durchgeführt (*Müller, Boos et al. 2000, Vieira Pinheiro et al. 2001*). Es gibt jedoch bisher keine Daten zur Asparagindepletion im Serum und Liquor nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v..

5.2.1 Asparagin im Serum nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase COALL-Protokoll- 97

Asparaginase führt über die Hydrolyse von Asparagin zu Aspartat und Ammoniak zu einer Depletion von Asparagin im Serumpool. Die Bestimmung der Aminosäure im Serum gibt somit eine direkte Aussage über die Wirksamkeit des Enzyms. Als depletiert angesehen wurden Seren, deren Asn Konzentration $<0,05$ mg/dl (untere Nachweisgrenze der angewandeten Methode).

Nur wenige Patienten (9 von 22 HR Patienten und 2 von 22 LR Patienten) zeigten messbare Asn-Spiegel vor Beginn der Therapie mit 2500 IE/m² PEG-ASNase. Die bei dem überwiegenden Teil der Patienten nachgewiesene Depletion ist auf vorausgegangene Gaben C-ASNase zurückzuführen. Diese lag sowohl im HR als auch im LR Protokoll etwa 3 Wochen zurück und ist bei der Interpretation der folgenden Ergebnisse zu berücksichtigen. Ein anderer Zeitpunkt im Protokoll hätte jedoch keine ausreichende Beobachtungszeit zur Messung der Depletion geboten.

Die Messungen ergaben eine Depletion von Asn im Serum für mindestens 5 Wochen (*Abb. 13 & 14*). Es fiel jedoch auf, dass einige Patienten bereits früh wieder messbare Asn-Spiegel zeigten.

Betrachtet man die LR- und HR-Gruppe getrennt voneinander, so fällt ebenfalls auf, dass keiner der LR-Patienten während der ersten 5 Wochen nach Gabe nachweisbare Asn-spiegel zeigt (2/17 LR-Patienten). In 5 Serumproben der HR-Patientengruppe waren jedoch messbare Asn-Spiegel bereits 2 Wochen nach Gabe nachweisbar. Keiner dieser Patienten hatte eine allergische Reaktion auf PEG-Asparaginase. Auch die vorherigen C-ASNase-Gaben waren ohne sichtbar allergisches Korrelat vertragen worden.

Auch in dem COALL-92-Protokoll waren nach C-ASNase frühe Anstiege des Serumasparagins hauptsächlich bei HR-Patienten beobachtet worden. Dieser frühe Verlust der Enzymaktivität könnte durch das Phänomen der „stillen Inaktivierung“ oder „silent hypersensitivity“ (*Ahlke et al. 1997, Asselin et al. 1993*) durch spezifische, gegen das Enzym gerichtete Antikörper erklärt sein. Kurtzberg berichtete über spezifische IgG-Antikörper, die zu einer verminderten Halbwertszeit der PEG-Asparaginase führten (*Kurtzberg et al. 1994*).

Obwohl in dieser Studie keine spezifischen Antikörper gegen PEG-ASNase bestimmt wurden, kann man das Vorhandensein dieser als Erklärung für den frühen Wiederanstieg von Asn in einigen Fällen annehmen.

Kurtzberg et al. untersuchten die Pharmakokinetik der PEG-Asparaginase bei Kindern, die vorher mit nativer E.coli-ASNase behandelt worden waren. Hierbei waren in 60% IgG-Antikörper gegen C-ASNase nachweisbar, wobei hiervon nur einige klinische Anzeichen einer Hypersensitivität aufwiesen. Bei Patienten mit niedrigen Antikörpertitern betrug die Halbwertszeit der PEG-Asparaginase 7,05 Tage gegenüber 2,59 Tagen bei Patienten mit hohen Antikörpertitern unter der vorher verabreichten C-ASNase. Die Veränderungen der Pharmakokinetik waren sowohl bei klinisch allergischen als auch unauffälligen Patienten nachweisbar (*Kurtzberg et al. 1994*).

HR-Patienten erhalten in dem COALL-Protokoll während der Intensivphase insgesamt 4 Gaben Asparaginase, wohingegen LR-Patienten 3 Gaben erhalten (*siehe Protokolle im Anhang*). Die PEG-Asparaginase wurde im LR-Protokoll für die 3. Gabe C-ASNase (Tag 80) und im HR-Protokoll für die 4. Gabe (Tag 108) substituiert. Die Anzahl der Expositionen gegenüber C-ASNase könnte somit eine Rolle in der Bildung von Antikörpern spielen. In dem AIEOP-Protokoll kam es unter repetitiven Gaben von Erwinase zu einer Reduktion der Asparagindepletion im Serum. Die Autoren vermuteten als Ursache hierfür entweder die Bildung von Antikörpern oder die Induktion der Asparagin-Synthetase (*Rizzari et al. 1995*).

Asslin et al. hingegen fanden keinen Effekt auf die Pharmakokinetik durch die repetitive Gabe von C-ASNase (*Asslin et al. 1993*).

Der Vergleich der Aktivität-Zeitkurven von Asparaginase in den Standard-BFM-Protokollen und dem REZ-BFM- Protokoll, in dem häufigere ASNase Gaben erfolgen, zeigt ebenfalls keinen Unterschied der Pharmakokinetik (*Müller et al. 2002*).

Es gibt nur wenige Angaben in der Literatur über die minimale Asn-Konzentration, die Leukämiezellen zum Wachstum benötigen und die somit für den optimalen Therapieerfolg unterschritten werden müsste.

Haley gab eine Asparaginkonzentration von 20 μM (= 0,26 mg/dl) als ausreichend für halbmaximales Wachstum und 70 μM (= 0,92 mg/dl) als ausreichend für optimales Wachstum von L5178Y Leukämiezellen an (*Haley et al. 1961*). Dies stimmt mit den

Normwerten für Asn im Serum von etwa 0,4 – 1,0 mg/dl überein. Broome berichtete über das Wachstum von 6C3HED Lymphomzellen in Kultur bei minimalen Asn-Konzentrationen von 0,05 – 0,1 mg/dl, was unserer Nachweisgrenze von 0,05 mg/dl entspricht. Für optimales Wachstum nach 24 Stunden benötigten sie jedoch 2 – 5 mg/dl Asn (*Broome 1963*).

Es stellt sich die Frage, ob die klinische Wirksamkeit der Asparaginase nur durch komplette Depletion von Asn in menschlichen Flüssigkeiten (Serum und Liquor) erreicht wird oder ob eine Senkung des Spiegels von Asparagin unterhalb des Normwertes ausreicht, um zu dem bisher angenommenen Mechanismus der Unterbrechung der Biosynthese in Blasten aufgrund ihrer fehlenden Asparaginsynthese zu führen.

Eine interessante Studie der DCLSG-Gruppe über Sensitivität gegenüber L-Asparaginase in t(12;21) positiven ALL Patienten belegt eine hohe Expression der Asparagin-Synthetase in dieser Gruppe von Patienten. Dies widerspricht der bisherigen Annahme, dass der therapeutische Effekt der Asparaginase auf dem Fehlen der Asparagin-Synthetase in Leukämiezellen basiert, da es sich bei t(12;21) positiven leukämischen Zellen um äußerst Asparaginase-sensitive Zellen handelt.

Die Studie legt die Hypothese nahe, dass neben dem Fehlen des Substrates Aspartat, das zu einer Hochregulierung der Asparagin-Synthetase führt, ein weiterer Effekt durch das Fehlen des Glutamins hervorgerufen wird. Durch die gleichzeitige Glutaminase-Aktivität der Asparaginase kommt es zu einer Depletion des Glutamins. Hierdurch könnte es zu einer verstärkten Apoptose kommen (*Stams et al. 2003*). Fumarola et al. beschrieben eine durch Glutamindeprivation bedingte Aktivierung des CD95-getriggerten Apoptoseweges in Leukämiezellen (*Fumarola et al. 2001*).

Die Interpretation der Asn Depletion im Serum als direkter Nachweis der Enzymaktivität unterliegt in vivo der Gefahr falsch niedriger Spiegel aufgrund einer möglichen ex vivo Aktivität des Enzyms nach Blutentnahme. Unsere Vorexperimente zeigten, dass dieses Phänomen in physiologischen Verdünnungen, wie sie unter der Gabe von 2500 IE/m² PEG-ASNase zu erwarten waren, unwahrscheinlich sind. Das zusätzliche Monitoring durch Messung der ASNase-Aktivität im Serum erlaubt genauere Aussagen über die Effektivität der Therapie.

Bei der Interpretation der Asn im Liquor ergeben sich oben genannte Probleme nicht. Da die Asparaginase nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, ist mit einer ex vivo Hydrolyse durch die ASNase im Liquor nicht zu rechnen.

5.2.2 Asparagin im Liquor nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase COALL-Protokoll- 97

Da Asparaginase nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, führt eine Depletion des Asparagins im Serum somit zu einer Depletion im Liquor (*Riccardi & Holcenberg et al., 1981*). Es werden bis zu 9 verschiedene Aminosäuretransporter, die an der Blut-Hirn-Schranke aktiv sind, beschrieben. Sie unterscheiden sich in ihrer Substrat-Spezifität und der Abhängigkeit des Transports von Natrium. Das L-System ist für den Transport der essentiellen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin, Threonin sowie die beiden nicht essentiellen Aminosäuren Tyrosin und Histidin verantwortlich. Das Y⁺System, das die essentiellen basischen Aminosäuren Arginin und Lysin transportiert, ist wie das L-System an der luminalen und abluminalen Seite des cerebralen Endothels lokalisiert. Beide sind Natrium-unabhängig und haben eine hohe Affinität und transportieren als Co-transporter zwei oder mehr AS. Ebenfalls zu den Natrium-unabhängigen Transportern zählt das x⁻System, das für den Transport von Aminosäuren mit anionischen Seitenketten wie Glutamat, Glutamin, Asparagin und Aspartat verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den erstgenannten nimmt dieser Transporter jedoch AS mit einer geringeren Geschwindigkeit auf. Dies wird darauf zurückgeführt, dass Glutamat und Aspartat, sowie Glutamin und Asparagin vom Gehirn synthetisiert werden können (*Smith Q.R. 2000*).

Weitere Systeme wie das A-System (Alanin, Glycin, Prolin), System B⁰⁺, System ASC, N (Asn) und X^{AG} (Asn) sorgen für einen aktiven ATP-abhängigen Transport gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Liquor in die Endothelzellen und somit für den Efflux der Aminosäuren. Sie sind natriumabhängig und befinden sich an der abluminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke (*Smith Q.R. 2000*).

Die Depletion des Liquors wird einerseits durch die andauernde Depletion im Serum und somit den fehlenden Transport von Asn aus dem Gefäßsystem erklärt, als auch den

erleichterten Transport von Asn entlang des nun neu entstandenen Konzentrationsgradienten vom Liquor ins Blut.

Millmann et al. untersuchten die Asparagin-Synthetase in Affengehirnextrakten in vitro, in menschlichen Geweben ist sie jedoch in vivo vernachlässigbar gering (Millmann et al. 1974).

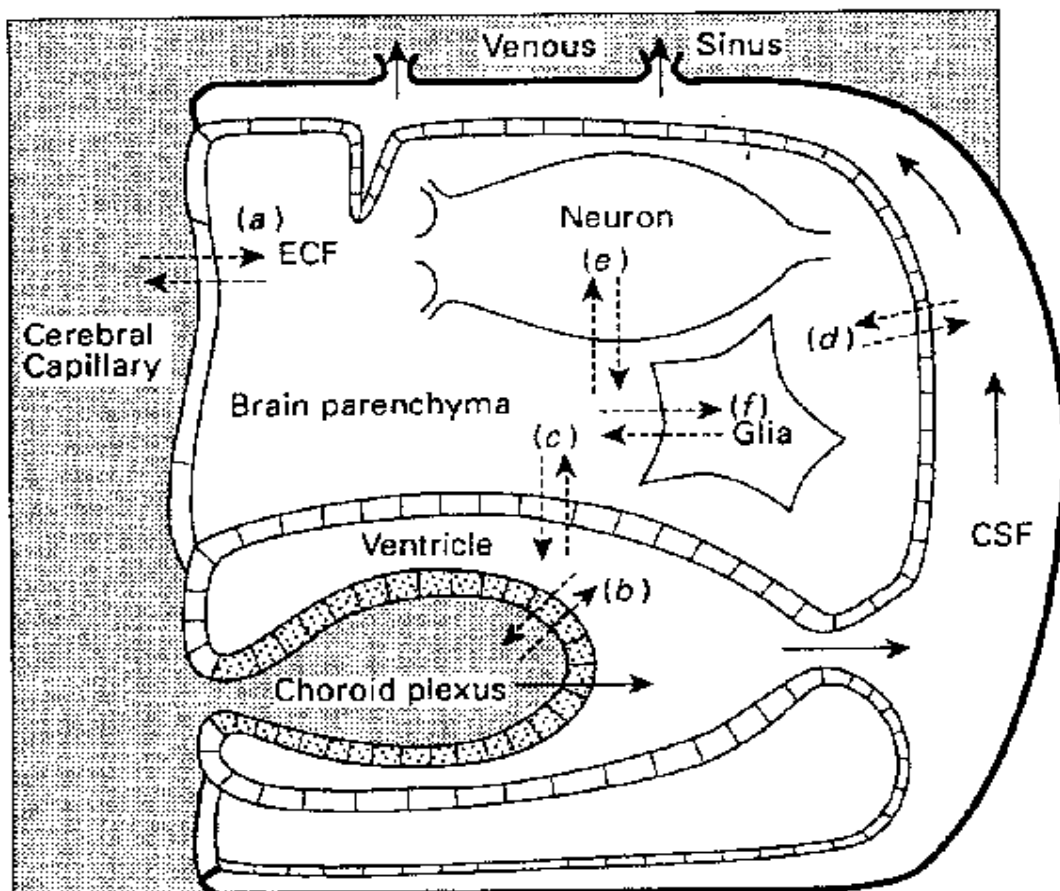


Abb. 26: Darstellung der Flüssigkeitskompartimente des Liquor- und Bluthirnschrankensystems und Transportwege.

Durchgängige Pfeile zeigen den Liquorfluß, gestrichelte Pfeile geben Diffusion von Wasser und den Transport von gelösten Bestandteilen zwischen den Kompartimenten an: a) über die Bluthirnschranke zwischen den Kapillaren und der Extrazellulärflüssigkeit (ECF), b) durch das Epithel des Plexus Choroideus, c) durch das Ependym, d) über piagiale Membranen, e) und f) über Zellmembranen der Neurone und Gliazellen

(aus Fraser et al. 1985)

Da Lumbalpunktionen zur Erhebung eines Kollektivs bei gesunden Kindern ethisch nicht vertretbar sind, gibt es nur wenige Angaben zu normalen Aminosäurenkonzentrationen im Liquor im Kindesalter. Gerrits et al. stellten Referenzwerte aus Liquorproben von Kindern zusammen, bei denen aus diagnostischen Gründen aufgrund des Verdachts auf eine Meningitis oder andere neurologische Erkrankungen eine Lumbalpunktion durchgeführt wurde, die jedoch retrospektiv keinen Anhalt für eine Erkrankung im ZNS boten. Referenzwerte für Asparagin im Liquor liegen im Alter von 3 – 18 Jahren zwischen 0,04 und 0,1 mg/dl (entspricht 3,23 – 7,5 µM), etwa ein Zehntel der Plasmakonzentration. Bei Säuglingen im Alter von 3 bis 12 Monaten lagen die Spiegel der meisten Aminosäuren im Liquor etwas höher (Asn 0,06 – 0,1 mg/dl), was eventuell auf eine unausgereifte Entwicklung der exkretorischen Transporter für Aminosäuren zurückzuführen ist (Gerrits et al. 1989). Andere Studien gaben ähnliche Asparaginspiegel von 0,04 – 0,24 mg/dl (Applegarth et al. 1979) und 0,03 – 0,82 mg/dl (Heiblim et al. 1978) an.

Nicht messbare Spiegel vor Beginn der Therapie waren bei 11 Patienten nachweisbar, die auf die 3 Wochen vorausgegangene Gabe von nativer C-ASNase zurückzuführen ist. Dies ist wie auch bei den Ergebnissen der Serumasparaginspiegel bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

In dem COALL-97-Protokoll wurden Asparaginkonzentrationen < 0,05 mg/dl in 73% der Patienten für mindestens 5 Wochen nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, wurden Liquorproben auch in Münster mit einer niedrigeren Nachweisgrenze für Asparagin (0,2 µM) gemessen. Hierbei zeigte sich eine Depletion in der Mehrzahl der Patienten für mindestens 2 Wochen nach einer Gabe von 2500 IE/m² PEG. Asparaginkonzentrationen waren im Median bis zu 4 Wochen 3fach niedriger als die Normwerte für Asparagin im Liquor (Gerrits et al. 1989).

Es existieren bisher nur wenige Studien, die den Verlauf der Asparaginkonzentration unter Asparaginase im Liquor untersucht haben. Die meisten dieser Studien wurden nach Administration von nativer E. coli Asparaginase durchgeführt und können nicht direkt mit dieser Studie verglichen werden, da zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation des Enzyms gemessen wurde. Meist wurde die Asn Konzentration zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt nach repetitiven Gaben von ASNase bestimmt.

Woo et al. fanden keine komplette Depletion ($<0,04 \mu\text{M}$) von Asn im Liquor. Bereits während der Therapie mit entweder $6 \times$ oder $8 \times 10\,000 \text{ IE/m}^2$ E. coli (Elspar) i.m. zeigten 26% der Patienten keine Depletion. 11-30 Tage nach Applikation der Einzelgaben zeigten 80% keine Depletion, wobei die mediane Asn Konzentration im Liquor $1,7 \mu\text{M}$ betrug. Zum vergleichbaren Zeitpunkt betrug die mediane Asn Konzentration in der COALL-97-Studie $<0,2 \mu\text{M}$ (14d nach Gabe) bis $0,9 \mu\text{M}$ (28d nach Gabe). Mehr als 30 Tage nach Administration beschrieben Woo et al. in keiner der 21 Proben eine Depletion (Woo et al. 1999). Die Asn Konzentration zu diesem Zeitpunkt entsprach derjenigen, die ≥ 42 Tage nach 2500 IE/m^2 PEG gefunden wurde. Es ist jedoch darauf hin zu weisen, dass die untere Nachweisgrenze in dieser Studie um das 5fache niedriger war als unsere.

Gentili et al. fanden bei kompletter Depletion von Asn im Serum unterhalb der Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/ml}$ ($= 0,75 \mu\text{M}$) Liquorwerte von $20\text{-}380 \text{ ng/ml}$ ($= 0,15 \text{--}2,8 \mu\text{M}$) 3-7 Tage nach repetitiven Gaben von entweder $10\,000$ oder $25\,000 \text{ U/m}^2$ Erwinase. Die untere Nachweisgrenze für Asn im Liquor betrug 20 ng/ml ($= 1,5 \mu\text{M}$) (Gentili et al. 1996).

In unserer Studie zeigte die Korrelation der Asparaginkonzentration im Liquor zu den Aktivitäten im Serum, dass höhere Aktivitäten $>100 \text{ IE/l}$ mit niedrigen bzw. nicht nachweisbaren Asn-Konzentrationen von $<0,2 \mu\text{M}$ (range: $<0,2\text{-}0,8 \mu\text{M}$; 27 Proben) assoziiert waren, wohingegen Aktivitäten $< 2,5 \text{--}100 \text{ IE/l}$ höhere Asn Spiegel mit einem Median von $1,2 \mu\text{M}$ zur Folge hatten (siehe Abbildung 24).

Riccardi et al. postulierten, dass eine minimale ASNase Aktivität von 100 IE/l notwendig sei, um eine ausreichende Depletion im Liquor zu garantieren (Riccardi et al. 1981). Dies wurde von weiteren Studien bestätigt (Ahlke et al. 1997, Boos et al. 1996, Rizzari et al. 2000).

Ahlke konnte jeweils in 11 Patienten 2 Tage nach der 6. Gabe und in 7 Patienten am Tag der 8. Gabe 2500 IE/m^2 C-ASNase i.v. eine komplette Depletion ($< 0,1 \mu\text{M}$) im Liquor nachweisen. Hierbei waren die Aktivitäten $>100 \text{ IE/l}$ (Median 125 IE/l) (Ahlke et al. 1997). Rizzari konnte 1 Tag nach der 4. Gabe (35 Patienten) und 5 Tage nach der 8. Gabe (22 Patienten) von $10\,000 \text{ IE/m}^2$ i.v./i.m. eine Depletion $<0,2 \mu\text{M}$ nachweisen. Die Aktivitäten der C-ASNase lagen hierbei ebenfalls $>100 \text{ IE/l}$. 11 Patienten, die Erwinase erhalten hatten, hatten trotz Aktivitäten $<50 \text{ IE/l}$ eine Depletion im Liquor.

Die Aktivitäten wurden am Tag der 2., 5. und 8. Gabe bestimmt, also nicht zu den selben Zeitpunkten wie die Messungen für ASN im Liquor (*Rizzari et al. 2000*).

In unserer Studie wurde eine einzelne Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase gegeben und erstmals 2 Wochen später Asn im Liquor gemessen. Hierbei war nicht in allen Fällen eine Aktivität >100 IE/l mit einer komplette Depletion von Asn im Liquor verbunden.

Eine vergleichbare Studie, die ebenfalls die Auswirkung von 2500 IE/m² PEG-ASNase i.m. untersucht und Asparaginase-Aktivität im Serum in Korrelation zum Liquor gesetzt hat, ist die von Avramis (*Avramis et al. 2002*). Hierbei zeigten sich sowohl unter 2500 IE/m² PEG-ASNase i.m. als auch unter 6000 IE/m² C-ASNase i.m. zwar eine Absenkung der Asparagin-Spiegel jedoch keine komplette Depletion (< 0,1 µM) von Asn im Liquor. Es finden sich jedoch nachweisbare Asn-Spiegel im Liquor bei ASNase-Aktivitäten >100 IE/l, was bisher als ausreichende Aktivität postuliert worden war, um Asn im Liquor zu depletieren (*Riccardi et al. 1981*). Vier Tage nach der Applikation von 2500 IE/m² PEG-ASNase betrug die mediane Asn Konzentration 1,1 µM gegenüber 1,0 µM 2 Tage nach der zweiten Gabe von C-ASNase. Man kann somit annehmen, dass eine komplette Depletion von Asn im Liquor von unterschiedlichen Faktoren abhängt, wie z.B. der Anzahl der Gaben oder dem Zeitpunkt der Messung.

Dies legt auch die Arbeit von Riccardi nahe, die die Pharmakokinetik unterschiedlicher C-ASNase-Dosierungen bei Patienten mit ALL untersuchte. 5 Patienten zeigten nach Gabe von 6000 IE/m² C-ASNase 3 mal pro Woche eine Depletion von Asn im Liquor für 7 Tage nach der letzten Gabe. Bei 2 Patienten, die 1 mal wöchentlich 10 000 IE/m² C-ASNase erhalten hatten waren bis zu 3 Tage nach der letzten Gabe keine nachweisbaren Spiegel (<0,02 µM) messbar. Hingegen hatten 1 von 2 Patienten bereits 3 Tage nach der letzten Gabe wieder nachweisbare Spiegel, obwohl sie die letztgenannte Dosierung 2 mal wöchentlich erhielten. Riccardi postuliert in Anlehnung an Untersuchungen an Rhesusaffen eine Serumaktivität von 100 IE/l als ausreichend für eine Depletion von Asn im Liquor, weist aber auch darauf hin, dass diese sowohl dosisabhängig als auch von der Anzahl der Applikationen abhängig ist (*Riccardi et al. 1981*).

Eine neuere Arbeit von Appel et al. zeigte keine Depletion 5 Tage nach der Applikation von 1000 IE/m² PEG-ASNase trotz ASNase-Aktivitäten >100 IE/l (*Appel et al. 2002*).

Neben der Dosis oder der Anzahl der Applikationen könnte auch der Zeitpunkt der Messung eine Rolle spielen. Dies könnte von Bedeutung sein, wenn man annimmt, dass es längere Zeit braucht, bis Asn aufgrund des Konzentrationsgradienten aus dem Liquor ins Plasma transportiert wird.

In den COALL-Protokollen werden nur Medium High-dose Methotrexat Infusionen von 1g/m^2 verwendet, wodurch nur unzureichende Konzentrationen im Liquor erreicht werden. Trotzdem kommt es nur in 3% der Fälle ohne prophylaktische Radiotherapie zu einem isolierten ZNS-Relaps (*Harms et al. 2000*). Neben den regelmäßigen intrathekalen Chemotherapien, können somit auch die Asparaginase-Gaben zur Prävention vor isoliertem ZNS-Befall in den COALL-Protokollen beigetragen haben.

5.2.3 Asparaginase-Aktivität im Serum nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase /COALL-Protokoll 97

Die Messung der Asparaginase-Aktivität stellt eine wichtige pharmakokinetische Methode im drug monitoring der Asparaginase dar und sollte in dieser Studie als zusätzlicher Parameter zu den Asparaginmessungen im Serum und Liquor durchgeführt werden. Die Messung der Asparaginase-Aktivität im Plasma allein ist teilweise unzureichend, um eine Aussage über den klinischen Effektivität zu machen, da prolongierte Asparagindepletionen im Plasma berichtet wurden auch wenn keine Aktivität mehr nachweisbar war (*Capizzi et al. 1971*).

Die Messungen zeigen, dass Aktivitäten bis zu 4 Wochen nach Gabe von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v. nachweisbar waren. Aktivitäten von >100 IE/l, die von Riccardi et al. in einer Studie an Rhesusaffen unter der Gabe von nativer C-ASNase als sicher ausreichend für die Depletion von Serum und Liquor angesehen wurden (*Riccardi et al. 1981*) und auch bisher für den Menschen als Richtgröße postuliert wurden, sind bis zu 3 Wochen nach Gabe in der Mehrzahl der Patienten nachweisbar (Median 310 IE/l).

Dies ist vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien nach intramuskulärer Applikation von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase (*Asselin et al. 1993, Avramis et al. 2002*). Im BFM-Protokoll wurden nach intravenöser Gabe von 2500 IE/m² PEG-ASNase Aktivitäten > 100 IE/l von dem selben Labor lediglich für 2 Wochen gemessen. Hierbei lagen die medianen Asparaginase Aktivitäten in der Reinduktion des BFM-95 Protokolls bei 231 IE/l und im REZ-BFM-96 Protokoll bei 165 IE/l. Hiervon waren in 26% (BFM-95) und 29% (REZ-BFM-96) bereits eine Woche nach Gabe Aktivitäten <100 IE/l nachweisbar, sichtbare allergische Reaktionen wurden jedoch bei keinem der Patienten beobachtet (*Müller et al. 2002*). Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine stille Inaktivierung durch das Vorhandensein spezifischer Antikörper handelt. Da es sich um Messungen in der Reinduktion handelt und häufige ASNase-Gaben vorausgegangen sind, ist eine Antikörperbildung wahrscheinlich.

Auch in unserer Studie zeigten einige Patienten ebenfalls rasch nach Gabe abfallende Asparaginase-Aktivitäten. Diese Patienten korrelierten mit denjenigen, die ebenfalls früh wieder messbare Asparaginspiegel im Serum sowie messbare Werte im Liquor nachwiesen. Wie bereits erwähnt ist dies am ehesten mit dem Phänomen der stillen Inaktivierung zu erklären. Durch die Bildung spezifischer Antikörper gegen die

Asparaginase kommt es zu einer Inaktivierung des Enzyms. Der Anteil der Patienten mit einem raschen Aktivitätsverlust war in der BFM-Studie insgesamt höher als in der COALL-Studie, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass die Messungen in der BFM-Studie zu einem späteren Zeitpunkt im Protokoll (Reinduktion) durchgeführt wurden, bzw. im Rezidivprotokoll und die Patienten von daher mehr ASNase-Gaben erhalten hatten. Repetitive Gaben steigern in der Regel die Sensibilisierung und somit die Antkörperbildung, so dass dies als mögliche Ursache für den Unterschied anzunehmen ist.

5.2.4 Vergleich von 45 000 IE/m² nativer E. Coli Asparaginase i.v. mit 2500 IE/m² PEG-Asparaginase i.v. in den COALL-Protokollen 89/92 und 97

Nach der Gabe von 2 x 45 000 IE/m² E. coli Asparaginase, wie sie im Protokoll COALL-89 verwendet wurde, konnten Asn-Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze von 0,05 mg/dl bis zu 10 Wochen nach Gabe beobachtet werden (*Drescher et al. 1994*). Obwohl keine vermehrte Toxizität unter dieser Dosierung aufgetreten war, wurde die Dosis in dem nachfolgenden Protokoll halbiert, da es potentiell zu einer Wechselwirkung zwischen Asparaginase und Metothrexat kommen kann (*Capizzi et al. 1993*). Die Messungen des COALL-92-Protolls, die mit der selben Methode zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Protokolls vorgenommen wurden (HPLC, siehe Methoden) zeigten in 62% der Patienten eine ausreichende Depletion bis zu 5 Wochen nach C-ASNase. Unter PEG-ASNase hatten zu diesem Zeitpunkt noch 80% der Patienten eine ausreichende Depletion im Serum.

Wie aus den erhobenen Daten deutlich wird, ist die Depletion von Asparagin im Serum unter 2500 IE/m² PEG-Asparaginase im Vergleich zu 45 000 IE/m² E. coli Asparaginase, wie es in dem vorangegangenen COALL-92-Protokoll verwendet wurde, vergleichbar lang. Unter beiden Asparaginasepräparaten gab es einige Patienten mit einem schnellen Wiederanstieg des Asparagins im Serum. Keiner dieser Patienten zeigte eine allergische Reaktion. In beiden Protokollen waren es überwiegend HR Patienten, die bereits mehr Asparaginasegaben erhalten hatten als die LR-Patienten. Vergleicht man die Daten der COALL-Studie-97 und -92 muss man in Betracht ziehen, dass sich die erhobenen Daten der Studie COALL-05-92 auf unterschiedliche Abnahmezeitpunkte im Protokoll beziehen (*siehe Kapitel 4.7.*). Der Vergleich der

Asparaginkonzentrationen identischer Zeitpunkte im Protokoll (3. Gabe im LR-Protokoll und 4. Gabe im HR-Protokoll) war durch die zu geringe Anzahl Patienten im COALL-92-Protokoll nur begrenzt möglich. Zu diesem Zeitpunkt standen 36 Proben von 11 LR Patienten und 58 Proben von 16 HR Patienten zur Verfügung. Etwa der selbe Prozentsatz an HR Patienten zeigte wieder messbare Asn-Spiegel nach 3 Wochen. Nur 1 LR Patient hatte bereits nach 2 Wochen wieder messbare Spiegel.

5.2.5 Ökonomische Aspekte des Vergleichs zwischen 2500 IE/m² PEG-ASNase gegenüber 45 000 IE/m² E. coli-ASNase

Der Einsatz von PEG-Asparaginase hat auch ökonomische Aspekte, die an der Diskussion um die Einsatzmöglichkeit in nachfolgenden COALL-Protokollen Anteil haben und weshalb hier kurz darauf eingegangen werden sollte.

Der in unserer Institution übliche Klinikpreis von PEG-Asparaginase (Oncaspar[®]) beträgt 1061,34 € für ein Fläschchen a 3750 IE. E.coli-Asparaginase (Medac[®]) a 10 000 IE kostet 74,47 €.

Somit kam man bei der bisherigen Therapie mit 45 000 IE/m² E.coli-Asparaginase bei einer Körperoberfläche von 1 m² auf 1984,50 € im LR-Protokoll (4 x ASNase) und 3172,60 € im HR-Protokoll (6 x ASNase), sofern keine Allergie aufgetreten war. Bei einer durchschnittlichen Allergierate von etwa 30% in den bisherigen COALL-Protokollen (unveröffentlichte Daten), muss man jedoch von höheren Kosten ausgehen. Eigene Beobachtungen zeigten, dass von den 30% der Patienten, die eine allergische, therapielimitierende Reaktion auf herkömmliche C-ASNase entwickelten, jeweils 10% auf die zweite, 10% auf die dritte und 10% auf die vierte Gabe reagierten. Somit ergaben sich bei der bisherigen Therapie mit Umstellung auf PEG-ASNase bei Allergie folgende Kosten. 70% erhielten 4 x Coli ASNase ohne allergische Nebenwirkungen. 10% reagierten auf die zweite Coli Gabe und erhielten umgehend 2500 IE/m² PEG-ASNase. Die folgenden 2 C-Asparaginasegaben wurden durch PEG substituiert, so dass insgesamt 2 x Coli und 3 x PEG gegeben wurde. Entsprechend erhielten Patienten, die bei der dritten Dosis reagierten, 3 x Coli und 2 x PEG und Patienten, die erst bei der 4. ASNase reagierten, erhielten 4 x Coli und 1 x PEG. Bei 1m² KOF ergab dies für LR-Patienten ohne Allergie (70%) 1489,40 €, für 10% mit einer Reaktion bei der 2. Gabe

3928,70 €, für weitere 10% mit einer Reaktion bei der 3. Gabe 3239,70 € und für 10% mit einer allergischen Reaktion bei der letzten ASNase Gabe 2250,74 €. Insgesamt kostet also die bisherige Therapie mit C-ASNase bei einer Allergierate von etwa 30 % 1984,50 €.

Setzt man PEG-ASNase gezielt ab der 3. ASNase Gabe an, umgeht man bereits 20% der allergischen Reaktionen auf C-ASNase und erspart diesen Patienten somit eine doppelte Gabe im Falle einer Hypersensitivitätsreaktion. Somit ergeben sich lediglich 10% allergische Reaktionen bei der 2. ASNase Gabe, die dann durch PEG substituiert werden müsste, so dass sich 2 Gaben Coli und 3 Gaben PEG ergeben. Die Kosten liegen zwar etwas höher als wenn man PEG-ASNase erst in der Reinduktion gibt, jedoch verhindert man 20% mehr allergische Reaktionen (*siehe Tabellen 12 & 13 PEG in Reinduktion versus 2 x Coli dann PEG*).

Folgende Tabellen zeigen die Kosten bei drei verschiedenen Körperoberflächen getrennt für das Low und High Risk Protokoll.

| | 0,5 m² | 1,0 m² | 1,3 m² |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Wie bisher (4x Coli) | 1463,40 € | 1984,50 € | 2290,00 € |
| PEG immer (4x) | 4245,40 € | 4245,40 € | 4245,40 € |
| PEG in Reinduktion | 2050,00 € | 2466,80 € | 2720,20 € |
| 2 x Coli dann PEG | 2675,60 € | 2973,50 € | 3122,50 € |

Tab. 12: Therapiekosten für Asparaginasetherapie im LR-Protokoll COALL-97

Therapiekosten bei 3 verschiedenen Körperoberflächen im LR-Protokoll (COALL-97) mit insgesamt 4 Gaben bei einer Allergierate von 30% (10% bei der 2. Gabe, 10% bei der 3. und 10% bei der 4. Gabe)

| | 0,5 m² | 1,0 m² | 1,3 m² |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Wie bisher (6x Coli) | 2413,00 | 3172,60 | 3552,40 |
| PEG immer (6x) | 6368,00 | 6368,00 | 6368,00 |
| PEG in Reinduktion | 3586,10 | 4137,20 | 4412,75 |
| 2 x Coli dann PEG | 4798,30 | 5096,20 | 5245,10 |

Tab. 13: Therapiekosten für Asparaginasetherapie im HR-Protokoll COALL-97

Therapiekosten bei 3 verschiedenen Körperoberflächen im HR-Protokoll (COALL-97) mit insgesamt 4 Gaben bei einer Allergierate von 30% (10% bei der 2. Gabe, 10% bei der 3. und 10% bei der 4. Gabe)

6 Zusammenfassung und Ausblick

Herkömmliche aus *Escherichia coli* Bakterien gewonnene Asparaginase ist seit etwa 30 Jahren fester Bestandteil der Polychemotherapie der ALL im Kindesalter. Die wiederholte Anwendung führt jedoch zu Sensibilisierungen gegenüber dem Fremdeiweiß und führt häufig zu einer allergischen Reaktion. Auch eine „stille Inaktivierung“ durch Bildung von Antikörpern gegen Asparaginase, die zu einem Verlust der Enzymwirkung führen, ohne das klinische Korrelat einer Hypersensitivität hervorzurufen, wird beschrieben und limitiert den Einsatz von Asparaginase. Durch die Konjugation der Coli-Asparaginase mit Polyethylenglykol werden die immunogenen Epitope verschleiert, so dass PEG-ASNase bei Patienten mit einer Allergie gegenüber C-ASNase eingesetzt werden kann. Somit wird in den meisten Fällen eine Therapiefortführung ohne weitere Hypersensitivitätsreaktionen gewährleistet.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Dauer der Depletion von Asn im Serum nach 2500 IE/m² PEG-Asparaginase mit der nach 45 000 IE/m² C-Asparaginase verglichen. Hierzu wurde im Rahmen des COALL-Protokoll-97 die Asparagindepletion im Serum mittels Ionenaustauschchromatographie nach Applikation PEG-ASNase gemessen. Zwischen Mai 2000 und Dezember 2001 wurden 71 Kinder (38 Jungen, 33 Mädchen) mit einer neudiagnostizierten ALL untersucht. Im Rahmen des Therapieprotokolls COALL-06-97 erhielten die LR Patienten (n=36) am Tag 80 2500 IE/m² PEG-ASNase statt der im Therapieprotokoll bisher vorgesehenen 45 000 IE/m² C-ASNase. Dem vorausgegangen waren 2 Gaben nativer C-ASNase an Tag 31 und 59. Die HR Patienten (n=35) erhielten 3 Gaben 45 000 IE/m² C-ASNase an Tag 32, 46 und 87. Die vierte Gabe an Tag 107 wurde wie im LR Protokoll durch 2500 IE/m² PEG-ASNase ersetzt. Bei beiden Patientengruppen wurden direkt vor Applikation der PEG-ASNase und danach wöchentlich über einen Zeitraum von 8 Wochen die Asn-Konzentration im Serum gemessen. Hierzu wurde die selbe Methode verwendet, wie sie in dem vorangegangenen Therapieprotokoll COALL-05-92 angewandt wurde, da die Werte von 50 Patienten (19 LR Patienten und 32 HR Patienten) nach Gabe von 45 000 IE/m² C-ASNase aus diesem Protokoll zum Vergleich zur Verfügung standen. Die Therapieprotokolle unterscheiden sich nicht, bis auf die Substitution von C-ASNase durch PEG-ASNase wie oben beschrieben. Die Messungen der Asn-Spiegel im COALL-05-92 Protokoll erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Protokoll.

Zusätzlich zu den Messungen im Serum wurde in dem COALL-05-97-Protokoll die Asn Konzentration im Liquor gemessen. Hierzu wurde die selbe Methode (Ionenaustauschchromatographie, untere Nachweisgrenze 0,05 mg/dl = 3,78 μ M) angewandt, wie bei den Messungen im Serum. Es konnten 173 Liquorproben von 58 Patienten (84 Proben von 29 HR Patienten, 89 Proben von 29 LR Patienten) analysiert werden. Es standen keine Vergleichsdaten aus den vorherigen Protokollen unter C-ASNase zur Verfügung. Liquorproben der selben Patienten wurden mittels Ionenaustauschchromatographie mit einer niedrigeren Nachweisgrenze (0,2 μ m) in einem Labor in Münster gemessen (184 Proben von 59 Patienten). Es zeigte sich eine Depletion <0,05 mg/dl bis zu 21 Tage nach Applikation von 2500 IE/m² PEG-Asparaginase.

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Asn im Serum unter 2500 IE/m² PEG-Asparaginase vergleichbar lang ist wie die unter 45 000 IE/m² Coli-Asparaginase. Wichtig war diese Frage angesichts der Allergierate von etwa 30% in den COALL-Protokollen, die eine Fortsetzung der Therapie mit demselben Präparat z.T. unmöglich bzw. ineffektiv machte.

Bisher wurde PEG-Asparaginase in dem COALL-Protokoll-97 nur im Falle einer solchen therapielimitierenden Allergie auf herkömmliche C-ASNase eingesetzt. Aufgrund der Studienergebnisse entschied man sich jedoch im Folgeprotokoll-07-03 PEG-Asparaginase von vornherein ab der 3. Gabe zu verabreichen, um somit den häufigen allergischen Reaktionen aus dem Weg zu gehen und einer ineffektiven Therapie oder 2. Gabe vorzubeugen. Zwar ist dieses Regime teurer als die herkömmliche Substitution bei Auftreten einer Allergie, wie Tabellen 12 und 13 zeigen, es beugt jedoch in einigen Fällen einer weiteren Sensibilisierung gegenüber nativer C-ASNase vor. Die repetitive Gabe von Asparaginase führt vermehrt zu Hypersensitivitätsreaktionen, so dass der Wechsel auf ein anderes Präparat in diesen Fällen eine allergische Reaktion verhindern kann und somit eine effektive Therapie zulässt. Es bleibt jedoch zu prüfen, ob sich dieses Modell bestätigt und die Allergierate durch den gezielten Einsatz von PEG-ASNase gesenkt werden kann.

Es ist nach wie vor noch unklar und in bisherigen Studien nicht belegbar gewesen, welche Zielkonzentration des Asparagins zu einer ausreichenden Depletion und somit zu einem Zelltod der Blasten führt. Dies zeigen insbesondere die Diskussionen um eine ausreichende Depletion des Asn im Liquor. Reicht es aus, eine Depletion unterhalb des

Normbereiches von Asn zu erwirken, um eine Störung der Proteinbiosynthese hervorzurufen oder ist dies erst ab einer absoluten Depletion von Asn erreichbar? Diese Mechanismen sind bisher nicht hinreichend untersucht. Individuelles Monitoring in den einzelnen Protokollen unter den jeweiligen Dosierungen und Applikationsintervallen wird empfohlen, um einen effektiven Therapieerfolg sicher zu stellen. Auch Langzeitbeobachtungen der Remissionsraten unter PEG-Asparaginase wären erforderlich, um eine umfassende Aussage zur Effektivität liefern zu können.

7 Anhang

Teilnehmende Kliniken

| | |
|---|---|
| Frau Dr. Pongratz | Kinderklinik Josefinum 86154 Augsburg |
| Herr Dr. Otte Herr Dr. Jorch | Kinderklinik Bethel 33617 Bielefeld-Bethel |
| Herr Dr. Spaar Herr Dr. Lieber | Prof. Hess Kinderklinik 28205 Bremen |
| Herr Prof. Dr. Göbel | Universitätskinderklinik 40225 Düsseldorf |
| Herr Prof. Dr. Weißbach Frau Dr. Siegert | Universitätskinderklinik 01307 Dresden |
| Herr Prof. Dr. Reddemann Herr Dr. Weigel | Universitätskinderklinik 17847 Greifswald |
| Frau Prof. Dr. Janka-Schaub Frau Dr. Harms | Universitätskinderklinik 20246 Hamburg |
| Frau Dr. Streitberger | Kreiskrankenhaus Heide 25746 Heide |
| Herr Dr. Knust | Ev. Krankenhaus Bethanien 58644 Iserlohn |
| Herr Dr. von Klingraeff | Städtisches Krankenhaus 24116 Kiel |
| Herr Dr. Thomas Frau Dr. Völpel | Städtische Krankenanstalten 47805 Krefeld |
| Herr Prof. Dr. Gutjahr | Universitätskinderklinik 55101 Mainz |
| Herr Dr. Müller | Krankenhaus Neuwerk 41066 Mönchengladbach |
| Herr Dr. Klose | Städtisches Krankenhaus 81545 München-Harlaching |
| Herr Prof. Dr. Haas Frau Dr. Graubner | Dr.v.Hauersches Kinderspital 80337 München |
| Herr Prof. Dr. Drescher | Städtische Kinderklinik 26133 Oldenburg |
| Frau Dr. Helmig | Klinikum St. Hedwig 93049 Regensburg |
| Herr Dr. Weber | Dr. Horst-Schmidt-Kliniken 65199 Wiesbaden |
| Frau Dr. Dohrn | Klinikum Barmen 42283 Wuppertal |

Abb. 27: Liste der COALL-assoziierten Kliniken

Studie COALL-06-97

(Merkblatt für Eltern)

Studienleitung:

Frau Prof. Dr. Gritta Janka-Schaub
Universitäts-Kinderklinik Hamburg

Untersuchung:

Qualitätssicherung bei
PEG-Asparaginase

Angeschlossene Klinik:

Patient:

geb. :

Liebe Eltern,

Ihr Kind wird wegen einer akuten lymphatischen Leukämie in der Studie COALL-06-97 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt. Ein wichtiges Medikament in dieser Studie ist die Coli-Asparaginase, ein aus Bakterien gewonnenes Enzym, das der Leukämiezelle eine wichtige Aminosäure (Baustoff für die Eiweißbildung), das Asparagin, zu entziehen vermag.

Wir möchten Sie bitten, sich an einer Studie zu beteiligen, die das Ziel hat, die Behandlung mit Asparaginase zu verbessern.

Eine häufige Nebenwirkung der Asparaginase sind allergische Reaktionen, die bedrohlich sein können und dann zwingen, auf ein anderes Präparat (Erwinia-Asparaginase) überzugehen, das häufiger gegeben werden muß.

Es steht inzwischen ein neues Asparaginase-Präparat zur Verfügung, bei dem es durch Kopplung an eine chemische Substanz (Polyäthylenglykol) an die Coli-Asparaginase gelang, nicht nur die Wirkungsdauer zu verlängert, sondern auch die Häufigkeit der allergischen Reaktionen erheblich zu senken. So konnte in einer anderen Leukämiestudie die Häufigkeit der allergischen Reaktionen von 30% (vergleichbar unserer Häufigkeit) auf <5% gesenkt werden. Im übrigen entspricht das Nebenwirkungsprofil dieser sogenannten PEG-Asparaginase dem der normalen Coli-Asparaginase. Das Medikament ist in Deutschland seit 1. April 1997 in intravenöser Form für die Behandlung akuter lymphatischer Leukämien zugelassen.

Grundsätzlich wäre dieses Medikament auch für unserer Studie von Interesse, wir müssen aber überprüfen, ob die Länge seiner Wirkung der jetzigen Therapie mit Coli-Asparaginase vergleichbar ist. Durch Messung der Asparaginkonzentrationen unter dem jetzigen Präparat, wissen wir in unserer Studie, wie lange die Wirksamkeit der Coli-Asparaginase in der gegebenen Dosierung anhält. Für die PEG-Asparaginase gibt es diese Messungen bisher nur nach der intramuskulären Gabe, die in den USA üblich ist. Da alle unsere Patienten einen

Merkblatt für Eltern

- 2 -

zentralen Katheter haben, und die intramuskuläre Gabe zu unangenehmen örtlichen Nebenwirkungen führen kann, möchten wir dies den Kindern jedoch nicht zumuten.

Um zu überprüfen, wie lange nach intravenöser Gabe die Enzymaktivität anhält und kein Asparagin mit der empfohlenen Dosis mehr nachweisbar ist, müssen wir also die Konzentration der Aminosäure und die Aktivität des Enzyms über einige Wochen messen. Dies soll an 50 Kindern der jetzt laufenden COALL-Studie durchgeführt werden. Dafür eignet sich im Low-Risk-Protokoll die 3. Asparaginase-Gabe und im High-Risk-Protokoll die 4. Asparaginase-Gabe, da danach längere Zeit keine Therapie mit Asparaginase mehr erfolgt.

Wenn Sie bereit sind, sich mit Ihrem Kind an dieser Studie zu beteiligen, bedeutet dies eine zusätzliche wöchentliche Blutentnahme à 6 ml aus dem Katheter bis zur nächsten Asparaginase-Gabe, d.h. über 7-8 Wochen. Falls wir erkennen, daß unter der PEG-Asparaginase die Asparaginverarmung nicht so lange wie gewünscht anhält, würden wir Ihrem Kind eine 2. Dosis PEG-Asparaginase nach 2 bis 3 Wochen verabreichen.

Wir erwarten von dieser Studie eine Aussage über die Wirkungsdauer der PEG-Asparaginase mit der Hoffnung, dieses Medikament mit den geringeren allergischen Reaktionen dann gegen die Coli-Asparaginase austauschen zu können.

Einverständniserklärung

Ich bin von Herrn / Frau Dr. _____ heute über die geplante obige

Studie aufgeklärt worden und mit den zusätzlichen wöchentlichen Blutentnahmen einverstanden. Ich weiß, daß ich mein Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne, daß mir und meinem Kind daraus ein Nachteil erwächst.

Unterschriften:

(Arzt) _____

(Sorgeberechtigte) Vater _____

Mutter _____

(Patient)* _____

Hamburg, den _____

COALL-06-97 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Standard'

Patient: _____

PVA-Score: _____

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block mit Datum eintragen

Zentraler Katheter: ja / nein

FN = Fieber bei Neutropenie*
 BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
 BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
 PIN = Pilzerkrankung bei Neutropenie*
 Men = Meningitis
 VZV = Varizelle-Zoster-Virusinfektion
 HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
 SV = andere, schwere Virusinfektion
 LI = Lokale Infektion

-Pneumonie
 -Abszess
 -Phlegmone
 -ini. Katheter-Eintrittsstelle

Thrombose/Infarkt
 Enzephalopathie
 cerebraler Krampfanfall
 insulinpflichtiger Diabetes mellitus
 Pankreatitis
 Niereninsuffizienz
 Kardiomyopathie
 schwere Stomatitis
 GPT > 500 U/l
 VOD

* Neutrophilie < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

| Tage | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 50 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) | 6-MP 100 mg/m²/d (KM) |
|------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 78 | 1.8 | 80 | 1.8 | 80 | 1.8 | 80 | 1.8 | 80 | 1.8 | 80 |
| 85 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |
| 92 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |
| 99 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |
| 106 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |
| 113 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |
| 120 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 | 2.0 | 80 |

Datum: [] [] []

Grenzwerte für Therapie: 1.8 / 80

* bei Allergie: E-ASP 2 x 45000 E/m² im Abstand von 48 h

Abb. 30: COALL-06-97 LR-Standard

COALL-06-97 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Standard' - Reinduktion

Patient: _____

PVA-Score: _____

3, 6 u. 9 Monate nach Abschluss der Reinduktion jeweils 2 i.th. MTX-Gaben im Abstand von 14 Tagen:

DT Monat 3 6 9

6-MP p.o. tgl. / MTX p.o. 1x/Woche bis Woche 104
Leukozyten 2.0 - 3.0/nl

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block mit Datum eintragen

Zentraler Katheter: ja / nein

FN = Fieber bei Neutropenie*
 BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
 BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
 PIN = Pilzkrankung bei Neutropenie*
 PIO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
 Men = Meningitis
 VZV = Varizella-Zoster-Virusinfektion
 HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
 SV = andere, schwere Virusinfektion
 LI = Lokale Infektion
 -Pneumonie
 -Abszess
 -Phlegmone
 -Inf. Katheter-Eintrittsstelle

Thrombose/Infarkt
 Enzephalopathie
 cerebraler Krampfanfall
 insulinpflichtiger Diabetes mellitus
 Pankreatitis
 Niereninsuffizienz
 Kardiomyopathie
 schwere Stomatitis
 GPT > 500 U/l
 VOD

* Neutrophile < 0,5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

Abb. 31: COALL-06-97 LR-Standard Reinduktion

COALL-06-97 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Reduziert'

Patient: _____

PVA-Score: _____

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block mit Datum eintragen

Zentraler Katheter: ja / nein

FN = Fieber bei Neutropenie*
 BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
 BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
 PIN = Pilzkrankung bei Neutropenie*
 PPO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
 Men = Meningitis
 VZV = Varizelle-Zoster-Virusinfektion
 HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
 SV = andere, schwere Virusinfektion
 LI = Lokale Infektion
 - Pneumonie
 - Abszess
 - Phlegmone
 - Inf. Katheter-Eintrittsstelle

Thrombose/Infarkt
 Enzephalopathie
 cerebraler Krampfanzfall
 insulinpflichtiger Diabetes mellitus
 Pankreatitis
 Niereninsuffizienz
 Kardiomyopathie
 schwere Stomatitis
 GPT > 500 U/l
 VOD

* Neutrophile < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

* bei Allergie: E-ASP 2 x 45000 E/m² im Abstand von 48 h

Abb. 32: COALL-06-97 LR-Reduziert

COALL-06-97 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Reduziert' - Reinduktion

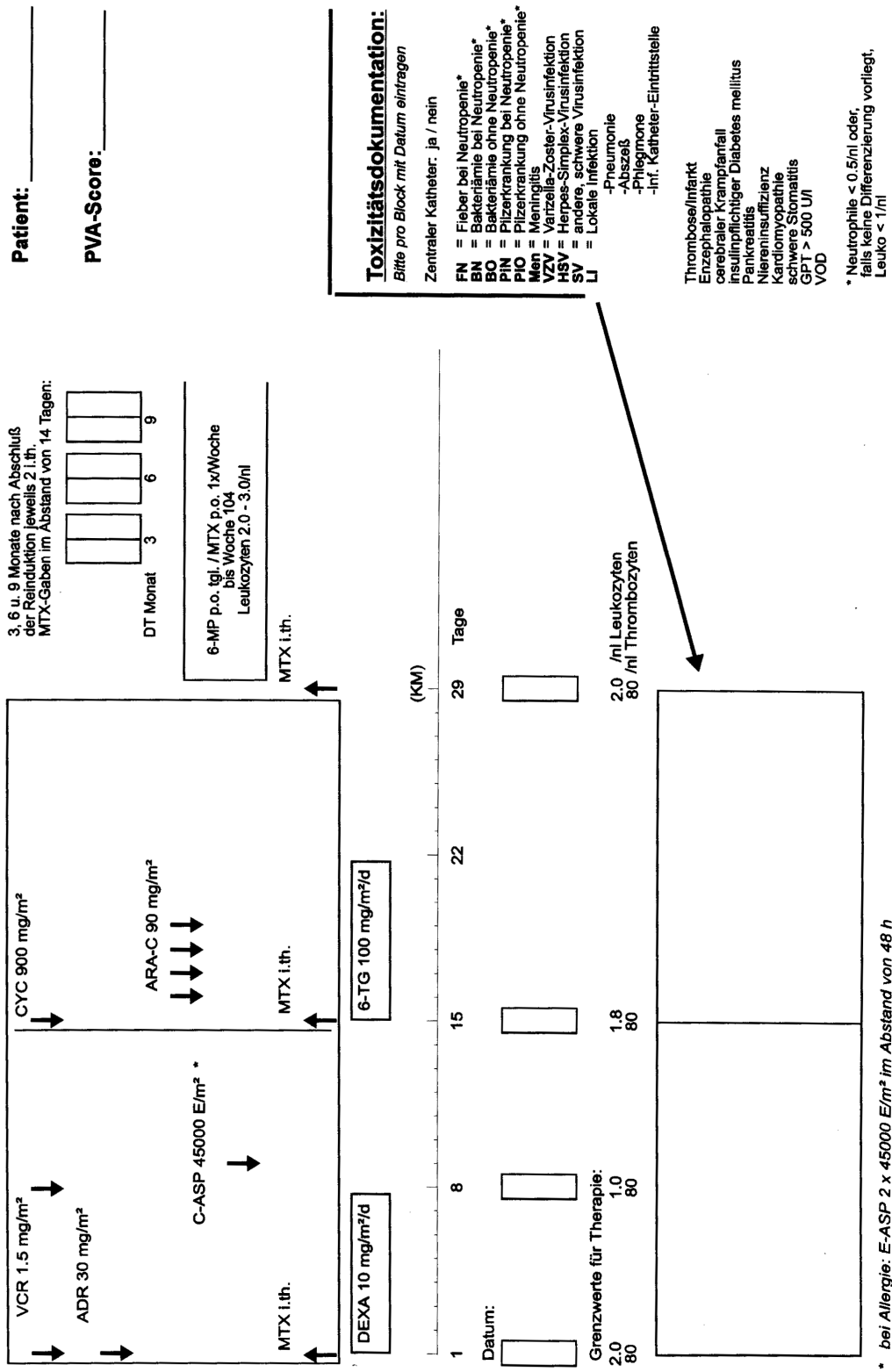


Abb. 33: COALL-06-97 LR-Reduziert Reinduktion

COALL-06-97 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Standard' und 'LR-Intensiviert'

Patient: _____

PVA-Score: _____

ZNS-RT 12 Gy

KEINE ZNS-RT bei:
C-PPRA-B-ALL
PRO-B-ALL +
WBC < 100/nl

MTX i.th. ↑↑↑↑

TOXIZITÄTSDOKUMENTATION:
Bitte pro Block mit Datum eintragen

Zentraler Katheter: ja / nein

FN = Fieber bei Neutropenie*
BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
PN = Pilzinfektion bei Neutropenie*
PO = Pilzinfektion ohne Neutropenie*
Mn = Meningitis
VZV = Varizell-Zoster-Virusinfektion
HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
SV = andere, schwere Virusinfektion
LI = Lokale Infektion
-Pneumonie
-Abszess
-Phlegmone
-Inf. Katheter-Eintrittsstelle

Thrombose/infant
Erzephalopathie
cerebraler Krampfanfall
insulinpflichtiger Diabetes mellitus
Pancreatitis
Niereninsuffizienz
Kardiomypathie
schwere Stomatitis
VOD

* Neutrophile < 0.5/nl oder
falls keine Differenzierung vorliegt,
Leuko < 1/nl

* bei Allergie: E-ASP 2 x 45000 E/m² im Abstand von 48 h

Abb. 34: COALL-06-97 HR-Standard/LR-Intensiviert

COALL-06-97 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Standard' und 'LR-Intensiviert' Reinduktion

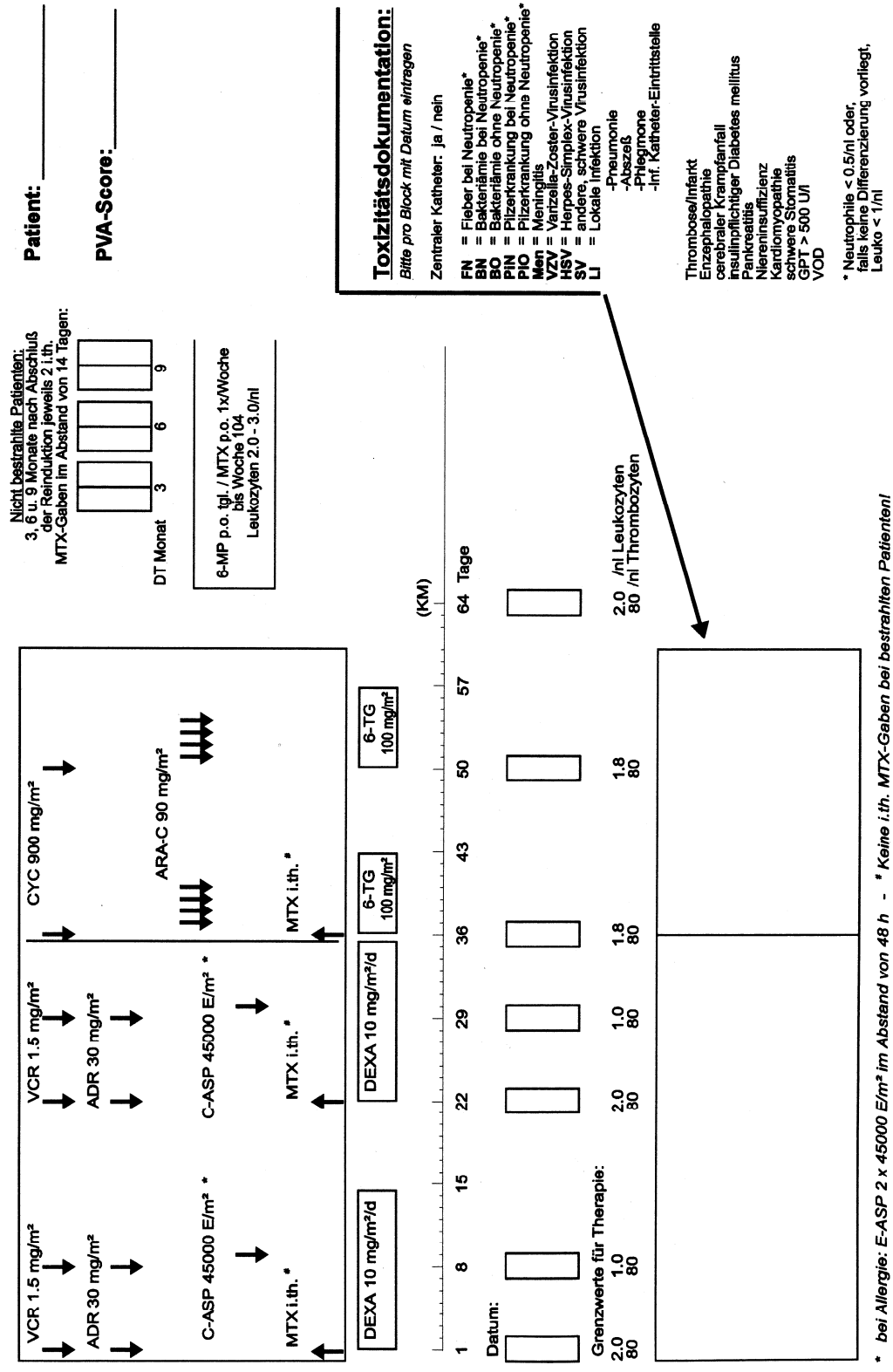


Abb. 35: COALL-06-97 HR-Standard/LR-Intensiviert Reinduktion

COALL-06-97 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Reduziert'

Patient: _____

PVA-Score: _____

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block mit Datum eintragen

Zentraler Katheter: ja / nein

FN = Fieber bei Neutropenie*
BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
PII = Pilzkrankung bei Neutropenie*
PIO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
Men = Meningitis
VZV = Varizella-Zoster-Virusinfektion
HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
SV = andere, schwere Virusinfektion
LI = Lokale Infektion
-Pneumonie
-Abszess
-Phlegmone
-Inf. Katheter-Eintrittsstelle

Thrombose/Infarkt
Erzschlaganfall
cerebraler Krampfanfall
insulinpflichtiger Diabetes mellitus
Pancreatitis
Niereninsuffizienz
Kardiomycopathie
schweres Stomatitis
GPT > 500 U/l
VOD

* Neutrophilie < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

TOXIZITÄTSBEWERTUNG:

| Parameter | 29 | 36 | 43 | 50 | 57 | 64 | 71 | 78 | 85 | 92 | 99 | 106 | 113 | 120 | 127 | 134 | 141 | 148 | 155 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| /nl Leukozyten | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| /nl Thrombozyten | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |

Datum: / /

Grenzwerte für Therapie: 1,8 / 80

* bei Allergie: E-ASP 2 x 45000 E/m² im Abstand von 48 h

Abb. 36: COALL-06-97 HR-Reduziert

COALL-06-97 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Reduziert'-Reinduktion

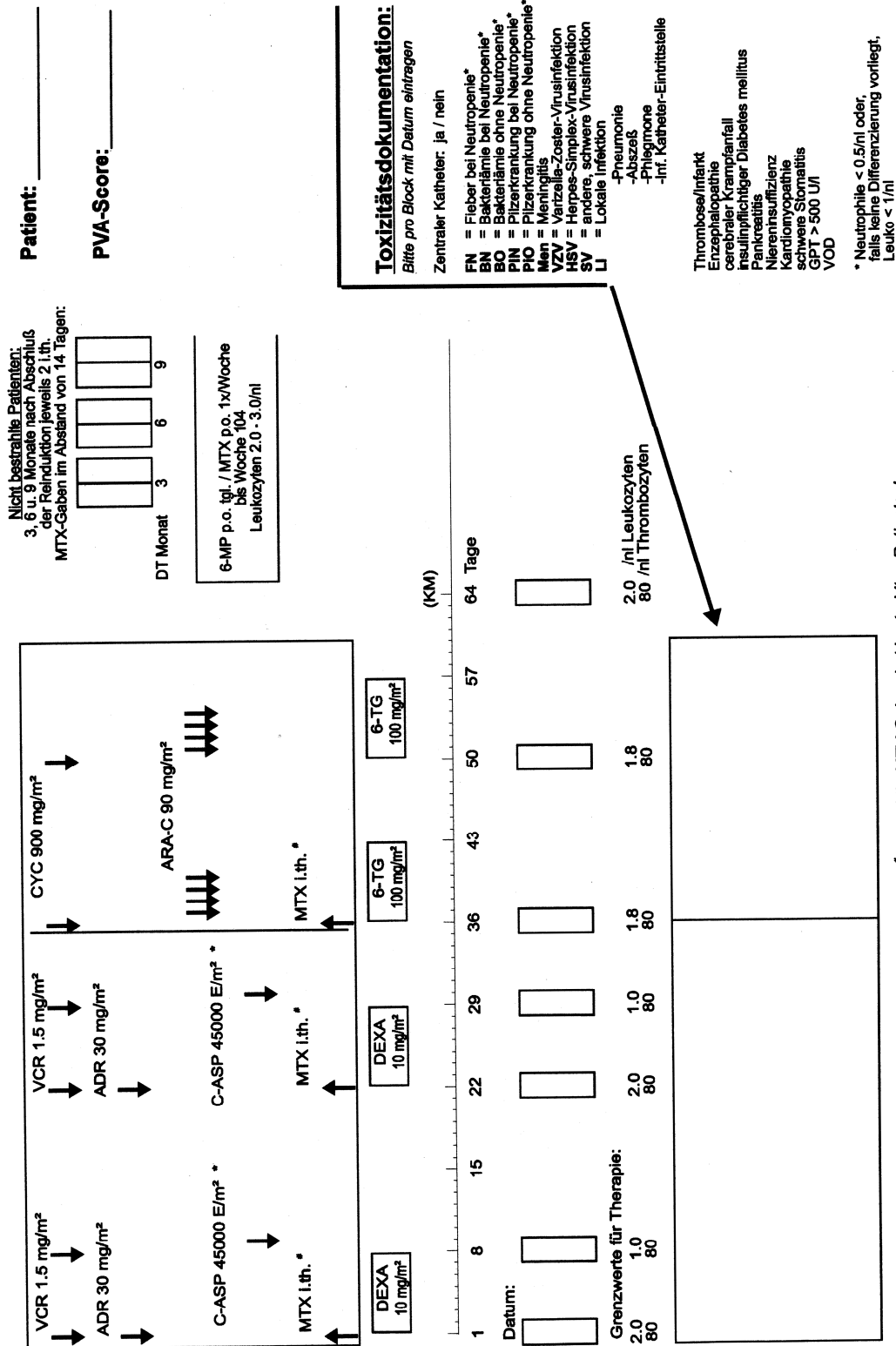


Abb. 37: COALL-06-97 HR-Reduziert Reinduktion

Asparagindepletion und Asparaginaseaktivität nach Applikation von PEG-Asparaginase bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie in der Studie COALL-06-97

Patient:
geb. :

**BEFUNDE BITTE AN DIE
STUDIENLEITUNG SCHICKEN !!**

6 ml Blut (ohne Zusätze) entnehmen **und direkt nach Abnahme in Eis stellen**, um die Enzymaktivität zu blockieren. Noch gekühlt abseren und in 2 Portionen à 1-2 ml Serum tiefrieren (siehe auch Protokoll Seite 4).

Low-Risk Protokoll
2. MTX ASP-Gabe
(Tag 78)

verschicken an: (in Trockeneis)
Asparaginkonzentration
Universitäts-Kinderklinik
Hauptgebäude 2. Stock
Labor Prof. Kohlschütter,
z.Hd. Frau Stehn
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Tel.: 040-42803-5026
-3737

High-Risk Protokoll
2. HIDAC-ASP-Gabe
(Tag 106)

verschicken an: (ungekühlt)
Asparaginase-Aktivität
Westfälische Wilhelms-Univers.
Kinderklinik
Forschungslabor Prof. Boos
Albert-Schweitzer-Str. 33
48153 Münster
Tel.: 0251-835-6741

| Woche nach Gabe | Datum Blutabnahme | Liquor |
|-----------------------|-------------------|--------|
| 0 Wert (Tag der Gabe) | | |
| 1 Woche | | |
| 2 Wochen | | |
| 3 Wochen | | |
| 4 Wochen | | |
| 5 Wochen | | |
| 6 Wochen | | |
| 7 Wochen | | |
| 8 Wochen | | |

(letzte Messung vor der nächsten ASP-Gabe)
(Proben für ASP-Aktivität gesammelt am Ende verschicken)

**Bitte Röhrchen mit
Datum versehen !**

qmKO:

PEG-ASP-Dosis:

pro qmKO:

absolut:

Abb. 38: Probenbegleitbogen Asn Serum/Liquor I

| Asparagindepletion u. Asparaginaseaktivität nach Applikation von PEG-Asparaginase bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie in der Studie COALLL-06-97 | |
|--|--|
| <p>Personalien</p> <p>Name: <input style="width: 100%;" type="text"/></p> <p>Vorname: <input style="width: 100%;" type="text"/></p> <p>geb: <input style="width: 80%;" type="text"/></p> <p>KOF: <input style="width: 20%;" type="text"/> qm</p> <p>Angaben zur Gabe</p> <p>Gabe am: <input style="width: 100%;" type="text"/></p> <p>Protokoll: <input type="radio"/> Low Risk Tag 78 <input type="radio"/> High Risk Tag 106</p> <p>Dosis/qm: <input style="width: 50%;" type="text"/> E/qm</p> <p>Dosis/abs.: <input style="width: 50%;" type="text"/> E</p> | <p>Probeentnahme-/aufbereitung</p> <p>Abnahme vor Gabe sowie 1 x wtl. bis Woche 8 6 ml Blut (ohne Zusätze) entnehmen u. direkt nach Abnahme in Eis stellen, um die Enzymaktivität zu blockieren. Noch gekühlt abseren, in 2 Portionen a 1-2 ml Serum tiefrieren (siehe auch Protokoll Seite 4) u. unbedingt mit Datum beschriften.</p> <p>Versand (auf Trockeneis) <u>Asparaginkonzentration</u> Universitäts-Kinderklinik Labor Prof. Kohlschütter z. Hd. Frau Stehn Martinistr. 52 20246 Hamburg Tel.: 040/42803-5026 o. 3737</p> <p>(ungekühlt) Proben können gesammelt verschickt werden. <u>Asparaginase-Aktivität</u> Westfälische-Wilhelms-Universität Kinderklinik Forschungslabor Prof. Boos Albert-Schweitzer-Str. 33 48153 Münster Tel.: 0251/83-56757</p> |

Angaben zum Probenmaterial

infektiös? ja nein

| Abnahme | Woche | Serum | Liquor | Ergebnis | Einheit | Probennr |
|---------|-------|--------|--------|-----------------------------|---------|----------|
| | | (oder) | | (wird vom Labor ausgefüllt) | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Bemerkungen:

| |
|-------------------------|
| |
| |
| |
| |
| |
| (Stempel des Absenders) |
| Tel: |
| Fax: |

Abb. 39: Probenbegleitbogen Asn Serum/Liquor II

COALL-07-03 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Standard'

Patient: _____

PVA-Score: _____

Klinik: _____

Unterschrift Arzt: _____

Toxizitätsdokumentation:
 Bitte pro Block eintragen
 WHO-Kriterien: siehe Anhang 4.2

FN = Fieber bei Neutropenie*
 BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
 BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
 PIN = Pilzkrankung bei Neutropenie*
 PIO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
 Men = Meningitis
 VZV = Varizella-Zoster-Virusinfektion
 HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
 SV = andere, schwere Virusinfektion
 LI = Lokale Infektion
 -Pneumonie
 -Abszess
 -Phlegmone
 -inf. Katheter-Eintrittsstelle

ASP-Allergie (WHO Grad 3+4)
 Enzephalopathie (WHO Grad 3+4)
 cerebraler Krampfanfall (WHO Grad 3+4)
 Pankreatitis (WHO Grad 3+4)
 Niereninsuffizienz (WHO Grad 3+4)
 Kardiomyopathie (WHO Grad 3+4)
 schwere Stomatitis (WHO Grad 3+4)
 GPT > 500 U/l (WHO Grad 3+4)
 VOD (WHO Grad 3+4)
 asept. Knochennekrosen (WHO Grad 3+4)
 Thrombose/intarkt
 insulinpflichtiger Diabetes mellitus

* Neutrophilie < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

Legend:
 PRED 60 mg/m²/d
 6-MP 100 mg/m²/d
 6-TG 100 mg/m²/d
 6-MP 50 mg/m²/d

Abb. 40: COALL-07-03 LR-Standard

COALL-07-03 LOW-RISK-PROTOKOLL - 'LR-Standard' - Reinduktion

Patient: _____

PVA-Score: _____

Klinik: _____

Unterschrift Arzt: _____

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block eintragen
WHO-Kriterien: siehe Anhang 4.2

FN = Fieber bei Neutropenie*
BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
PIN = Pilzerkrankung bei Neutropenie*
PIO = Pilzerkrankung ohne Neutropenie*
Men = Meningitis
VZV = Varizella-Zoster-Virusinfektion
HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
SV = andere, schwere Virusinfektion
LI = Lokale Infektion

-Pneumonie
-Abszess
-Phlegmone
-Inf. Katheter-Eintrittsstelle

ASP-Allergie (WHO Grad 3+4)
Enzephalopathie (WHO Grad 3+4)
Cerebraler Krampftfall (WHO Grad 3+4)
Pankreatitis (WHO Grad 3+4)
Niereninsuffizienz (WHO Grad 3+4)
Kardiomypathie (WHO Grad 3+4)
schwere Stomatitis (WHO Grad 3+4)
GPT > 500 U/l (WHO Grad 3+4)
VOD (WHO Grad 3+4)
asept. Knochennekrosen (WHO Grad 3+4)
Thrombose/Infarkt
insulinpflichtiger Diabetes mellitus

* Neutrophile < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

3, 6 u. 9 Monate nach Abschluß der Reinduktion 1 i.th. MTX-Gabe:

DT Monat

3 6 9

6-MP p.o. tgl. / MTX p.o. 1x/Woche
bis Woche 104
Leukozyten 2.0 - 3.0/nl

MTX i.th.

(KM)

29 Tage

2.0 /nl Leukozyten
80 /nl Thrombozyten

Grenzwerte für Therapie:
2.0 / 80
1.8 / 80
2.0 / 80

Datum: [] [] [] [] [] []

* Messung der Asparaginspiegel Woche 1 - 5

Abb. 41: COALL-07-03 LR-Standard Reinduktion

COALL-07-03 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Standard' und 'LR-Intensiviert'

Patient: _____

PVA-Score: _____

Klinik: _____

Unterschrift Arzt: _____

Toxizitätsdokumentation:
Bitte pro Block eintragen
WHO-Kriterien: siehe Anhang 4.2

FN = Fieber bei Neutropenie*
BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
PIN = Pilzkrankung bei Neutropenie*
PIO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
Men = Meningitis
VZV = Varizella-Zoster-Virusinfektion
HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
SV = andere schwere Virusinfektion
LJ = Lokale Infektion

-Pneumonie
-Abszess
-Phlegmone
-Int. Katheter-Eintrittsstelle

ASP-Allergie (WHO Grad 3+4)
Enzephalopathie (WHO Grad 3+4)
cerebraler Krampfanfall (WHO Grad 3+4)
Pankreatitis (WHO Grad 3+4)
Niereninsuffizienz (WHO Grad 3+4)
Kardiomypathie (WHO Grad 3+4)
schwere Stomatitis (WHO Grad 3+4)
GpT > 500 U/l (WHO Grad 3+4)
VOD (WHO Grad 3+4)
asept. Knochennekrosen (WHO Grad 3+4)
Thrombose/Infarkt
insulinpflichtiger Diabetes mellitus

* Neutrophilie < 0,5/nl oder
falls keine Differenzierung vorliegt,
Leuko < 1/nl

ZNS-RT 12 Gy
KEINE ZNS-RT bei:
C/PRA-B-ALL
PRO-B-ALL +
WBC < 100/nl +
WBC 100 - 200/nl
+ Tag 8 der Vorphase
< 1/nl Blasten

MTX i.th. (multiple arrows)

6-MP 50 mg/m²/d

Grenzwerte für Therapie: 1,8 / 80

Abb. 42: COALL-07-03 HR-Standard/LR-Intensiviert

COALL-07-03 HIGH-RISK-PROTOKOLL - 'HR-Standard' und 'LR-Intensiviert' Reinduktion

Patient: _____

PVA-Score: _____

Klinik: _____

Unterschrift Arzt: _____

Toxizitätsdokumentation:
Blaue pro Block eintragen
WHO-Kriterien: siehe Anhang 4.2

FN = Fieber bei Neutropenie*
 BN = Bakteriämie bei Neutropenie*
 BO = Bakteriämie ohne Neutropenie*
 PIN = Pilzkrankung bei Neutropenie*
 PIO = Pilzkrankung ohne Neutropenie*
 Men = Meningitis
 VZV = Varzella-Zoster-Virusinfektion
 HSV = Herpes-Simplex-Virusinfektion
 SV = andere, schwere Virusinfektion
 LI = Lokale Infektion

-Pneumonie
 -Abszess
 -Phlegmone
 -Inf. Katheter-Eintrittsstelle

ASP-Allergie (WHO Grad 3+4)
 Enzephalopathie (WHO Grad 3+4)
 cerebraler Krampfanfall (WHO Grad 3+4)
 Pankreatitis (WHO Grad 3+4)
 Niereninsuffizienz (WHO Grad 3+4)
 Kardiomyopathie (WHO Grad 3+4)
 schwere Stomatitis (WHO Grad 3+4)
 GPT > 500 U/l (WHO Grad 3+4)
 VOD (WHO Grad 3+4)
 assept. Knochennekrose (WHO Grad 3+4)
 Thrombose/Infarkt
 insulinpflichtiger Diabetes mellitus

* Neutrophilie < 0.5/nl oder, falls keine Differenzierung vorliegt, Leuko < 1/nl

Nicht bestrahlte Patienten:
 3, 6 u. 9 Monate nach Abschluss der Reinduktion 1 ltr.MTX-Gabe:

| | | | |
|----------|---|---|---|
| DT Monat | 3 | 6 | 9 |
|----------|---|---|---|

6-MP p.o. tgl. / MTX p.o. 1x/Woche bis Woche 104
 Leukozyten 2.0 - 3.0/nl

| Datum: | 1 | 8 | 15 | 22 | 29 | 36 | 43 | 50 | 57 | 64 |
|--------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Grenzwerte für Therapie: | 2.0 /nl Leukozyten | 1.0 /nl Leukozyten | 1.0 /nl Leukozyten | 1.0 /nl Leukozyten | 1.0 /nl Leukozyten | 1.8 /nl Leukozyten | 1.8 /nl Leukozyten | 1.8 /nl Leukozyten | 1.8 /nl Leukozyten | 2.0 /nl Leukozyten |
| | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| | 2.0 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten | 80 /nl Thrombozyten |

* Messung der Asparaginspiegel Woche 1 - 5 - *2 Keine i.th. MTX-Gaben bei bestrahlten Patienten!

Abb. 44: COALL-07-03 HR-Standard/LR-Intensiviert Reinduktion

8 Literatur

8.1 Allgemeine Literatur

- Freund M, Hoelzer D (1999) Akute lymphoblastische Leukämie. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, Kompendium internistische Onkologie, Standards in Diagnostik und Therapie Teil 2, 3. Aufl., Springer Verlag, Kapitel 41.2, S. 36-70
- Michaelis J, Kaatsch P, Spix C (2000) Jahresbericht 1999 des Deutschen Krebsregister. In: 20 Jahre Deutsches Krebsregister. Mainz, November 2000
- Poplack DG (1993) Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo PA and Poplack DG (Hrsg) Principles and Practice of Pediatric Oncology, Lippincott Company 2. Aufl., Chapter 19, p. 431-481
- Graf N (1995) Maligne Erkrankungen im Kindesalter. In: Sitzmann FC (Hrsg.) Pädiatrie. Hippokrates Verlag, Stuttgart, Kapitel 14.3, S. 532-580
- Schrapppe M, Riehm H (1997) Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.) Kompendium internistische Onkologie Teil2, 2. Aufl., Springer Verlag, Kapitel 41.94, S. 2233-2256

8.2 Spezielle Literatur

- Abshire T, Pollock BH, Billett AL, Bradley P, Buchanan GR (1995) Weekly polyethylene glycol conjugated L-asparaginase produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group Study #9310, Proc ASCO 14:334, 1038A
- Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CJ Jr., Vanes T, Kafkewitz D, Nucci M, Viau A, Davis F (1984) Cancer therapy with chemically modified enzymes. Antitumor properties of polyethylene glycol-L-asparaginase conjugates. Cancer Biochem Biophys 7:175-186
- Ahlke E, Nowak-Göttl U, Schulze-Westhoff P, Werber G, Börste H, Würthwein G, Jürgens H and Boos J (1997) Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Haematology 96: 675-681.
- Aksoy M, Erdem S, Dincol G (1976) Types of leukemia in chronic benzene poisoning. A study of thirty-four patients. Acta Haematol (Basel) 55: 65-72
- Alpar HO, Lewis DA (1985) Therapeutic efficacy of asparaginase encapsuled in intact erythrocytes. Biochem Pharmacol 34:257-261
- Altenbern RA, Housewright RD (1954) Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus* strain 19. Arch biochem Biophys 49:130-137

- Appel IM, Pinheiro JP, Den Boer ML, Lanvers C, Reniers NC, Boos J, Pieters R (2003) Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL. *Leukemia*. 17(11): 2254-2256
- Applegarth DA, Edelstein AD, Wong LT, Morrison BJ (1979) Observed range of assay values for plasma and cerebrospinal fluid amino acid levels in infants and children aged 3 month to 10 years. *Clin. Biochem*. 12(5): 173-178
- Asselin BL, Whintin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE, Cohen HJ (1993) Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* 11:1780-1786
- Astaldi G, Burgio GR, Krc J, Genova R, Astaldi AA Jr. (1969) L-Asparaginase and Blastogenesis. *Lancet* 1:423-425
- Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS, Hilden JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holcenberg JS and Stork L (2002) A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 99(6): 1986-1994
- Barron CA, Luke KH, Hsy E (1995) The use of Erwinia L-asparaginase as first line therapy for childhood acute lymphocytic leukemia. *Int J of Peaditr Hematol/Oncol* 2:7-10
- Beipackzettel Oncaspar® (Pegaspargase) Rhone Poulanc Rorer, 1994. In : Gole WJ. Editor. *Physician's desk reference*, 49th ed. Montvale (NJ): Medical economics data production, 1995:1976-8).
- Bennett J, Catovsky D, Daniel M (1976) French-American-British (FAB) Cooperative Group proposals for the classification of acute lymphoblastic leukemias. *Br J Haematol* 33:451-458
- Bizzozzero OJ, Johnson K, Ciocco A (1966) Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-64. Distribution, incidence and appearance in time. *N Engl J Med* 274:1095-1101
- Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Wqesthoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein G, Verspohl EJ, Ritter J, Jürgens H (1996) Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 32A (9):1544-1550
- Boyse EA, Old LJ, Campell HA (1967) Suppression of murine leukemias of various types: comparative inhibitory activities of guinea pig serum L-asparaginase and *E.coli* L-asparaginase. *J Exp Med* 125:17-31
- Brill A, Tomonaga M, Heyssel R (1962) Leukemia in man following exposure to ionizing radiation. *Ann Intern Med* 56:590-609
- Broome JD (1961) Evidence that the L-asparagine of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* 191:1114-1115

- Brueck M, Koerholz D, Nuernberger W et al. (1989) Elimination of L-asparaginase in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Dev Pharmacol Ther* 12:200-204
- Campbell H, Mashburn L, Boyse E (1967) Two L-asparaginases from *E.coli* B., their separation, purification and antitumor activity. *Biochem Genet* 6:721-730
- Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasy WA, Zanes R, Olayon C, Peterson RG, Handschumacher RE (1971) L-Asparaginase: Clinical, biochemical, pharmacological and immunological studies. *Ann Intern Med* 74: 893-901
- Capizzi RL, Holcenberg JS (1993) Asparaginase. In Holland J F, Frei E, Bast RC, Kufe D W, Morton DL, Weichselbaum RR (eds). *Cancer Medicine*, 3rd edition, Philadelphia, Lea & Febiger 1993: 706-805
- Chambon JP, Dupriez B, Danjou P, Provost M, Bauters F, Wurtz A, Quandalle P (1993) Acute necrotic pancreatitis secondary to asparaginase. Role of drug combinations – early diagnosis and treatment. A proposal of two cases. *Journal of Chir, Paris* 130(2): 74-78
- Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Hitchcock-Bryan S, Cassady JR, Tarbell NJ, Blattner SR, Tantravahi R, Leavitt P, Sallan SE (1986) Four agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 315: 657-663
- De Groot N, Lichtenstein N (1960) The action of *Pseudomonas fluorescens* extracts on asparagine and asparagine derivatives. *Biochem Biophys Acta* 40:99-110
- Distasio J, Niedemann R, Kafkewitz D (1976) Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem* 251:6929-6932
- Dolowy WC, Henson D, Cornet J (1966) Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with Lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. *Cancer* 19:1813-1819
- Dorr RT, Von Hoff DD (1994) Drug monographs – asparaginase. In: Dorr R.T., Von Hoff D.D. eds. *Cancer chemotherapy handbook*. Norwalk, CT: Appleton and Lange, 201-209
- Drescher U, Stehn M, Harms D, Kapaun P et al. (1994) Differing length of asparagine depletion in children receiving treatment with *E. coli* (C-ASP) –or *Erwinia*-Asparaginase (E-ASP). *Klin Pädiatrie* 206:352
- Duncan R, Spreafico F (1994) Polymer conjugates – pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin Pharmacokinet* 27:290-306
- Edman P, Artursson P, Bjork E (1987) Immobilized L-asparaginase-L-glutaminase from *Actinobacter glutaminasificans* in microspheres: some properties in *vivo* and in an extracorporeal system. *Int J Pharmaceut* 34:225-230
- Ertel IJ, Nesbit ME, Hammond D, Weiner J, Sather H (1979) Effective dose of L-Asparagine for induction of remission in previously treated children with acute lymphoblastic leukemia: A report from the children's cancer study group. *Cancer Res* 39:3893-3896

- Ettinger LJ, Kurtzberg J, Voute PA, Juergens H, Halpern S (1995) An open-label multicenter study of PEG-Asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 67:1176-1181
- Ettinger LJ, Ettinger A, Avramis VI, Gaynon P (1997) Acute lymphoblastic leukemia. A guide to asparaginase and Pegaspargase therapy. *Bio Drugs* 1:30-39
- Fabry U, Koerholz D, Jürgens H et al. (1985) Anaphylaxis to L-asparaginase during treatment for acute lymphoblastic leukemia in children – evidence of a complement-mediated mechanism. *Pediatr Res* 19:400-408
- Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Trealeven JG, Matutes E, Powles RL, Catovsky D. (1998) Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 101:158-164.
- Folley J, Borges W, Yamawaki T (1952) Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Am J Med* 13:311-321
- Fraser CL, Sarnacki P, Arieff AI (1985) Abnormal sodium transport in synaptosomes from brain of uremic rats. *J Clin Invest* 75:2014-2023
- Fürst P, Pollack L, Graser TA, Godel H, Stehle P (1990) Appraisal of Four Pre-Column Derivatization Methods for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of free Amino acids in Biological Materials. *J. Chromatogr* 151:557-569
- Fumarola C, Zerbini A, Guidotti GG (2001) Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. *Cell Death Differ* 8:1004-1013
- Gentili D, Conter V, Rizzari C, Tschuemperlin B, Zucchetti M, Orlandoni D, D'Incalci M and Masera G (1996) L-asparagine depletion in plasma and cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia during subsequent exposures to Erwinia-Asparaginase. *Annals of Oncology* 7:725-730
- Gerrits G P, Trijbels FJ, Monnens LA, Gabreels F J, De Abreu R A, Theeuwes Ad G, van Raay-Selten B (1989) Reference values for amino acids in cerebrospinal fluid of children determined using ion-exchange chromatography with fluorometric detection. *Clin. Chim. Acta.* 82: 271-280
- Gombotz WR, Hoffman AS, Schmer G (1985) The immobilization of L-asparaginase on porous hollow fiber plasma filters. *J Controlled Release* 2:375-383
- Gotoff S, Amirmokri E, Liebner E (1967) Ataxia-teleangiectasia: Neoplasia, untoward exposure to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child* 11: 617-625
- Graser TA, Godel HG, Albers S, Földi P, Fürst P (1985) Ultra rapid and sensitive High-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal Biochem* 151:142-152
- Greaves M (1986) Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science* 234:697-704
- Greaves M, Chan L (1986) Is spontaneous mutation the major "cause" of childhood acute lymphoblastic leukemia? *Br J Haematol* 64:1-13

- Haley EE, Fischer GA, Welch AD (1961) The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. *Cancer Res* 21:532-536
- Hall JG (1970) The partitioning of L-asparaginase between blood and lymph. *Recent Results Cancer Res* 33:75-80
- Hanssen-Hagge T, Yokota S, Bartram CR. (1989) Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor chain sequences. *Blood* 74: 1762-17676.
- Harms D, Janka-Schaub GE (2000) Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukaemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89 and 92. *Leukemia* 14:2234-2239
- Haskell CM, Canellos GP, Cooney DA, Hansen AA (1970) Biochemical and pharmacologic effects of L-Asparaginase in man. *J Lab Clin Med* 75:763
- Heiblim D I, Evans H E, Glass L, Agbayani MM (1978) Amino acid concentrations in cerebrospinal Fluid. *Arch. Neurol.* 35: 765-778
- Henze G, Langermann H, Fengler R (1982) Therapiestudie BFM 79/81 zur der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen: Intensivierte Reinduktionstherapie für Patientengruppen mit unterschiedlichem Rezidivrisiko. *Klin Pädiatr* 194:195-203
- Henze G et al. (1997) Therapiestudie ALL-REZ-BFM-96: Studie zur Behandlung von Kindern mit einem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie. Therapieprotokoll in der Fassung vom 01.03.1997, Kliniken und Polikliniken für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie des Charité-Virchow Klinikums, Humboldt Universität zu Berlin, 13353 Berlin
- Hill JM, Roberts J, Loeb E, Khan A, MacLellan A, Hill RB (1967) L-Asparaginase therapy for leukemia. *JAMA* 202:882-888
- Ho DH, Thetford B, Carter C (1970) Clinical pharmacological studies of L-asparaginase. *Clin Pharmacol Ther* 11:408-417
- Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowsky A, Newman RA, Krakoff IH (1986) Clinical pharmacology of polyethylene-glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos* 14:349-352
- Holcenberg JS (1975) Therapeutic model for asparaginase and glutaminase treatment. *Clin Pharmacol Therapeut* 17:236
- Holcenberg JS, Roberts J (1977) Enzymes and drugs. *Ann Rev Pharmacol* 17:97
- Holland J, Fasanello S, Ohnuma T (1974) Psychiatric symptoms associated with L-asparaginase administration. *J Psychiatric Res.* 10:105-113
- Holle LM (1997) Pegaspargase: an alternative? *Ann Pharmacotherapy* 31:616-624
- Jaffe N, Traggis D, Das L et al.(1971) L-Asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res* 31:942-949
- Jones B, Holland JF, Glidewell O, Jacquillat C, Weil M, Pochedly C, Sinks L, Chevalier L, Maurer HM, Koch Kjell, Falkson G, Patterson R, Seligman B, Sartorius J, Kung F,

- Haurani F et al. (1977) Optimal use of L-Asparaginase (NSC-109229) in acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 3:387-400
- Kellner R, Meyer HE, Lottspeich F (1994) Amino acid analysis. In: Kellner R, Lottspeich F, Meyer HE (eds.) *Microcharacterization of proteins*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Kap.111, 93-113
- Kidd JG (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in-vivo by means of normal guinea pig serum - course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum or rabbit serum. *J Exp Med* 98:565-582
- Killander D, Dohlwitz A, Engstedt L et al. (1976) Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* 37:220-228
- Kolarz G, Pietschmann H (1971) Leukocyte alterations during asparaginase therapy. *Wien med Wochenschr* 121:196-199
- Kurtzberg J, Moore JO, Scudiero D, Franklin A (1988) A Phase II study of polyethylene glycol (PEG) conjugated L-asparaginase in patients with refractory acute leukemias (abstract). *Proc Am Assoc Cancer Res* 29:219
- Kurtzberg J, Freidman H, Asselin B, Schultz W, Kricher J, Scudiero D (1990) The use of polyethylene glycol-conjugated-L-asparaginase (PEG-ASP) in patients with prior hypersensitivity to native L-asparaginase (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:848
- Kurtzberg J (1994) A new look at PEG- L-asparaginase (PEG-ASP) pharmacology in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). (abstract) *Cancer Invest* 2 Suppl. 1:59-60
- Langens C, Vieira Pinheiro JP, Hempel G, Wuerthwein G and Boos J (2002) Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Analytical Biochemistry*, 309(1):117-126.
- Lenda K, Svenneby G (1980) Rapid high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in synaptosomal extracts. *Journal of Chromatography* 198:16-519.
- Lilleyman J, Hann I, Stevens RF, Eden OB, Richards SM (1986) French-American-British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukemias and its clinical importance. *J Clin Pathol* 39:998-1002
- Maita T, Morokuma K, Matsuda GJ (1974) Amino acid sequence of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 76:1351
- Manning GB, Campbell LL Jr (1957) The asparagine deamidase of *Bacillus coagulans* and *Bacillus stearothermophilus*. *Can J Microbiol* 3:1001-1009
- Mashburn LT, Wriston JC (1964) Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 105:451
- Miller D, Leikin S, Albo V et al. (1981) Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 48:199-201

- Miller HK, Salser JS, Balis ME (1969) Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (E.C.3.5.1.1.) therapy. *Cancer Res* 29:183-7
- Miller R (1968) Relation between cancer and congenital defects: An epidemiologic evaluation. *JNCI* 40:1079-1085
- Miller R (1970) Neoplasia and Down 's Syndrome. *Ann. NY. Acad Sci* 171: 637-644
- Millmann HA, Cooney DA (1974) The distribution of L-asparagine synthetase in principal organs of several mammalian and avian species. *Biochem J* 142:27-35
- Minton NP, Bullmann HMS, Scawen MD, Atkinson T, Gilbert HJ (1986) Nucleotide sequence of the *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 L-asparaginase gene (Recombinant DNA; M13 phage vector, amino acid sequencing: signal peptide, codon utilization, NIF sequence) *Gene* 46:25
- Morgan G, Hughes G, Janssen J, Gow J, Guo A, Goldmann JM, Wiedemann LM, Brtram CR (1989) Polymerase chain reaction for detection of residual leukemia. *Lancet* 1:928
- Müller HJ, Löning L, Horn A, Schwabe D, Gunkel M, Scheappe M, von Schütz V, Henze G, Casimiro da Palma J, Ritter J, Vieira Pinheiro JP, Winklehorst M, Boos J (2000) Pegylated asparaginase (Oncaspar™) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. *Br J Haematol* 110:379-483
- Müller HJ, Beier R, Casimiro da Palma J, Lanvers C, Ahlke E, von Schütz V, Gunkel M, Horn A, Schrappe M, Henze G, Kranz K and Boos J (2002) PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 IE/m² BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49:149-154.
- Nakamura N, Morikawa Y, Tanaka M (1971) L-Asparaginase from *E.coli*. Part II: substrate specificity studies. *Agric Biol Chem* 35(5):743-751
- Nesbit ME, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond GD (1979) Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Haematol Oncol* 1(1):120-124
- Nesbit ME, Ertel I, Hammond GD (1981) L-Asparaginase as a single agent in acute lymphocytic leukemia: survey of studies from children 's cancer study group. *Cancer Treat Rep* 65 (Suppl 4):101-107
- Neumann RE, McCoy TA (1956) Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine. *Science* 124:124-125
- Nowak-Göttel U, Ahlke E, Schulze-Westhoff P et al. (1996) Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood ALL: a two-step dose reduction of one *E.coli* asparaginase preparation. *Br J Haematol* 95:123-126
- Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Phillips FS, Clarkson BD, Talla L, Leeper RD, Schwartz MK, Kim JH (1967) Inhibition of leukemia in man. *Cancer Res* 27:2619-2631
- Oettgen HF, Stephenson PA, Schwartz MK, Campbell HA, Phillips FS, Clarkson BD, Talla L, Tan CC, Clarkson BD, Golbey RB, Krakoff IH, Karnofsky DA, Murphey ML, Burchenal JH (1970) Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25:253-278

- Ortega JA, Nesbit ME, Donaldson MH (1977) L-Asparaginase, Vincristine and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 37:535-540
- Paolucci G, Masara G, Vecchi V, Marsoni S, Pession A, Zurlo MG (1989) Treating Childhood acute lymphoblastic Leukemia (ALL): Summary of ten Years' Experience in Italy. *Med Pediatr Oncol* 17:83-91
- Park YK, Abuchowski A, Davis S, Davis F (1981) Pharmacology of *Escherichia coli*-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer Res* 1:373-376
- Parsons et al. (1997) Asparaginase associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89:1886-1895
- Patel SS, Benfield P (1996) Pegaspargase (polyethylene glycol-L-asparaginase). *Clin Immunother* 5(6):492-496
- Pinkerton C, Bowman A, Holtzel H, Chessels JM (1987) Intensive consolidation chemotherapy for acute lymphoblastic leukaemia (UKALL X pilot study). *Arch Dis Child* 62: 12-18
- Poznanski MJ, Shandling M, Salkie MA, Elliott J, Lau E (1982) Advantage in the use of L-asparaginase-albumin-polymer as an antitumor agent. *Cancer Res* 42:1020-1025
- Prager MD, Bachynsky N (1968) Asparagine synthetase in normal and malignant tissue; correlation with tumor sensitivity to asparaginase. *Arch Biophys* 127:645
- Pui CH, Rasking W, Kitching G et al. (1989) Clonal analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with "cytogenetically independent" cell populations. *J Clin Invest* 83:1971-1977
- Ramakers van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Schmiegelow K, Janka-Schaub GE, Veermann AJP (2000) TEL/AML 1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90; 2723-2729
- Ramsay NK, Coccia PF, Krivit W, Nesbit ME, Edson JR (1977) The effect of L-asparaginase on plasma coagulation factors in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 40:1398-1401
- Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubinger DL et al. (1981) L-Asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res* 41:4554-4558
- Riehm H, Gadner H, Henze G (1995) Therapiestudie ALL-BFM 95: Multizentrische kooperative Therapiestudie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie. Therapieprotokoll in der Fassung vom 10.11.1995. Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Kinderheilkunde IV: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, 30625 Hannover
- Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Lampert F, Niethammer D, Reiter A, Schellong G (1990) Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM trials. *Haematol Blood Transf* 33:439-450

- Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML et al. (1991) Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet* 337:61-66
- Rizzari C, Zucchetti M, Conter V, Diomede L, Bruno A, Gavazzi L, Paganini M, Sparano P, Lo Nigro L, Aricò M, Milani M and D'Incalci M (2000) L-asparagine depletion and L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukaemia receiving i.m. or i.v. Erwinia C. or E. coli L-asparaginase as first exposure. *Annals of Oncology* 11:89-193.
- Rizzari C, Gentili D, D'Incalci M et al. (1995) Inadequate L-asparagine (L-ASN) depletion after repeated courses of Erwinia L-asparaginase (L-ASP) administration in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Med Pediatr Oncol* 25:282
- Roberts J, Prager MD, Bachynsky N (1966) The antitumor activity of *E.coli* L-asparaginase. *Cancer Res* 26:2213-2217
- Sadoff J, Hwang S, Rosenfeld D et al.(1997) Surgical pancreatic complications induced by L-asparaginase. *J of Pediatric Surgery* 32(6):860-863
- Sallan SE, Hitchcock-Bryan S, Gelber R et al.(1983) Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 43: 5601-5607
- Sasaki M, Tonomura A (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking-agents. *Cancer Res* 33:1829-1836
- Sawitsky A, Bloom D, German J (1966) Chromosomal breakage and acute leukemia in congenital teleangiectatic erythema and stunted growth. *Ann Intern Med* 65:487-495
- Schwartz MK, Lash ED, Oettgen HF, Tomao FA (1970) L-asparaginase activity in plasma and other biological fluids. *Cancer* 25:244
- Schwartz MK (1970) The distribution and clearance of L-asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (editors) *Experimental and Clinical Effects of L-Asparaginase*. Springer, Heidelberg, S:58-63
- Smith QR (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood brain barrier. *J Nutr* 130:1016S-1022S
- Stams WA, den Boer M, Beverloo HB, Meijerink Jules PP, Stigter RL, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Slater R, Pieters R (2003) Sensitivity to L-Asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21) positive pediatric ALL. *Blood* 101: 2743-2747
- Sutow WW, Garcia F, Straling KA, Williams TE, Lane DM, Gehan EA (1971) L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia. The Southwest Cancer Chemotherapy Group. *Cancer* 28:819-24
- Takase K, Takagi S, Okawa H, Yata J (1985) Analysis of the effect of L-Asparaginase on the cell cycle of leukemic T-cells by flow cytometry. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 48:159-63
- Tucker M, Meadows A, Boice JJ et al. (1987) Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer. *JNCI* 78:459-464

- Updike SJ (1985) Entrapment of L-asparaginase in red blood cells. *Bibl Haemat* 51:65-74
- Uren JR, Reagin RC (1979) Improvement in the therapeutic, immunological, and clearance properties of *E.coli* and *Erwinia*-L-asparaginase by attachment of poly-L-alanyl peptides. *Cancer Res* 39:1927-1933
- Vigliani E, Sarta G (1964) Benzene and leukemia. *N Engl J Med* 271:872-876
- Vieira Pinheiro J P, Müller HJ, Schwabe D, Gunkel M, Casimiro da Palma J, Henze G, von Schütz V, Winkelhorst M, Würthwein G, Boos J (2001) Drug monitoring of low dose PEG-asparaginase (Oncaspar™) in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 113: 115-119
- Wada H, Imamura I, Sako M, Katagiri S, Tarui S, Nishimura H, Inada Y (1990) Antitumor-Enzyme: Polyethylene glycol-modified asparaginase. *Ann NY Acad Sci* 613:98-108
- Wade HE, Elsworth R, Herbert E (1968) A new L-asparaginase with antitumor activity. *Lancet* 2:76-7
- Wade HE, Robinson HK, Philips BW (1971) The asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *J Gen Microbiol* 69:299-332
- Wang B., Relling M.V., Storm M.C., Woo M.H., Ribeiro R., Pui C-H., Hak L.J. (2003) Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* 17:1583-1588
- Weiss RB (1992) Hypersensitivity reactions. *Semin Oncol* 19:458-477
- Werber G (1995) Drug monitoring von Asparaginase im Rahmen des pädiatrischen Therapieprotokolls der ALL/NHL-BFM 90 Studie. *Med Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Whelan HA, Wriston JC Jr (1969) Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* B. *Biochemistry* 8:2386
- Wileman TE, Foster RL, Elliot PNC (1986) Soluble asparaginase-dextran conjugates show increased circulatory persistence and lowered antigen activity. *J Pharm Pharmacol* 38:264-271
- Wileman TE (1991) Properties of asparaginase-dextran conjugates. *Adv Drug deliv Rev* 6:167-180
- Williams D, Raimondi S, Rivera G (1984) Most cases of acute lymphoblastic leukemia undergo marked karyotypic shift from diagnosis to relapse. *Blood* 62 (suppl 1): 741a
- Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Gajjar AJ, Sandlund JT, Harrison PL, Wang B, Pui CH and Relling MV (1999) Cerebrospinal fluid asparagine concentrations after *Escherichia coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 17(5):1568-1573
- Wriston JC Jr, Yelin TO (1973) L-Asparaginase: A review. *Adv Enzymol* 39:185
- Wriston JC Jr (1985) Asparaginase. *Meth Enzymol* 113:608

- Yokota S, Hansen-Hagge T, Ludwig WD et al. (1991) Use of polymerase chain reaction to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood* 77:331-339
- Yoshimoto T, Nishimura H, Saito Y (1986) Characterization of polyethyleneglycol modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of leukemia. *Jpn J Cancer Res* 77:1264-1270
- Yunis J, Brunning RD (1986) Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Clin Haematol* 15:597-620
- Yurek E, Peru D, Wriston JC Jr (1983) On the distribution of plasma L-asparaginase. *Experientia* 39:383

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Frau Prof. Dr. Janka für die außerordentlich nette und kompetente Betreuung. Durch sie lernte ich einen kritischen Umgang mit wissenschaftlichen Arbeiten und Fragestellungen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Kohlschütter für die Bereitstellung des Labors und für die fachliche Auseinandersetzung mit den methodischen Ansätzen der Aminosäurenmessung.

Danken möchte ich auch Frau Stehn, MTA, die mich in die Methode der Ionenaustauschchromatographie, den Umgang mit den Proben und der Arbeit im Labor vertraut machte und mir bei der Arbeit half. Ebenso danke ich Frau Dr. Escherich, die meine Arbeit auf onkologisch-klinischer Ebene betreute, die Patientenrekrutierung steuerte und mir bei vielen klinisch-organisatorischen Fragen Rede und Antwort stand. Des weiteren danke ich Herrn Prof. Boos und Herrn Pinheiro, Universitätsklinik Münster, für die Messung der Asparaginaseaktivität und des Asparagins im Liquor sowie für die gute Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch.

Danken möchte ich nicht zuletzt auch Anne Kunze, die meine Doktorarbeit korrekturgelesen hat sowie meiner Schwester Antje, die mir in Formatierungsfragen oftmals weitergeholfen hat.

Kirsten Wenner

PERSÖNLICHE ANGABEN

| | |
|---------|---------------------------------|
| Adresse | Weidenallee 2a 20357 Hamburg |
| Geburt | 10.11.1974, München |

SCHULBILDUNG

| | |
|-------|--|
| 06/95 | Abitur Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium, Lütjenburg, Schleswig-Holstein |
|-------|--|

STUDIUM

| | |
|-------------|---|
| 10/95-12/03 | Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg |
|-------------|---|

BERUFSERFAHRUNG

Famulaturen

| | |
|----------|---|
| 02-03/98 | Allgemeinchirurgie , UKE, Prof. Dr. Schlosser |
| 02/99 | Gynäkologie & Geburtshilfe , Krankenanstalt Rudolfstift, Wien, Prof. Dr. Grünberger |
| 03/99 | Gynäkologie & Geburtshilfe , Universitätsklinik Lübeck, Prof. Dr. Diedrich |
| 09-10/99 | Pädiatrie , Wanganui Hospital, Wanganui, Neuseeland, Dr. de Sylva |
| 09/00 | Pädiatrie , UKE, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. Schneppenheim |

Praktisches Jahr

| | |
|-------------|--|
| 09/01-02/02 | Innere Medizin , AK Eilbek, Prof. Dr. Heidemann |
| 02/02-04/02 | Chirurgie , AK Eilbek, Dr. Steinmüller |
| 04/02-06/02 | Chirurgie , Hospital Vicente Corral Moscos Universidad de Cuenca, Ecuador, Dr. Moscoso |
| 06/02-08/02 | Pädiatrie , Hospital for Sick Children, Toronto Canada, Dr. Mountstephen (Dep. of Emergency), Dr. Mc. Crindle, Dr. Gross (Dep. of Cardiology) |
| 08/02-10/02 | Pädiatrie , UKE, Prof. Dr. Ullrich |

Ärztin im Praktikum

| | |
|-----------------------------|---|
| 02/03 – 07/04 Seit 06/03 | Pädiatrie , UKE, Prof. Dr. Ullrich Fettstoffwechselambulanz der Kinderklinik des UKE, Prof. Dr. Ullrich |
|-----------------------------|---|

Assistenzärztin

| | |
|---------------------------|---|
| 10/04-01/06 Seit 01/06 | Pädiatrische Hämatologie und Onkologie UKE In Rotation im Altonaer Kinderkrankenhaus |
|---------------------------|---|

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Datum, Unterschrift